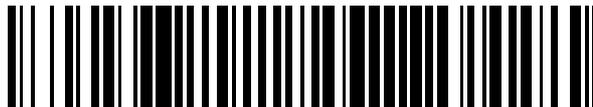


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 137**

51 Int. Cl.:

A61Q 5/00 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09159080 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013 EP 2113286**

54 Título: **Usos de BNIPXL-beta en la canicie prematura**

30 Prioridad:

30.04.2008 FR 0802435

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

17.04.2013

73 Titular/es:

**L'OREAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**BERNARD, BRUNO;
COMMO, STÉPHANE y
DE LACHARRIERE, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 401 137 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

Usos de BNIPXL-beta en la canicie prematura

5 Anular o hacer que puedan atenuarse los efectos del envejecimiento es una preocupación en constante aumento. En este contexto, ocultar el cabello blanco, considerado poco agraciado, mediante lavados con champú con tratantes colorantes es, a partir de ahora, una actividad muy difundida. Por tanto, es obvio que, incluso si esta técnica permite anular eficazmente los efectos del fenómeno, no está destinada a anular las causas. De hecho, esta solución es temporal y debe repetirse con frecuencia.

10 El blanqueamiento del cabello (canicie) se debe a una desaparición progresiva de melanocitos del folículo piloso (Commo S, Gaillard, O. & Bernard, B.A., 2004). Este proceso afecta al mismo tiempo a los melanocitos de la unidad de pigmentación situados en la base del folículo y responsables directos de la pigmentación de la fibra, así como a los melanocitos progenitores situados en parte distal de la vaina externa del folículo piloso que sirven como reservorio a partir del cual se renueva la unidad de pigmentación en cada ciclo piloso (Commo, S. & Bernard, B.A. 2000).

15 Aunque esta desaparición progresiva de los melanocitos parece estar relacionada con la ausencia de la expresión de la enzima dopacromo tautomerasa (Commo S., Gaillard O., Thibaut S. & Bernard B.A., 2004, patentes FR2840530, FR2840531, FR2863484), los autores de la invención han elegido explorar la aparición del cabello blanco, o **canicie**, bajo un ángulo totalmente nuevo, el de la genética, investigando la identificación, mediante una estrategia genética global, de otros genes eventualmente relacionados con la canicie prematura.

20 En efecto, explorar la canicie desde el punto de vista genético permite detectar con profundidad los mecanismos de la despigmentación. Esto también permite identificar los genes que están implicados en la canicie. Esta identificación abre la puerta a numerosas aplicaciones, en el campo del cuidado del cabello, tanto cosméticas como terapéuticas o de diagnóstico.

25 Con esta finalidad, los autores de la invención han elegido centrar sus investigaciones en primer lugar sobre la canicie prematura (CP) o aparición de cabello blanco en etapas tempranas de la vida, cuyo carácter hereditario se conoce y que está relacionado con determinadas enfermedades autoinmunitarias. Para explorar la canicie desde un punto de vista genético, se ha realizado un estudio de segregación de ADN en familias donde la canicie aparece en etapas tempranas de la vida. Para garantizar las mejores probabilidades de éxito para esta búsqueda de genes, el fenotipo CP se atribuyó a aquellos individuos que presentaban cabellos blancos antes de 25 años y en los que la mitad de su cabellera era gris a los 30 años. Para participar en un estudio de relación se incluyeron doce familias.

30 Los resultados de estos trabajos han permitido a los autores de la invención definir, en primer lugar, zonas cromosómicas y/o genómicas que comprenden genes implicados en la canicie con una fuerte probabilidad. De este modo se han identificado cinco loci en los cromosomas 3, 5 y 11 (solicitudes de patentes FR2842105 y WO04/007764) y en los cromosomas 6 y 9 (solicitudes de patentes FR2842104, FR2853532, FR2865217 y WO04/007742).

35 Entre los genes asociados con la canicie prematura, el gen de DDX31 (GI: 20336296; n° de acceso NM_022779) se ha propuesto como un supuesto gen relacionado con la canicie prematura, situado en 9q34 y descrito en las solicitudes de patentes de L'Oréal FR2853532 y FR2865217. El gen DDX31 es una probable helicasa de ARN dependiente de ATP, que pertenece a la familia de las helicasas con motivo DEAD ("DEAD- box protein 31").

40 Para explorar más adelante la función de DDX31 en los procesos de la canicie prematura, los autores de la invención han buscado identificar, mediante una estrategia del sistema del doble híbrido de levaduras, los homólogos proteicos eventuales susceptibles de interactuar con DDX31.

45 De manera sorprendente e inesperada, los autores de la invención han descubierto que la BNIPXL-beta (proteína 2 que interacciona con BCl2/proteína de 19 kDa del adenovirus E1B) era una presa de DDX31, preferentemente de la forma larga de DDX31. La puntuación de confianza en la interacción es particularmente buena.

50 Las diferentes funciones de la BNIPXL beta aún no se conocen bien. Esta proteína se produce por empalme alternativo de KIAA0367 (alias: molécula que contiene el motivo BCH en la región C terminal 1, molécula que contiene el motivo BNIP2 en la región 1 C terminal; N ° de acceso Q58A63, GI: 125987727).

55 Por homología de dominios (dominio CRAL-TRIO o Sec14; el dominio se presenta en BNIP2), se supone que la BNIPXL-beta está implicada en el transporte y metabolismo de fosfolípidos, que tiene una función pro-apoptótica relacionada con una interacción con bcl2, y que participa en la circulación celular; podría desempeñar una función en la formación de protusiones membranosas (Machida *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2005; Shang *et al.* 2003; Qin *et al.*, 2003; Belcredito *et al.*, 2001; Sirokmany *et al.*, 2006; Mousley *et al.*, 2007).

60

65

Por tanto, la interacción entre DDX31 y BNIPXL-beta es aparentemente muy importante en la circulación vesicular, debido a su papel en la migración y transferencia de melanosomas y por tanto en la implicación en la canicie particularmente la canicie prematura.

5 En la presente solicitud, los términos que se indican a continuación tienen más particularmente el siguiente significado:

10 **Grado de identidad:** el grado de identidad entre dos secuencias (de proteínas o de ácidos nucleicos) se determina particularmente alineando las dos secuencias para maximizar los puntos de concordancia minimizando al mismo tiempo los espacios ("gap"); se obtiene dividiendo el número de aminoácidos o de ácidos nucleicos comunes entre la longitud de las dos secuencias más largas.

15 **ARNi** (en inglés RNAi): ARN de interferencia: una molécula de ARN que puede dirigir una secuencia particular en una molécula de ARN y conducir la escisión de este ARN a un sitio determinado dentro de la secuencia diana. La molécula de ARN que puede escindir el ARN de interferencia se denomina, por extensión, ARN interferente o ARNi. Cuando esta reacción se produce en el interior de una célula y cuando el ARN escindido es ARN mensajero (ARNm), la escisión de la molécula de ARNm conduce después a la degradación de la molécula, impidiendo así cualquier etapa ulterior, tal como la traducción del ARNm en proteína. Según el tipo de ARNi, la secuencia diana es la secuencia complementaria del ARN interferente (particularmente ARNip) o una secuencia casi complementaria del ARN interferente, no obstante con algunas posiciones no concordantes (particularmente ARNmi).

20 **ARNip:** ARN interferente pequeño, un anglicismo que significa ARN interferente de pequeño tamaño. Se trata de una secuencia de ARN bicatenario que comprende aproximadamente de 21 a 23 nucleótidos (Dykxhoorn et al, Nature Reviews, 2003, vol 4, p.457). Los ARNip pueden provenir de la escisión de ARN bicatenario de tamaño más grande por una proteína denominada dicer. Después, los ARNip así producidos se integran en un complejo de inhibición multiproteico inducido por el ARN (complejo silenciador inducido por RISC-ARN). El ARNm diana se escinde en un solo sitio en medio de la región dúplex formada entre el ARNip (que sirve de guía) y el ARNm diana, de 10 nucleótidos del extremo 5' del ARNip.

30 Para obtener los ARNip, en una célula, pueden contemplarse varios métodos.

1. es posible introducir directamente en la célula los ARNip obtenidos por síntesis química; en este caso no se realiza la reacción de dicer.
2. también puede contemplarse introducir en la célula fragmentos de ARN bicatenario de gran tamaño que después escinde en ARNip la proteína dicer.
- 35 3. es posible introducir o expresar en la célula un dúplex de ARN en horquilla, por ejemplo un ARNhp (por ARN en horquilla pequeño o corto), que a continuación escinde la proteína dicer en ARNip.

40 Por **fragmento polinucleotídico** se entiende cualquier molécula resultante del encadenamiento lineal de al menos dos nucleótidos, pudiendo ser esta molécula monocatenaria, bicatenaria o tricatenaria. También puede tratarse de una molécula de ADN bicatenaria, de un ADN monocatenario, de un ARN, de un dúplex ARN monocatenario - ADN, de un triplex ADN-ARN o de cualquier otra combinación. El fragmento polinucleotídico puede estar aislado de manera natural, recombinante o sintética. Cuando el fragmento polinucleotídico comprende hebras complementarias, la complementariedad no es necesariamente perfecta, pero la afinidad entre las diferentes hebras es suficiente para permitir el establecimiento de enlaces estables de tipo Watson Crick entre las dos hebras.

45 Así como el apareamiento de las bases deben ser preferentemente de tipo Watson-Crick, no se excluyen otros tipos, tales como un apareamiento de tipo Hoogsteen o Hoogsteen inverso. Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a la proteína BNIPXLβ, o a una parte de BNIPXLβ, para una aplicación terapéutica o cosmética, particularmente para el tratamiento o la prevención de la canicie prematura en el ser humano. En efecto, debido a su interacción con DDX31, en un proceso implicado en la canicie prematura, esta proteína está de por sí misma relacionada con la canicie, particularmente con la canicie prematura.

50 La secuencia de la proteína BNIPXLβ se ilustra en la Figura 2A y corresponde a la secuencia SEC ID N° 1. Una parte de BNIPXLβ, en el ámbito de la presente solicitud, es un polipéptido que comprende al menos 30 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 1.

En todo el ámbito de la presente descripción, por cosmética se entiende cualquier aplicación que solo tiende a modificar la estética y que no tiene ninguna intención terapéutica.

60 La invención también se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de BNIPXLβ o que comprende una parte de BNIPXLβ, siendo dicha parte tal y como se ha definido anteriormente, para una aplicación terapéutica o cosmética.

65 La invención también se refiere a cualquier polipéptido que comprenda una región que tenga al menos una identidad del 90% con BNIPXLβ o con una parte de BNIPXLβ para una aplicación terapéutica, particularmente en el campo de

la canicie prematura. Dicha parte de BNIPXLβ comprende al menos 30 aminoácidos.

El polipéptido descrito comprende por tanto una región cuya secuencia comparte un fuerte porcentaje de identidad con BNIPXLβ o con una parte de BNIPXLβ, pero también puede comprender otras secuencias, además de la mencionada anteriormente, en el extremo N terminal o bien C terminal, o bien en los dos.

5 Preferentemente, en la región del polipéptido que presenta un fuerte porcentaje de identidad con BNIPXLβ o con una parte de BNIPXLβ, el porcentaje de identidad es superior al 90%, preferentemente incluso por encima del 95%, o 98%.

10 De acuerdo con una realización preferida, dicho polipéptido comprende una parte de la proteína BNIPXLβ, comprendiendo esta parte al menos 30 aminoácidos o más.

De manera también preferente, el polipéptido comprende una secuencia que comparte un fuerte porcentaje de identidad con una parte de BNIPXLβ de al menos 40, o 50 aminoácidos consecutivos, o incluso 75 o 100, sobre los 732 aminoácidos de la proteína BNIPXLβ. Preferentemente, la parte de BNIPXLβ es una parte que corresponde a un dominio que tiene una importancia biológica, por ejemplo, un sitio de fijación con una proteína homóloga. Existen programas bien conocidos por el experto en la materia para determinar dominios particularmente interesantes dentro de la secuencia SEC ID N°: 1.

20 Las aplicaciones terapéuticas o cosméticas mencionadas pertenecen a la terapia del cabello, particularmente al tratamiento o la prevención de la canicie prematura, preferentemente hereditaria.

La presente invención también se refiere a la utilización de BNIPXLβ, de una parte de BNIPXLβ tal y como se describe anteriormente o de un polipéptido tal y como se describe, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la canicie prematura en el ser humano.

Por otro lado, los autores de la invención han demostrado la importancia de la interacción entre DDX31 y BNIPXLβ y por consiguiente el efecto beneficioso de una disminución del nivel de la expresión de BNIPXLβ, que puede obtenerse por ARNi. Dicho efecto beneficioso puede estar particularmente en el fenotipo de la canicie prematura.

La presente invención también se refiere por tanto a una molécula que comprende una secuencia de ARNi que tiene una identidad de al menos un 90% con toda o parte de la secuencia de ARNm que corresponde a BNIPXLβ, para un uso terapéutico o cosmético en el ser humano, comprendiendo dicha parte al menos 18 nucleótidos. Preferentemente, la parte en cuestión comprende al menos 20, 25 o 30 nucleótidos.

La aplicación terapéutica consiste en el tratamiento o la prevención de la canicie prematura. La secuencia de ARNm es equivalente a la secuencia de ADNc de BNIPXLβ, ilustrada en la Figura 2B, como secuencia SEC ID N°: 2.

En el ámbito de la presente solicitud, durante la determinación del grado de identidad entre una secuencia de ARN y una secuencia de ADN, se considera que la guanina del ARN es equivalente a la timina del ADN; por consiguiente una secuencia de ADN proporcionada por un lado y la secuencia de ARN derivada de esta secuencia de ADN reemplazando las T por G, por otro lado, presentan una identidad del 100% en el sentido de la presente solicitud.

El ARNi mencionado anteriormente consiste preferentemente en un fragmento de ARN bicatenario, pudiendo encontrarse las dos secuencias emparejadas dentro de una misma molécula, formando así una estructura en horquilla, o bien dentro de dos moléculas distintas de ARN monocatenario.

Por tanto, la molécula que comprende la secuencia de ARNi puede estar constituida por un solo fragmento de ARN que se repliega o bien por dos moléculas de ARN. Esta molécula puede comprender otras secuencias, de ARN o de ADN, simple o bicatenario, de extremo 3' o 5' o de dos extremos de secuencias que se emparejan, o también entre las secuencias que se emparejan, por ejemplo, en el bucle para el caso en el que la molécula está constituida por una sola molécula de ARN que se empareja.

El ARNi mencionado puede ser un ARNip o un ARNhp. Preferentemente, la molécula que comprende la secuencia de ARNi es tal que puede escindir-se por la proteína Dicer para dar un ARNhp interferente con el ARNm de BNIPXLβ.

La presente invención también se refiere a la utilización de una molécula, tal y como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la canicie prematura en el ser humano.

La invención se refiere adicionalmente a procesos de selección y particularmente a un proceso de selección de moléculas que modulan la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta para identificar un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos en el campo de la pigmentación.

Un gen que codifica la proteína BNIPXLβ (o BNIPXL-beta) es, por ejemplo, el gen BMMCC1 (sinónimos BNIPXL,

KIAA0367), en el que uno de los números de acceso en las bases es ENSG00000106772 (conjunto génico ID). De este gen, por empalme alternativo, se producen al menos tres variantes; la isoforma 1 canónica que corresponde a un polipéptido de 2724 aminoácidos; la isoforma 3 que corresponde a BNIPXL-beta, polipéptido 732 aminoácidos que se diferencia esencialmente de la isoforma 1 canónica por la ausencia de los aminoácidos 1-1959.

5 La modulación de la expresión de un gen puede provenir particularmente de la modulación de su transcripción o de su traducción.

10 Una selección de acuerdo con el procedimiento de la invención permite por tanto detectar moléculas que impiden, inhiben o retrasan la transcripción y/o la traducción del gen, o bien que aumentan o disminuyen el nivel de transcripción y/o de traducción del gen, o bien que modifican las proporciones de los diferentes isómeros en la expresión del gen BMMCC1. Una molécula susceptible de ser identificada por la selección de acuerdo con la invención es por tanto, por ejemplo, una molécula que disminuye considerablemente la expresión de la isoforma 3 a favor de la isoforma 1 del gen BMMCC1.

15 Por aumento, disminución, modulación, inhibición o modulación, debe comprenderse variaciones de amplitud significativa, es decir, superiores al ruido y a la imprecisión de la medida, cuyas variaciones significativas, desde un punto de vista significativo, son superiores a la desviación típica.

20 Debe observarse que se diseña un procedimiento de selección de acuerdo con la invención especialmente para realizarse *ex vivo*, por ejemplo, en cultivos celulares. De manera preferente, se realiza *in vitro*.

Un procedimiento de acuerdo con la invención comprende preferentemente las siguientes etapas:

25 - poner la molécula a ensayar en presencia del gen que codifica BNIPXL-beta en condiciones que permitan la expresión de dicho gen en ausencia de la molécula a ensayar y
 - detectar una variación en el nivel de expresión de dicho gen o bien en la naturaleza de los productos de expresión de dicho gen, debido a la presencia de la molécula a ensayar.

30 Se entiende por "naturaleza de los productos de expresión", como se ha explicado anteriormente, por ejemplo, las proporciones respectivas de diferentes isoformas, o bien por ejemplo la aparición o la desaparición de una isoforma proporcionada.

35 Las moléculas a ensayar pueden ser de cualquier naturaleza química. Se trata preferentemente de moléculas de pequeño tamaño, susceptibles de atravesar las paredes celulares. Son moléculas particularmente preferidas las moléculas químicas artificiales que comprenden esencialmente los elementos C, H, O, N, eventualmente con los elementos Cl o F. Como alternativa, las moléculas a ensayar pueden ser moléculas biológicas, tales como proteínas, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ARNi, ARN antisentido, ribozimas, aptámeros, moléculas que son susceptibles de sintetizarse en el interior de una célula eucariota.

40 Las moléculas a ensayar particularmente preferidas son proteínas, ARNi, ribozimas o ARN antisentido que dirigen a BNIPXL β o dirigen al gen que codifica BNIPXL-beta, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra BNIPXL β , o bien los ARNi contra el ARNm correspondiente a BNIPXL β .

45 Las condiciones que permiten la expresión de dicho gen implican particularmente la presencia de diferentes enzimas necesarias, tales como la ARN polimerasa, nucleótidos y aminoácidos, ribosomas o cualquier otra estructura que permita la transcripción y la traducción de dicho gen. Estos diferentes elementos se encuentran, por lo general, naturalmente dentro de las células y deben añadirse si el procedimiento se realiza *in vitro*.

50 La detección de una variación en el nivel de expresión de dicho gen o bien en la naturaleza de los productos de dicho gen, después de la adición de la molécula a ensayar, puede realizarse por cualquier medio considerado como apropiado por el experto en la materia. Puede tratarse de la dosificación, por ejemplo dosificación enzimática o bien por la utilización de medios de detección basados en inmunología (dosificación inmunológica) o bien por cualquier otro medio conocido basado, por ejemplo, en las propiedades funcionales de los productos de expresión, sus propiedades físico-químicas (punto isoeléctrico, masa molecular, etc.), inmunológicas u otras.

55 Las proporciones de las diferentes isoformas pueden determinarse sobre el mismo principio. Particularmente pueden usarse diferentes anticuerpos que reconozcan específicamente una isoforma proporcionada y que no interaccionen con las otras isoformas.

60 En el ámbito de la presente invención, debe observarse que la modulación de la expresión particularmente buscada es una inhibición de la expresión, particularmente una inhibición de la transcripción o de la traducción del gen BMMCC1, o bien una disminución de la proporción de la isoforma 3 entre los productos de expresión del gen BMMCC1.

65

5 La inhibición puede ser total o bien parcial, en cualquier caso, implica una disminución de la producción del polipéptido BNIPXL β a partir del gen BMMCC1, siendo dicha disminución significativa desde un punto de vista estadístico. Se trata preferentemente de una disminución del nivel de expresión de BNIPXL β a partir del gen BMMCC1 de al menos el 20%, preferentemente de al menos el 35, o el 50% y preferentemente aún de una disminución superior al 60%.

10 Puede entenderse que un procedimiento tal como el descrito anteriormente comprende una o más etapas adicionales, anteriores, posteriores y/o intermedias. Se contempla particularmente, en el caso en el que el procedimiento permita detectar una molécula que module significativamente la expresión del gen BMMCC1, realizar una etapa de identificación de la molécula y después eventualmente la producción en cantidades más grandes de dicha molécula. También puede contemplarse ensayar otras moléculas diferentes de estructura más próxima a aquellas que permiten obtener una modulación de la expresión de dicho gen.

15 La presente invención también se refiere a un procedimiento de selección de moléculas capaces de modular la actividad del polipéptido BNIPXL-beta, para la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos en el campo de la pigmentación. Las moléculas a ensayar pueden ser de cualquier naturaleza como se ha explicado anteriormente o bien pueden ser totalmente artificiales o bien estar presentes naturalmente en los sistemas biológicos.

20 Al igual que el procedimiento de selección descrito anteriormente, este procedimiento de exploración se realiza preferentemente *ex vivo*, y preferentemente *in vitro*.

25 Por modulación de la actividad, se entiende cualquier modificación significativa de los parámetros que definen la actividad, particularmente la naturaleza de la selección y la velocidad de reacción en el caso de una actividad enzimática y la afinidad y avidéz en el caso de una interacción.

El carácter "significativo" de una modificación ya se ha explicado anteriormente, cuando el parámetro que se modifica es cuantificable.

30 Un procedimiento de selección tal y como el que se describe comprende preferentemente las siguientes etapas:

- poner la molécula a ensayar en contacto con el polipéptido BNIPXL-beta, en condiciones que permitan la detección de la actividad de dicho polipéptido en ausencia de la molécula a ensayar y
- detectar una variación en la actividad de dicho polipéptido debido a la presencia de la molécula a ensayar.

35 Las condiciones que permitan detectar la actividad de BNIPXL β implican particularmente la presencia de diferentes homólogos que interaccionen con BNIPXL β en el ámbito de esta actividad así como las condiciones físico-químicas adaptadas, tales como temperatura, carácter oxidante o reductor del medio.

40 Estos diferentes elementos y condiciones se encuentran naturalmente, por regla general, dentro de las células, o cuando menos de algunas, y deben añadirse o adaptarse si el procedimiento se realiza *in vitro*.

45 La actividad en la que se detecta una variación puede ser por ejemplo la interacción con DDX31, preferentemente con la forma larga.

50 El polipéptido BNIPXL-beta utilizado en el ámbito de este procedimiento es un polipéptido que tiene la secuencia SEC ID N°: 1 y que, preferentemente, ha sufrido las mismas modificaciones post-traduccionales que las de la proteína BNIPXL- β cuando esta se produce *in vivo* en las células humanas, que tienen particularmente el mismo perfil de glucosilación. Sin embargo, en el ámbito del procedimiento de la invención, además de polipéptidos que consisten en la secuencia SEC ID N°: 1, también puede contemplarse utilizar polipéptidos que tengan una secuencia no del todo idéntica a la SEC ID N°: 1, bien porque esta es más larga aunque contiene la SEC ID N°: 1, o porque es más corta porque comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N°: 1 o porque comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N°: 1 o una parte de la SEC ID N°: 1, preferentemente al menos un 95% de identidad, teniendo dicha parte preferentemente al menos 50 aminoácidos, o al menos 100 aminoácidos; las diferencias con respecto a la SEC ID N°: 1 pueden ser acumulativas. También se contempla utilizar un polipéptido cuyas modificaciones post-traduccionales no sean idénticas a las de la proteína BNIPXL- β producida una célula humana. En el caso en el que el procedimiento de selección de la invención se realice con una proteína que presente algunas modificaciones con respecto a la proteína BNIPXL- β humana natural, el experto en la materia sabrá que, en este caso, es importante confirmar la modulación observada por este procedimiento repitiendo el procedimiento con la proteína BNIPXL- β humana natural.

60 La detección de una variación en la actividad de dicho polipéptido, después de la adición de la molécula a ensayar, puede realizarse por cualquier medio considerado como apropiado por el experto en la materia. Puede detectarse un parámetro directamente relacionado con la actividad de dicho polipéptido (por ejemplo la aparición de un producto resultante directamente de la actividad enzimática de BNIPXL- β) o bien un parámetro indirectamente relacionado

con esta actividad, particularmente en el caso del desencadenamiento de cascadas enzimáticas.

5 Puede tratarse de dosificación, por ejemplo dosificación enzimática del producto de reacción, o por utilización de medios de detección basados en inmunología (dosificación inmunológica) de un complejo formado entre el polipéptido y su diana, pudiendo ser su diana DDX31, o bien cualquier otro medio conocido basado, por ejemplo, en las propiedades funcionales del producto resultante de la actividad del polipéptido, es decir, por ejemplo, propiedades fisicoquímicas (punto isoelectrico, masa molecular, etc...), inmunológicas, u otras de un polipéptido o complejo resultante de la actividad de BNIPXLβ.

10 De acuerdo con una realización preferida de este procedimiento de la invención, la modulación de la actividad de BNIPXLβ que se está buscando es una inhibición total o parcial de esta actividad.

Una inhibición parcial es preferentemente una inhibición de al menos un 10% de la actividad de dicho polipéptido por referencia al nivel de actividad antes de la adición de la molécula a ensayar.

15 De manera preferencial, la modulación de la actividad se realiza por secuestro de dicho polipéptido. De esta manera el polipéptido BNIPXLβ ya no está disponible para ninguna otra interacción salvo con la de la molécula secuestrante o bien se secuestra en un compartimento celular donde sus homólogos de interacción están ausentes. El experto en la materia puede definir, sobre la base de la estructura y de la secuencia de BNIPXL-β, las moléculas o las condiciones susceptibles de tener el efecto del secuestro buscado.

25 Para la realización del procedimiento de la invención tal como se describe, es particularmente ventajoso utilizar, como moléculas a ensayar, anticuerpos dirigidos contra el polipéptido BNIPXL-beta o contra una parte del mismo. Estos programas permiten definir qué parte de BNIPXL-beta es susceptible de ser inmunógena y por tanto permite la obtención de anticuerpos. Por otro lado, actualmente la tecnología de anticuerpos, monoclonales y policlonales, está bien desarrollada, así mismo en lo que respecta a la humanización de anticuerpos murinos, lo que permite al experto en la materia producir sin esfuerzo y ensayar rápidamente una gran cantidad de moléculas de esta categoría en un procedimiento según la invención.

30 Como ya se ha mencionado anteriormente, los procedimientos de selección, tales como los descritos en la presente invención, pueden comprender ventajosamente una o más etapas adicionales además de las ya mencionadas, particularmente etapas anteriores, posteriores y/o intermedias.

35 Para los dos tipos de procedimientos de selección que se han descrito, el objetivo es la identificación, entre las moléculas ensayadas, de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación. La pigmentación es por tanto en cuestión la pigmentación del cabello.

40 La presente invención también se refiere a diversas utilidades, particularmente la utilización de agentes que se han seleccionado por los procedimientos anteriormente descritos, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación, bien con fines terapéuticos, de tratamiento o prevención, en el campo de la pigmentación.

45 La presente invención también trata la utilización de un agente que modula la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación, así como la utilización de un agente que modula la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta, para la fabricación de un medicamento para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación.

50 La definición de lo que es preciso entender por las expresiones "modular la expresión" ya se ha proporcionado en el ámbito de los procesos de selección de la invención. Este término incluye particularmente la modulación de la transcripción y la modulación de la traducción del gen en cuestión. La modulación es preferentemente una disminución, o una inhibición, total o parcial, de dicha expresión, transcripción o traducción, del gen.

55 Un agente corresponde a cualquier tipo de moléculas químicas, naturales o artificiales. Los agentes particularmente preferidos son los que son susceptibles de ser identificados o que se han identificado por un procedimiento de selección según la invención tal como se ha descrito anteriormente, es decir, un procedimiento de selección de moléculas que modulen la expresión del gen que codifica BNIPXL-β. La presente solicitud se refiere adicionalmente a un agente que modula la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta, para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación. También se describen las utilidades de un agente que modula la actividad de un polipéptido derivado de la traducción del gen que codifica BNIPXL-beta, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación, así como la utilización de un agente que modula la actividad de un polipéptido derivado de la traducción del gen que codifica BNIPXL-beta, para la fabricación de un medicamento para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación.

65 Preferentemente, un polipéptido derivado de la traducción del gen que codifica BNIPXL-beta es justamente BNIPXL-beta.

La definición de lo que es preciso entender por las expresiones “modular la actividad” ya se ha proporcionado en el ámbito de los procedimientos de selección de la invención. La modulación es preferentemente una disminución o una inhibición, total o parcial, de dicha actividad.

5 Un agente que modula la actividad de un polipéptido derivado de la traducción del gen que codifica BNIPXL-beta, puede ser cualquier tipo de molécula química, natural o artificial. Los agentes particularmente preferidos son los que son susceptibles de ser identificados o que se han identificado por un procedimiento de selección según la invención tal y como se ha descrito anteriormente, es decir, un procedimiento de selección de moléculas capaces de modular la actividad del polipéptido BNIPXL-beta.

10 La presente solicitud de divulgación describe adicionalmente un agente que modula la actividad de BNIPXL-beta, para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación.

15 De acuerdo con otro aspecto, la invención también se dirige hacia la utilización de al menos un fragmento polinucleotídico que comprende al menos 18 nucleótidos consecutivos cuya secuencia corresponde a todo o parte del gen que codifica BNIPXL-beta o del transcrito de BNIPXL-beta, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación.

20 El fragmento polinucleotídico al cual se hace referencia en el ámbito de la invención corresponde a un fragmento de un cromosoma. Este fragmento tiene una longitud mínima de 18 nucleótidos y una longitud máxima que puede ir hasta la longitud total del gen que codifica BNIPXLβ. Preferentemente, el fragmento tiene una cantidad de nucleótidos superior a 18. Una longitud particularmente preferida está comprendida entre 18 y 10.000 nucleótidos, preferentemente entre 30 y 8.000 nucleótidos.

25 De acuerdo con variantes preferidas de la invención, se hace referencia a fragmentos cuya longitud está comprendida entre 30 y 5.000 nucleótidos, preferentemente entre 50 y 3.000 nucleótidos, por ejemplo entre 100 y 2.000 nucleótidos, o entre 200 y 1.000 nucleótidos. Los autores de la presente invención han detectado la interacción entre el polipéptido BNIPXLβ y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31, estando esta interacción implicada en el fenómeno de la canicie prematura. La presente invención también se refiere por tanto a procedimientos de selección de moléculas que modulan la interacción entre un polipéptido BNIPXL-beta y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 que permiten la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación.

30 Las diferentes utilizaciones cosméticas o terapéuticas en el sentido de la presente invención ya se han detallado, así como lo que es necesario entender para el dominio de la pigmentación, es decir principalmente la pigmentación de faneras, preferentemente las del cabello. Por modulación de interacción se entiende una modificación de los parámetros que caracterizan esta interacción, y más particularmente la afinidad. Por modulación se entiende una variación significativa desde un punto de vista estadístico.

35 Un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 corresponde a la forma larga (1-851) o corta (1-585) de DDX31. Preferentemente, se trata de la forma larga de DDX31.

40 Según una realización preferida dicha modulación es una alteración de la asociación entre los dos polipéptidos, preferentemente una alteración total.

45 Según otra realización de selección, la modulación que se busca es una modificación de la constante de asociación entre los dos polipéptidos. Como se ha indicado anteriormente, por modificación de la constante de asociación se entiende una variación significativa de esta constante, desde un punto de vista estadístico.

50 Preferentemente, para realizar el procedimiento, es posible identificar un agente que sea un inhibidor competitivo de la asociación entre los dos polipéptidos.

55 Mediante este procedimiento, es por tanto posible detectar agentes que modulen la interacción entre BNIPXLβ y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 por ejemplo uniéndose a BNIPXLβ e impidiendo de esta manera su interacción con dicho polipéptido, o bien uniéndose al polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 e impidiendo de esta manera su interacción con BNIPXLβ.

La presente invención incluye también los agentes identificados mediante el procedimiento anteriormente descrito.

60 Un agente que modula la interacción entre BNIPXL-beta y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31, tal como se define en el ámbito de la presente invención, puede contemplarse en una aplicación cosmética o terapéutica, preferentemente en el campo de la pigmentación. Dicho agente puede identificarse o se identifica mediante el procedimiento de selección descrito anteriormente.

65 La divulgación también describe la utilización de un agente que modula la interacción entre BNIPXL-beta y un

polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31, para la fabricación de un medicamento para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación.

5 Son agentes preferidos, capaces de modular dicha interacción, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, preferentemente dirigidos contra BNIPXL β o contra un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales; preferentemente, se trata de anticuerpos monoclonales.

10 Para todas las utilizaciones o aplicaciones de acuerdo con la invención en el campo de la cosmética, el polipéptido, la molécula, el agente o el fragmento polinucleotídico que se usa, puede estar acondicionado bajo diferentes formas apropiadas, sólo o en combinación con otros agentes. En particular, son formas preferidas las destinadas a las aplicaciones locales y éstas se refieren a cremas, lociones, geles, emulsiones, pomadas y champús. También pueden contemplarse otras formas para las utilizaciones de acuerdo con la invención, en particular en forma de píldoras para una administración oral.

15 En todas las diferentes intenciones cosméticas en el ámbito de la presente invención, un dominio particularmente preferido es el de la pigmentación. La pigmentación puede ser de la piel o bien de las faneras. Puede tratarse tanto del color de la pigmentación como de la ausencia de pigmentación; los problemas en cuanto a la calidad y a la intensidad de la pigmentación también conciernen a la presente invención.

20 En particular, el objeto de la invención se relaciona con la utilización de al menos un polipéptido, molécula, agente o fragmento polinucleotídico tal como se ha definido anteriormente, para prevenir y/o limitar y/o limitar el desarrollo de la canicie.

25 El objeto de la invención también se relaciona con la utilización de al menos un polipéptido, molécula, agente o fragmento polinucleotídico tal como se ha definido anteriormente, para favorecer la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco.

30 Otro objeto de la presente invención se relaciona con un procedimiento de tratamiento cosmético de la canicie caracterizado porque sobre la zona a tratar se aplica una composición que comprende al menos un polipéptido, una molécula, un agente o un fragmento polinucleotídico, tal como se ha definido anteriormente.

35 La invención también se relaciona con un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a favorecer la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco, caracterizado porque sobre la zona a tratar se aplica una composición que comprende al menos un polipéptido, una molécula, un agente o un fragmento polinucleotídico, tal como se ha definido anteriormente.

Las zonas a tratar pueden ser, por ejemplo y sin ninguna limitación, el cuero cabelludo, las cejas, el bigote, la barba y/o todas las áreas pilosas el cuerpo.

40 Más particularmente, los procedimientos de tratamiento de la canicie y de pigmentación natural del cabello y/o pelo gris o blanco consisten en aplicar una composición que comprende al menos un polipéptido, una molécula, un agente o un fragmento polinucleotídico, tal como se ha definido anteriormente.

45 En lo que respecta a las diferentes utilizaciones o aplicaciones terapéuticas de la invención, debe observarse en efecto que las afecciones en cuanto al sistema de pigmentación, ya sea el de la piel o el de las faneras, puede tener graves consecuencias sobre la salud de las personas afectadas. En efecto, la pigmentación de la piel desempeña la función de barrera protectora frente a las agresiones lumínicas, en particular, las personas que padecen albinismo carecen de protección frente a los rayos solares lo que para ellos constituye un peligro importante. Otras afecciones que comprometen la pigmentación también conciernen a la presente invención.

50 En el ámbito de las utilizaciones terapéuticas y cosméticas que tienden a modificar una característica de la pigmentación, se trata preferentemente de la pigmentación de la piel. De acuerdo con otros casos contemplados por la presente invención, el tipo de pigmentación que debe modificarse concierne a la pigmentación de faneras, en particular las uñas o el pelo. De acuerdo con un caso particular preferido de la presente invención, la pigmentación que se busca para modificar las características es la del sistema piloso en general y en particular la de la cabellera, bigote y cejas. La presente invención permite modificar el fenómeno de detención de la pigmentación del cabello, es decir la canicie, en particular cuando esta aparece de manera prematura en una persona y cuando se habla de canicie prematura.

60 Para todas las utilizaciones en terapéutica, los productos activos que se incorporan en la composición de un medicamento están preferentemente asociados con excipientes farmacéuticamente aceptables. En el ámbito de la invención, pueden utilizarse todas las vías de administración consideradas como aceptables, en particular la vía intradérmica, intravenosa, muscular, oral, ótica, nasal, óptica. La formulación está preferentemente adaptada a la vía de administración seleccionada.

65 Las utilizaciones para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la invención pueden comprender, en su formulación, otros principios activos. Incluso, la administración de un medicamento como se define en la invención,

puede combinarse con la administración de otro medicamento, de manera que esta administración sea simultánea, secuencial o individual.

Incluso, los diferentes polipéptidos, moléculas, agentes o fragmentos polinucleótidos tales como los definidos anteriormente, que se utilizan en el ámbito de las utilidades en terapia, pueden combinarse e introducirse en la composición de un solo medicamento o también pueden servir para la fabricación de diferentes medicamentos. En particular, si se introducen en la composición de distintos medicamentos, pueden administrarse a diferentes frecuencias y/o a distintos momentos.

De manera particularmente preferida, las aplicaciones terapéuticas o cosméticas contempladas en el ámbito de la presente invención conciernen a la prevención o al tratamiento de la canicie y más particularmente a la canicie prematura.

La presente invención también concierne a procedimientos de diagnóstico de una predisposición a la canicie prematura. En efecto, la canicie prematura es un fenotipo que los autores de la invención han definido como que está, entre otras cosas, caracterizado por la aparición prematura de los primeros cabellos blancos y preferentemente hacia los 18 o 20 años. Como este fenotipo se transmite a la siguiente generación, para los individuos cuyo progenitor o allegado está afectado, puede parecer importante determinar, antes de la aparición de los síntomas, si estarán o no afectados. El procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención está perfectamente adaptado a individuos con una edad menor de 18 años, o menor de 20 o 25 años.

Como es muy probable que los factores ambientales jueguen un papel en el fenotipo "canicie" así como en el de "canicie prematura", gracias a los procedimientos de la invención, se trata de evaluar los riesgos de desarrollar dicho fenotipo, es decir, de una predisposición a la canicie prematura hereditaria.

En particular, la invención se dirige hacia un procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la canicie prematura en un individuo, que comprende las siguientes etapas:

- dosificación del nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta a partir de una muestra corporal procedente de dicho individuo, y
- comparación a un nivel de referencia.

La muestra corporal puede ser sangre, siendo una sola gota suficiente para realizar un procedimiento de acuerdo con la invención. En el ámbito de la invención pueden utilizarse otras muestras corporales tales como cabello, pelo, orina o sudor. También puede contemplarse utilizar algunas células procedentes del individuo. El experto en la técnica sabrá determinar qué muestra podrá utilizarse en el ámbito de este ensayo, reduciendo al mínimo las molestias para dicho individuo. Preferentemente, la muestra corporal utilizada en el procedimiento de diagnóstico descrito comprende o está constituida por células melanocitarias.

Los procedimientos de la invención no están limitados a las dos etapas descritas y pueden contener una o más etapas anteriores, posteriores y/o intermedias distintas a las de las dos etapas mencionadas.

El nivel de referencia es un valor que refleja el nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta en los individuos notoriamente exentos de una predisposición a la canicie prematura. A la inversa, por supuesto es posible definir como nivel de referencia un nivel que refleje el nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta en los individuos notoriamente afectados por canicie prematura o bien predispuestos a tal afección.

Leyenda de las figuras

FIG. 1: parámetros clínicos para la atribución del fenotipo canicie prematura en los individuos sometidos a ensayo. La Figura 1 ilustra la escala de referencia para el índice clínico canítico.

FIG. 2 (2A y 2B): secuencias relativas a la proteína BNIPXLβ.

La Figura 2A ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína BNIPXLβ, que corresponde a la SEC ID N°: 1.

La Figura 2B ilustra la secuencia nucleotídica del transcrito (ADNc) que corresponde a la SEC ID N°: 2; la parte estrictamente codificante se indica en mayúsculas (que codifica de 163 a 2361).

Sección experimental:

Significado de los acrónimos utilizados:

- CNC: región conservada no codificante («conserved non coding»),
- IVS: región intrónica («intervening sequence»),
- SNP: polimorfismo de un único nucleótido («single nucleotide polymorphism»).

Introducción

La canicie en el hombre es un rasgo físico corriente fuertemente ligado al envejecimiento. En la población europea,

la canicie comienza generalmente hacia los 45 a 55 años comenzando por las entradas.

Ya se han constatado síndromes monogénicos en el hombre con un proceso de blanqueamiento prematuro del cabello (o canicie prematura) de manera localizada. El piebaldismo, por ejemplo, que es un rasgo asociado al síndrome de Waardenburg, se caracteriza por un blanqueamiento de la zona frontal de manera prematura y ya se ha asociado con los genes *PAX3* y *MITF* en los cromosomas 3 y 2 respectivamente (Baldwin et al, 1994 et Tassabehji et al, 1994).

Además, frecuentemente se ha observado que el blanqueamiento prematuro del cabello era un carácter hereditario. El inicio de la canicie se produce en la infancia; aparece antes de los 25 años y en algunos casos antes de los 18 años. La canicie prematura se ha descrito como que está asociada a determinadas afecciones autoinmunitarias tales como la anemia de Biermer o la tiroiditis. Los autores de la presente invención han identificado alelos relacionados con un riesgo de predisposición a la canicie prematura (CP). Utilizando análisis de relación y asociación para muestras de cohortes de familias seleccionadas y de controles, se ha podido identificar una variable dentro de la región cromosómica que comprende los genes *DDX31* y *GTF3C4* en el cromosoma 9q. Además, usando análisis doble híbrido en levaduras, los autores de la invención también han podido detectar la implicación funcional de la proteína *DDX31* en la cascada responsable de la pigmentación de las faneras y la de la proteína *BNIPXL-β*.

Resultados

Determinación del fenotipo

En este estudio, el fenotipo “canicie prematura” (CP) se atribuyó únicamente a individuos (i) que presentaban cabellos blancos antes de 25 años y (ii) cuya mitad de la cabellera era gris a los 30 años y que (iii) presentaban antecedentes familiares de CP.

Estas características se evaluaron según una muestra clínica para obtener, para cada individuo, una puntuación fenotípica global (fuerte para las puntuaciones de 5 y 4, media para las puntuaciones de 3 y 2 y débil para una puntuación de 1; véase la Fig. 1 que define el índice de canicie prematura y la Tabla 1).

Tabla 1: Método de atribución de puntuación clínica para la canicie prematura.

| Para cada individuo, se determinaron los tres parámetros. La puntuación fenotípica global se obtuvo sumando cada uno de los parámetros. | | |
|---|---------------------|------------|
| Parámetros clínicos | | Puntuación |
| Inicio del blanqueamiento | Antes de 18 años | 2 |
| | Antes de 25 años | 1 |
| Blanqueamiento significativo de toda la cabellera a los 35 años | Índice de canicie 3 | 2 |
| | Índice de canicie 2 | 1 |
| Carácter hereditario | sí | 1 |
| | no | 0 |

Análisis de relación en 12 familias:

Para el estudio de relación sobre el genoma global utilizando marcadores microsatélite, se incluyeron 12 familias que comprendían 95 individuos (30 afectados de CP, 51 no afectados y 11 con fenotipos inciertos) sobre la base de cálculos de potencia de sus pedigríes. Estos trabajos se describen más particularmente en las solicitudes WO04/007742 y FR2 865 217.

En el cromosoma 9, los autores de la invención han determinado un intervalo de relación en la posición 9q31-qter, entre los marcadores D9S290 y D9S158, con una puntuación Lod máxima en la posición 151cM para el marcador D9S158.

Estudio de asociación

Se realizó un estudio de asociación (afectado con respecto al control) sobre el ADN de un grupo de individuos afectados de CP (puntuaciones 3-5) y sin relación entre ellos y un grupo de controles. Este estudio ha permitido detectar 33 SNP en el cromosoma 9 (los SNP rs2096071 a rs1378955) que muestran una frecuencia alélica diferente entre los individuos afectados de CP y los individuos controles (ensayo de Chi-2, p<0,05).

La siguiente etapa fue el genotipificado individual de los SNP positivos en el cromosoma 9 cuya frecuencia alélica difería sensiblemente entre los afectados y los controles. Los autores de la invención también detectaron 4 SNP que tenían valores p significativos (véase la Tabla 2).

Tabla 2: Los SNP del cromosoma 9q34 muestran una asociación significativa con la canicie prematura.

| Nombre del SNP | Valor p |
|----------------|-----------------------|
| rs306534 | $4,25 \times 10^{-3}$ |
| rs3739902 | 6×10^{-5} |
| rs575916 | $3,5 \times 10^{-3}$ |
| rs365297 | 2×10^{-3} |

5 Por otra parte, el haplotipo "B86-92" (rs418320 y rs25260008) muestra una asociación significativa ($p=0,0057$) con el rasgo CP. Esta región "B86-92" se ha reducido con la adición de 35 SNP complementarios. El SNP rs3739902, localizado en el intrón 3 del gen DDX31 (IVS3+268), parece ser el más significativo ($p=6 \times 10^{-5}$).

10 El haplotipo HAP86-88 es también particularmente significativo, se define por los SNP: rs3739902, rs2583805 y rs377090. El valor estadístico p de asociación de este haplotipo con la canicie prematura es inferior a 10^{-6} .

15 Los autores de la invención observaron un bloque importante en desequilibrio en el conjunto de la región que comprendía los SNP positivos. Dos genes_ DDX31, un miembro de la familia proteica de las helicasas con motivo DEAD y GTF3C4, un factor de transcripción potencial_ se encontraban dentro de este bloque en desequilibrio de relación.

Estos trabajos se describen más ampliamente en las solicitudes WO04/007742 y FR2 865 217.

Análisis de secuencia de genes candidatos y de regiones conservadas no codificantes en la región comprendida en el haplotipo HAP86-88.

20 Se secuenciaron los exones, sitios de empalme, las regiones 5' no traducidas (5' UTR) y las regiones conservadas no codificantes en la región del haplotipo HAP86-88 para una selección de ADN de individuos afectados. En los individuos afectados de canicie prematura se identificaron seis variantes a nivel de la región codificante y cuatro variantes intrónicas próximas a un sitio de empalme (véase la Tabla 3).

25 **Tabla 3:** Variantes identificadas durante el análisis de secuencia de los genes DDX31 y GTF3C4, en 12 individuos afectados de canicie prematura.

| gen | localización | Exón/intrón | variante de ADN | Significado funcional |
|--------|--------------|-------------|----------------------|---------------------------|
| DDX31 | exón | 2 | c.413G>A | sinónimo |
| | intrón | 3 | c.723+15G>C | significado desconocido |
| | intrón | 4 | c.767+15_17delCTC | significado desconocido |
| | intrón | 4 | c.767+55C>T | sinónimo, SNP rs4498679 |
| | intrón | 11 | c.1176-16_13 delCTTA | significado desconocido |
| | exón | 13 | c.1674C>T | sinónimo, SNP rs306537 |
| | exón | 20 | c.2398G>A | p.Ala800Thr |
| | exón | 20 | c.2395A>G | p.Ile799Val, SNP rs306547 |
| GTF3C4 | exón | 1 | c.36G>A | sinónimo |
| | exón | 3 | c.1560A>G | sinónimo |

30 La variante p.Ile799Val (c.2395A>G, conocida como SNP rs306547), se encontró en 6 de las 12 secuencias de ADN de los individuos afectados en estado heterocigoto y 6 afectados, en estado homocigoto (p.V799). El 2º cambio antisentido p.Ala800Thr (c.2398G>A) se encontró en el estado heterocigoto en un individuo afectado. Para calcular el posible efecto de esta variante, los autores de la invención analizaron una población más grande de individuos afectados (62) y controles (64). No se encontró ningún otro portador de esta mutación, ni en personas afectadas de CP, ni en los controles. Dado que el resto A800 no se ha conservado durante la evolución de los mamíferos, ya que

35 el resto homólogo en el ratón es la treonina, como en la variante p.A800T, en lugar de la alanina en el gen humano, este acontecimiento es muy probablemente silencioso desde un punto de vista biológico.

40 Otra variante detectada es la delección de CTC en el motivo constituido de la repetición CTCCTC en el intrón 4 del gen DDX31 (IVS4+15_17delCTC).

No se ha detectado ninguna variante en la secuencia intergénica situada en las dos regiones 5'UTR (regiones no

traducidas) de los genes GTF3C4 y DDX31, que están orientadas (“al revés”) con respecto a los codones ATG.

En el gen GTF3C4, los autores de la invención han identificado dos variantes exónicas (exones 2 y 3).

- 5 Los autores de la invención también analizaron 20 secuencias conservadas y no codificantes (CNC) dentro de este locus. Entre ellas, se ha identificado una sola variante, transición c.2141-2018C>T, también conocida, como SNP rs509762, situada en el intrón 18 del gen DDX31 (posición 134479481, NCBI build126). La comparación de las frecuencias genotípica y alélica ha mostrado que el genotipo CP estaba sobre representado en los individuos afectados con una puntuación de 5 (45% en afectados de canicie prematura con respecto al 32% para los controles).
10 Esta región conservada no codificante CNC está conservada en el ratón, pollo y en el pez globo fugu.

Doble híbrido en levaduras

- 15 Para investigar un poco más la implicación biológica de DDX31 como gen de la canicie prematura y GTF3C4, los autores de la invención utilizaron la tecnología denominada “doble híbrido” (o dos híbridos) de levaduras para determinar posibles compañeros de interacción con las isoformas tales como los transcritos de estos genes.

- 20 Brevemente los ADNc de las formas larga (variante 1 completa, aminoácidos 1-851) y corta (variante 2, trunca en la parte C-terminal, aminoácidos 1-586) de DDX31 se amplificaron por reacción de polimerización en cadena a partir de ARNm de melanocito humano y se clonaron en dos tipos de vectores, en pB27 (LexA, fusión en C-terminal) y pB6 (Gal4, fusión en C-terminal). La variante 2 de DDX31 codifica un polipéptido de 585 aminoácidos que es una forma trunca en la región C-terminal codificada por los exones 16 a 20 de la variante 1.

- 25 Estas construcciones se utilizaron como cebos para explorar una biblioteca de presas (10⁷ clones independientes) específicas de melanocito humano. Como cebo, en las mismas condiciones, también se utilizó el ADN único de GTF3C4.

- 30 La clonación de los cebos, la construcción de la biblioteca y el establecimiento de mapas de interacción se confiaron a la sociedad Hybrigenics (París, Francia). El análisis de las interacciones se realizó usando un programa informático PMRider® según los procedimientos descritos en Rain J.C. et al., 2001.

Para las variantes 1 y 2 de DDX31, con las construcciones pB27, se ensayaron, respectivamente, 1,90.10⁶ y 38.10⁶ interacciones y con las construcciones pB6 se ensayaron las interacciones 45.10⁶ y 119.10⁶.

- 35 Entre las 21 proteínas que posiblemente interactúan con la variante 1 de DDX31 y las 15 proteínas que posiblemente interactúan con la variante 2 de DDX31, se identificó a PAX3 como una proteína susceptible de interactuar con DDX31, con una puntuación biológica prevista en la clase “E” (PBS® “predicted biological score” definida y determinada por el programa informático PMRider®). Esta interacción se identificó con las dos formas, larga y corta de DDX31. Esta interacción está centrada sobre el dominio denominado “homeobox” DEAD de la proteína PAX3. Debe observarse que se sabe que las mutaciones en la proteína PAX3 están asociadas al síndrome de Waardenburg de tipo 1.
40

- 45 Para GTF3C4 también se identificó una interacción significativa con el gen PAX3. De manera sorprendente e inesperada, los autores de la invención también detectaron que la proteína BNIPXL-beta (proteína 2 que interactúa con BC12/proteína de 19 kDa del adenovirus E1B) era una presa de la forma larga de DDX31, (variante 1). La puntuación de confianza, tal como define el programa, era “C” (buena confianza en la interacción), con la variante 1 de DDX31. En la Tabla 4 se muestran los resultados.

Tabla 4: (*) según Rain et al., 2001

50

| Nombre de la proteína (cebo) | Longitud del cebo (AA) | Nombre de la proteína (presa) | Puntuación biológica global PIM® (*) | Actividad biológica |
|---|------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| DDX31 Forma larga (exones 1-20) NM 022779 | 1-852 | PAX3 | E | Factor de transcripción del gen 3 dominio relacionado Mutaciones asociadas al síndrome de Waardenburg de tipo 1. |
| DDX31 Forma corta (exones 1-15) NM 138620 | 1-585 | PAX3 | E | ídem |

| Nombre de la proteína (cebo) | Longitud del cebo (AA) | Nombre de la proteína (presa) | Puntuación biológica global PIM® (*) | Actividad biológica |
|--|------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| DDX31 Forma larga (exones 1-20) NM_022779 | 1-852 | BNIPXLβ | C | Proteína que interacciona con Bcl2 y la proteína de 19 kDa de adenovirus E1B. Implicada en la supresión de la muerte celular |

DISCUSIÓN

5 La canicie prematura representa un estado clínico particularmente informativo en la comprensión de las bases genéticas relacionadas con el blanqueamiento del cabello, un rasgo generalmente asociado con el envejecimiento.

10 Después de un estudio de asociación, los autores de la invención han detectado un locus de relación con la CP en el cromosoma 9. Los análisis de asociación con los SNP han permitido reducir el intervalo de relación inicialmente de 10 Mpb con una región mucho más pequeña de aproximadamente 100 kpb. Esta región está organizada como un solo bloque en desequilibrio de relación que contiene dos genes: DDX31 y GTF3C4.

15 Considerando que la canicie prematura podría ser un rasgo probablemente multigénico, y que este locus se ha obtenido incluso siendo limitado el número de individuos afectados analizados, se puede llegar a la conclusión de que, según todas las apariencias, este locus es susceptible de jugar un papel principal en la canicie prematura.

20 Debe observarse que los resultados de la estrategia doble híbrido revelaron que BNIPXLβ era una presa común de las isoformas alternativas larga y corta de DDX31. BNIPXLβ es además un factor implicado en el proceso de apoptosis (Vegeto et al, 1999).

25 La secuenciación de las secuencias codificantes, de empalme y conservadas no codificantes (CNC) del ADN de 12 individuos afectados de CP con los fenotipos más rigurosos, ha permitido identificar diversas variantes. En DDX31, la variante p.Ala800Thr en el exón 20, no inscrita en el repertorio como polimorfismo, podría estar en el origen de un efecto funcional relacionado con la canicie prematura. La variación IVS4+15_17delCTC se sitúa en una región no conservada entre los mamíferos y no se ha previsto que esta región pueda alterar el empalme del intrón 4 (análisis denominado "splice-view"). Esta variante podría estar asociada con la variación genética responsable del rasgo fenotípico.

30 La variación dentro de CNCs8, en el intrón 18 del gen DDX31 presenta un mejor potencial fenotípico debido a que se sitúa en una parte de secuencias que se consideran muy conservadas en el ratón (sin espacio, sin cambio sobre una sobre una distancia de 100 pares de bases). De manera interesante, la estrategia doble híbrido ha permitido demostrar que DDX31 y GTC3C4, ambos situados en la región implicada en la canicie prematura, tienen una interacción común con PAX3, proteína que desde hace tiempo se sospecha que forma parte del proceso de pigmentación.

35 También debe observarse que DDX31 codifica una helicasa. El síndrome de Werner, que corresponde a un estado de envejecimiento acelerado en el que se observa un blanqueamiento prematuro del cabello, se ha descrito que el gen responsable codifica una helicasa (WRN) (Yu et al, 1996).

40 De manera sorprendente e inesperada, los autores de la invención han descubierto que BNIPXL-beta (proteína 2 que interacciona con BCl2/proteína de 19 kDa del adenovirus E1B) era una presa de DDX31. La puntuación de confianza en la interacción es particularmente buena.

45 La interacción entre DDX31 y BNIPXL-beta es por tanto probablemente importante en la circulación vesicular, de ahí un papel en la migración y en la transferencia de melanosomas y por tanto en la canicie y en la canicie prematura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos afectados, estudio de relación y Estudio de asociación

50 La elección de los individuos y su clasificación se realizaron como se indica en las solicitudes FR2842104, FR2853532, FR2865217 y el documento WO04/007742.

55 En estas solicitudes de patente también se han descrito estudios de relación y asociación así como en los resúmenes de Blouin *et al*, 2006 y de Lacharrière *et al*, 2007.

Como recordatorio, en una primera etapa, los autores de la invención han genotipificado muestras reagrupando los ADN de individuos afectados con respecto a los controles emparejados para una selección de los SNP comprendidos en el intervalo del cromosoma 9 mostrando una relación significativa con el rasgo canicie prematura.

5 La región correspondiente al intervalo de relación en el cromosoma 9q34 se ha definido entre los marcadores SNP rs2096071 y rs1099298 (Entre las posiciones 123'405'258 pb y 132'547'291 pb, expresadas en función de la versión de 2001 (es decir NCBI Build28); entre las posiciones 130'565'549 y 139'556'369 según la versión 37; genome.cse.uscsc.edu).

10 Se considera que un SNP determinado es "positivo" si muestra una desviación significativa en la frecuencia de los alelos. Para la fase de genotipificado individual se selecciona cada región que cumple al menos una de las siguientes condiciones: (i) al menos 2 SNP positivos contiguos y (ii) 2 SNP positivos separados por un solo SNP negativo.

15 Para ensayar la asociación de los SNP seleccionados con el fenotipo CP en cada ADN genotipificado individualmente (fase 2 del análisis), los autores de la invención han comparado la frecuencia alélica o la frecuencia genotípica de cada SNP en las poblaciones de afectados y de controles.

20 Para registrar cualquier variación genética de esta región, los autores de la invención también procedieron a un análisis de haplotipo, utilizando una ventana móvil (que siempre comprendía 5 SNP, con un incremento de 1), para reconstruir eficazmente el haplotipo.

Secuenciación:

25 El ADN de los individuos afectados de CP se amplificó a nivel de los exones de los genes GTF3C4 y DDX31, de la pequeña región intergénica entre estos genes, y a nivel de las regiones que comprendían las secuencias CNC que presentaban al menos un 70% de identidad entre el hombre y el ratón (sin espacio) y se secuenció por los métodos clásicos.

Doble-híbrido:

30 La clonación de cebos, la construcción de la biblioteca y el establecimiento de mapas de interacción se confiaron a la sociedad Hybrigenics (París, Francia). El análisis de las interacciones se realizó usando un programa informático PMRider® según los procedimientos descritos en Rain J.C. et al., 2001. Las variantes de empalme larga y corta de DDX31 (números de acceso a GenBank NM_022779 y NM_138620, respectivamente) la proteína STX17 humana (números de acceso a GenBank NM_017919) se clonaron en pB27 en fase con LexA y en pB6 en fase con el dominio de unión al ADN de Gal4. Las cuatro posiciones se utilizaron como cebo explorar una biblioteca de ADNc específico de melanocito humano, construido en pP6. Los plásmidos pB27, pB6 y pP6 derivaron de los plásmidos pBTM116 (Vojtek y Hollenberg, 1995), pAS2ΔΔ (Fromont-Racine et al., 1997) y pGADGH (Bartel et al, 1993), respectivamente.

45 Para cada cebo se exploró una media de 73 millones de clones (7 veces la complejidad de la biblioteca), utilizando una estrategia de cruzamiento con cepas de levaduras L40-Gal4 (mat a) e Y187 (mat α) como se ha descrito anteriormente en (Fromont-Racine et al., 1997). Se seleccionaron colonias His+ sobre un medio sin triptófano, leucina e histidina. Los fragmentos de presas de clones positivos se amplificaron por PCR y se secuenciaron en sus uniones 3' y 5' sobre un secuenciador PE3700. Las secuencias resultantes se utilizaron para identificar las proteínas de interacción correspondientes en el banco de datos GenBank (NCBI), utilizando un procedimiento totalmente automatizado. A cada interacción se le atribuyó una puntuación de confianza de la manera ya descrita (Formstecher et al., 2005).

50 La puntuación local es la probabilidad de obtener un dominio de interacción determinado ("Selected interacting domain", SID®) realizando la hipótesis de igualdad de probabilidades, es decir debida al ruido aleatorio. Se puede deducir, combinando las probabilidades p (utilizando una ley binomial) de cada uno de los fragmentos independientes que lo define. Después de poner en común los resultados de cada selección, para cada una de las proteínas de interacción, se calcula una puntuación (global) biológica prevista ("PBS"). Realizando la hipótesis de independencia de acontecimientos, las puntuaciones de las diferentes selecciones se combinaron a la vez cuando resultaba afectado el mismo par de dominios proteicos. La PBS resultante representa por tanto la probabilidad de que una interacción proteína-proteína determinada se deba al ruido.

60 Las puntuaciones son números reales, comprendidos entre 0 y 1, pero en la práctica se reagruparon en cuatro categorías (clases A, B, C y D). Finalmente, se analizó la conectividad global del mapa de interacción para etiquetar por separado (categoría E) los SID (dominio de interacción seleccionado) encontrados como una presa a una frecuencia superior a un umbral fijo: la PBS de cada interacción proteína-proteína que implicaba los SID muy fuertemente relacionados se fijó a 1. A la vez, los umbrales entre las categorías y el umbral de fuerte relación se definen manualmente, teniendo en cuenta la naturaleza del organismo estudiado, la biblioteca utilizada y la presente cobertura del proteoma ($A < 10^{-6}$; $B < 10^{-5}$; $C < 10^{-2.5}$; D ; la categoría E corresponde a presas SID seleccionadas con

más de cuatro cebos y se atribuyó de manera arbitraria el valor 1.

La presente solicitud concierne más particularmente a los puntos u objetos siguientes:

- 5 A. un polipéptido que comprende una secuencia que presenta al menos un 90% de identidad con toda o parte de la secuencia SEC ID N°: 1, para una utilización terapéutica en el tratamiento o prevención de la canicie prematura en el ser humano, comprendiendo dicha parte al menos 30 aminoácidos;
- 10 B. una molécula que comprende una secuencia de ARNi que tiene al menos un 90% de identidad con toda o parte de la secuencia SEC ID N°: 2, para una utilización terapéutica en el tratamiento o prevención de la canicie prematura en el ser humano, comprendiendo dicha parte al menos 18 nucleótidos;
- C. un procedimiento de selección de moléculas que modulan la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta para identificar un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación;

15 El procedimiento de selección C puede comprender las siguientes etapas:

- poner la molécula a ensayar en presencia del gen que codifica BNIPXL-beta en condiciones que permitan la expresión de dicho gen en ausencia de la molécula a ensayar y
- detectar una variación en el nivel de expresión de dicho gen, debido a la presencia de la molécula a ensayar.

20 En el procedimiento de selección (C), la modulación de la expresión puede ser una inhibición de la transcripción o de la traducción del gen que codifica BNIPXL-beta.

25 En el procedimiento de selección (C) las moléculas a ensayar pueden ser proteínas, ARNi, ribozimas o ARN antisentido que dirigen al gen que codifica la BNIPXL-beta.

D. Un procedimiento de selección de moléculas que modulan la actividad del polipéptido BNIPXL-beta, para la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación;

30 El procedimiento de selección (D) puede comprender las siguientes etapas:

- poner la molécula a ensayar en presencia del polipéptido BNIPXL-beta, en condiciones que permitan detectar la actividad de dicho polipéptido en ausencia de la molécula a ensayar y
- detectar una variación en la actividad de dicho polipéptido, debido a la presencia de la molécula a ensayar.

35 En el procedimiento de selección (D) la modulación de la actividad puede ser una inhibición, total o parcial.

40 En el procedimiento de selección (D) la modulación de la actividad puede realizarse por secuestro de dicho polipéptido.

En el procedimiento de selección (D) las moléculas a ensayar pueden ser anticuerpos dirigidos contra el polipéptido BNIPXL-beta o una parte del mismo.

45 En los procedimientos de selección (C) y (D), la pigmentación es la del cabello.

E. La utilización de un agente que module la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación.

F. La utilización de un agente que module la expresión del gen que codifica BNIPXL-beta, para la fabricación de un medicamento para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación.

50 I. La utilización de al menos un fragmento polinucleotídico que comprende al menos 18 nucleótidos consecutivos cuya secuencia corresponde a todo o parte del gen que codifica BNIPXL-beta o del transcrito BNIPXL-beta, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación.

55 Las utilizaciones (E), (F) E (I) conciernen a la prevención o al tratamiento de la canicie, particularmente la canicie prematura.

J. Un procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la canicie prematura en un individuo, que comprende las siguientes etapas:

- (i) Dosificación del nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta a partir de una muestra corporal procedente de dicho individuo,
- (ii) Comparación con un nivel de referencia.

65 En el procedimiento (J), el nivel de referencia es el nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta en un individuo no afectado.

En el procedimiento (J), la muestra corporal puede comprender o estar constituida por células melanocitarias.

5 K. Un procedimiento de selección de moléculas que modulan la interacción entre un polipéptido BNIPXL-beta y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 que permite la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación.

En el procedimiento de selección (K), la modulación puede ser una alteración de la asociación entre los dos polipéptidos.

10 En el procedimiento de selección (K), la modulación puede ser una modificación de la constante de disociación entre los dos polipéptidos.

En el procedimiento de selección (K), el agente identificado puede ser un inhibidor competitivo de la asociación entre los dos polipéptidos.

15

En el procedimiento de selección (K), la pigmentación es la del cabello.

Referencias

- 20 Belcredito, S., et al. 2001. Estrogen neuroprotection: the involvement of the Bcl-2 binding protein BNIP2. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 335-342.
- Blouin, JL et al. Localisation of a gene for Human Premature Hair Greying on chromosome 9q34. Congress of the American Society of Human Genetics, octubre 2006.
- 25 Commo, S. & Bernard, B.A. 2000. Melanocyte subpopulation turnover during the human hair cycle: an immunohistochemical study. *Pigment Cell Res.* 13: 253-259.
- Commo S., Gaillard O., Thibaut S., & Bernard B.A. 2004. Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair. *Pigment Cell Res.* 17: 488-497.
- Commo, S., Gaillard, O. & Bernard, B. A. Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath. *Br J Dermatol* 150, 435-43 (2004).
- 30 Formstecher, E. et al. Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res* 15, 376-84 (2005).
- Fromont-Racine, M., Rain, J. C. & Legrain, P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16, 277-82 (1997).
- de Lacharrière O., et al. A gene for premature hair greying maps to chromosome 9q34. World Congress of Dermatology, octubre 2007.
- 35 Machida, T., et al. 2006. Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* 25: 1931-1942.
- Mousley, C. J., et al. 2007. The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1771: 727-736.
- 40 Qin, W., et al. 2003. BNIPL-2, a novel homologue of BNIP-2, interacts with Bcl-2 and Cdc42GAP in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 379-385.
- Rain, J. C. et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409, 211-5 (2001).
- Shang, X., et al. 2003. Concerted regulation of cell dynamics by BNIP-2 and Cdc42GAP homology/Sec14p-like, proline-rich, and GTPase-activating protein domains of a novel Rho GTPase-activating protein, BPGAP1. *J Biol Chem* 278: 45903-45914.
- 45 Sirokmany, G., et al. 2006. Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab and Rho GTPases. *J Biol Chem* 281: 6096-6105.
- Tassabehji, M., Newton, V. E. & Read, A. P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 8, 251-5 (1994).
- 50 Vegeto, E., et al. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *Faseb J* 13, 793-803 (1999).
- Vojtek, A. B. & Hollenberg, S. M. Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* 255, 331-42 (1995).
- Yu, C. E. et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258-62 (1996).
- Zhou, Y. T., Guy, G. R. & Low, B. C. 2005. BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Exp Cell Res* 303: 263-274.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> L'OREAL
- <120> Utilización de BNIPXL-beta en la canicie prematura
- <130> B07637A - CA/CS
- 65 <150> FR 08/02435

<151> 30-04-2008

<160> 3

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 732

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

ES 2 401 137 T3

Ser Glu Leu Glu Glu Glu Lys Thr Ile Pro Thr Lys Glu Pro Glu Gln
 195 200 205

Ile Lys Ser Glu Tyr Lys Glu Glu Arg Cys Thr Glu Lys Asn Glu Asp
 210 215 220

Arg His Ala Leu His Met Asp Tyr Ile Leu Val Asn Arg Glu Glu Asn
 225 230 235 240

Ser His Ser Lys Pro Glu Thr Cys Glu Glu Arg Glu Ser Ile Ala Glu
 245 250 255

Leu Glu Leu Tyr Val Gly Ser Lys Glu Thr Gly Leu Gln Gly Thr Gln
 260 265 270

Leu Ala Ser Phe Pro Asp Thr Cys Gln Pro Ala Ser Leu Asn Glu Arg
 275 280 285

Lys Gly Leu Ser Ala Glu Lys Met Ser Ser Lys Ser Asp Thr Arg Ser
 290 295 300

Ser Phe Glu Ser Pro Ala Gln Asp Gln Ser Trp Met Phe Leu Gly His
 305 310 315 320

Ser Glu Val Gly Asp Pro Ser Leu Asp Ala Arg Asp Ser Gly Pro Gly
 325 330 335

Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu Pro Phe Ser Glu Leu Gly Leu Gly Glu
 340 345 350

Gly Pro Gln Leu Gln Ile Leu Glu Glu Met Lys Pro Leu Glu Ser Leu
 355 360 365

Ala Leu Glu Glu Ala Ser Gly Pro Val Ser Gln Ser Gln Lys Ser Lys
 370 375 380

Ser Arg Gly Arg Ala Gly Pro Asp Ala Val Thr His Asp Asn Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Met Leu Ser Pro Gln Pro Val Gln Lys Asn Met Ile Pro Asp Thr
 405 410 415

Glu Met Glu Glu Glu Thr Glu Phe Leu Glu Leu Gly Thr Arg Ile Ser
 420 425 430

Arg Pro Asn Gly Leu Leu Ser Glu Asp Val Gly Met Asp Ile Pro Phe
 435 440 445

Glu Glu Gly Val Leu Ser Pro Ser Ala Ala Asp Met Arg Pro Glu Pro
 450 455 460

ES 2 401 137 T3

Pro Asn Ser Leu Asp Leu Asn Asp Thr His Pro Arg Arg Ile Lys Leu
 465 470 475

Thr Ala Pro Asn Ile Asn Leu Ser Leu Asp Gln Ser Glu Gly Ser Ile
 485 490

Leu Ser Asp Asp Asn Leu Asp Ser Pro Asp Glu Ile Asp Ile Asn Val
 500 505

Asp Glu Leu Asp Thr Pro Asp Glu Ala Asp Ser Phe Glu Tyr Thr Gly
 515 520 525

His Glu Asp Pro Thr Ala Thr Lys Asp Ser Gly Gln Glu Ser Glu Ser
 530 535 540

Ile Pro Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Glu Arg Glu Asp Asn Arg Leu Trp
 545 550 555 560

Arg Thr Val Val Ile Gly Asp Gln Glu Gln Arg Ile Asp Met Lys Val
 565 570

Ile Glu Pro Tyr Arg Arg Val Ile Ser His Gly Gly Leu Arg Gly Tyr
 580 585 590

Tyr Gly Asp Gly Leu Asn Ala Ile Ile Val Phe Ala Ala Cys Phe Leu
 595 600 605

Pro Asp Ser Ser Arg Ala Asp Tyr His Tyr Val Met Glu Asn Leu Phe
 610 615 620

Leu Tyr Val Ile Ser Thr Leu Glu Leu Met Val Ala Glu Asp Tyr Met
 625 630 635 640

Ile Val Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Pro Arg Arg Arg Met Pro Gly Leu
 645 650 655

Gly Trp Met Lys Lys Cys Tyr Gln Met Ile Asp Arg Arg Leu Arg Lys
 660 665 670

Asn Leu Lys Ser Phe Ile Ile Val His Pro Ser Trp Phe Ile Arg Thr
 675 680 685

Ile Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Ile Ser Ser Lys Phe Ser Ser Lys
 690 695 700

Ile Lys Tyr Val Asn Ser Leu Ser Glu Leu Ser Gly Leu Ile Pro Met
 705 710 715 720

Asp Cys Ile His Ile Pro Glu Ser Ile Ile Lys Tyr
 725 730

<210> 2
 <211> 2405

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (163)..(2361)

<400> 2

```

gctttgtttg atggtgatcc acatttatcc acagagaatc ctgccttggg tcctgatgct      60
ttgctagcct cagacacttg tctggatata agcgaagctg cctttgacca cagtttcagc      120
gatgcctcag gtctcaacac atccacggga acaatagatg ac atg agt aaa ctg      174
                                     Met Ser Lys Leu
                                     1
aca tta tcc gaa ggc cat ccg gaa acg cca gtt gat ggg gac cta ggg      222
Thr Leu Ser Glu Gly His Pro Glu Thr Pro Val Asp Gly Asp Leu Gly
5                                     10                                     15                                     20
aag caa gat atc tgc tca tct gaa gcc tcg tgg ggt gat ttt gaa tat      270
Lys Gln Asp Ile Cys Ser Ser Glu Ala Ser Trp Gly Asp Phe Glu Tyr
                                     25                                     30                                     35
gat gta atg ggc cag aat atc gat gaa gat tta ctg aga gag cct gaa      318
Asp Val Met Gly Gln Asn Ile Asp Glu Asp Leu Leu Arg Glu Pro Glu
                                     40                                     45                                     50
cac ttc ctg tat ggt ggt gac cct cct ttg gag gaa gat tct ctg aag      366
His Phe Leu Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Leu Glu Glu Asp Ser Leu Lys
                                     55                                     60                                     65
cag tcg ctg gca ccg tac aca cct ccc ttt gat ttg tct tat atc aca      414
Gln Ser Leu Ala Pro Tyr Thr Pro Pro Phe Asp Leu Ser Tyr Ile Thr
                                     70                                     75                                     80
gaa cct gcc cag agt gct gaa aca ata gag gaa gct ggg tct cca gag      462
Glu Pro Ala Gln Ser Ala Glu Thr Ile Glu Glu Ala Gly Ser Pro Glu
85                                     90                                     95                                     100
gat gaa tct ctg gga tgc aga gca gca gag ata gtg ctt tct gca ctt      510
Asp Glu Ser Leu Gly Cys Arg Ala Ala Glu Ile Val Leu Ser Ala Leu
                                     105                                    110                                    115
cct gat cga aga agt gag gga aac cag gct gag acc aaa aac aga ctg      558
Pro Asp Arg Arg Ser Glu Gly Asn Gln Ala Glu Thr Lys Asn Arg Leu
                                     120                                    125                                    130
cct gga tcc cag ctg gct gtg ctg cat att cgt gaa gac cct gag tcc      606
Pro Gly Ser Gln Leu Ala Val Leu His Ile Arg Glu Asp Pro Glu Ser
                                     135                                    140                                    145
gtt tat ttg ccg gta gga gca ggc tcc aac att ttg tct cca tca aac      654
Val Tyr Leu Pro Val Gly Ala Gly Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ser Asn
                                     150                                    155                                    160
gtt gac tgg gaa gta gaa aca gat aat tct gat tta cca gca ggt gga      702
Val Asp Trp Glu Val Glu Thr Asp Asn Ser Asp Leu Pro Ala Gly Glu
165                                    170                                    175                                    180
gac ata gga cca cca aat ggt gcc agc aag gaa ata tca gaa ttg gaa      750
Asp Ile Gly Pro Pro Asn Gly Ala Ser Lys Glu Ile Ser Glu Leu Glu
                                     185                                    190                                    195
gaa gaa aaa aca att cct acc aaa gag cct gag cag ata aaa tca gaa      798
Glu Glu Lys Thr Ile Pro Thr Lys Glu Pro Glu Gln Ile Lys Ser Glu
                                     200                                    205                                    210
    
```

10

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| tac | aag | gaa | gaa | aga | tgt | aca | gag | aag | aat | gaa | gat | cgt | cat | gca | cta | 846 |
| Tyr | Lys | Glu | Glu | Arg | Cys | Thr | Glu | Lys | Asn | Glu | Asp | Arg | His | Ala | Leu | |
| | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | | | | |
| cac | atg | gat | tac | ata | ctt | gta | aac | cgt | gaa | gaa | aat | tca | cac | tca | aag | 894 |
| His | Met | Asp | Tyr | Ile | Leu | Val | Asn | Arg | Glu | Glu | Asn | Ser | His | Ser | Lys | |
| | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | | |
| cca | gag | acc | tgt | gaa | gaa | aga | gaa | agc | ata | gct | gaa | tta | gaa | ttg | tat | 942 |
| Pro | Glu | Thr | Cys | Glu | Glu | Arg | Glu | Ser | Ile | Ala | Glu | Leu | Glu | Leu | Tyr | |
| 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | 260 | |
| gta | ggt | tcc | aaa | gaa | aca | ggg | ctg | cag | gga | act | cag | tta | gca | agc | ttc | 990 |
| Val | Gly | Ser | Lys | Glu | Thr | Gly | Leu | Gln | Gly | Thr | Gln | Leu | Ala | Ser | Phe | |
| | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | 275 | | |
| cca | gac | aca | tgt | cag | cca | gcc | tcc | tta | aat | gaa | aga | aaa | ggt | ctc | tct | 1038 |
| Pro | Asp | Thr | Cys | Gln | Pro | Ala | Ser | Leu | Asn | Glu | Arg | Lys | Gly | Leu | Ser | |
| | | | 280 | | | | | 285 | | | | | 290 | | | |
| gca | gag | aaa | atg | tct | tct | aaa | agc | gat | acg | aga | tca | tct | ttt | gaa | agc | 1086 |
| Ala | Glu | Lys | Met | Ser | Ser | Lys | Ser | Asp | Thr | Arg | Ser | Ser | Phe | Glu | Ser | |
| | | 295 | | | | | 300 | | | | | 305 | | | | |
| cct | gca | caa | gac | cag | agt | tgg | atg | ttc | ttg | ggc | cat | agt | gag | ggt | ggt | 1134 |
| Pro | Ala | Gln | Asp | Gln | Ser | Trp | Met | Phe | Leu | Gly | His | Ser | Glu | Val | Gly | |
| | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | | | | |
| gat | cca | tca | ctg | gat | gcc | agg | gac | tca | ggg | cct | ggg | tgg | tcc | ggc | aag | 1182 |
| Asp | Pro | Ser | Leu | Asp | Ala | Arg | Asp | Ser | Gly | Pro | Gly | Trp | Ser | Gly | Lys | |
| 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | 340 | |
| act | gtg | gag | ccg | ttc | tct | gaa | ctc | ggc | ttg | ggt | gag | ggt | ccc | cag | ctg | 1230 |
| Thr | Val | Glu | Pro | Phe | Ser | Glu | Leu | Gly | Leu | Gly | Glu | Gly | Pro | Gln | Leu | |
| | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | 355 | | |
| cag | att | ctg | gaa | gaa | atg | aag | cct | cta | gaa | tct | tta | gca | cta | gag | gaa | 1278 |
| Gln | Ile | Leu | Glu | Glu | Met | Lys | Pro | Leu | Glu | Ser | Leu | Ala | Leu | Glu | Glu | |
| | | | 360 | | | | | 365 | | | | | 370 | | | |
| gcc | tct | ggt | cca | gtc | agc | caa | tca | cag | aag | agt | aag | agc | cga | ggc | agg | 1326 |
| Ala | Ser | Gly | Pro | Val | Ser | Gln | Ser | Gln | Lys | Ser | Lys | Ser | Arg | Gly | Arg | |
| | | 375 | | | | | 380 | | | | | 385 | | | | |
| gct | ggc | ccg | gat | gca | gtt | acc | cat | gac | aat | gaa | tgg | gaa | atg | ctt | tca | 1374 |
| Ala | Gly | Pro | Asp | Ala | Val | Thr | His | Asp | Asn | Glu | Trp | Glu | Met | Leu | Ser | |
| | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | | | | |
| cca | cag | cct | ggt | cag | aaa | aac | atg | atc | cct | gac | acg | gaa | atg | gag | gag | 1422 |
| Pro | Gln | Pro | Val | Gln | Lys | Asn | Met | Ile | Pro | Asp | Thr | Glu | Met | Glu | Glu | |
| 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | 420 | |
| gag | aca | gag | ttc | ctt | gag | ctc | gga | acc | agg | ata | tca | aga | cca | aat | gga | 1470 |
| Glu | Thr | Glu | Phe | Leu | Glu | Leu | Gly | Thr | Arg | Ile | Ser | Arg | Pro | Asn | Gly | |
| | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | 435 | | |
| cta | ctg | tca | gag | gat | gta | gga | atg | gac | atc | ccc | ttt | gaa | gag | ggc | gtg | 1518 |
| Leu | Leu | Ser | Glu | Asp | Val | Gly | Met | Asp | Ile | Pro | Phe | Glu | Glu | Gly | Val | |
| | | | 440 | | | | | 445 | | | | | 450 | | | |
| ctg | agt | ccc | agt | gct | gca | gac | atg | agg | cct | gaa | cct | cct | aat | tct | ctg | 1566 |
| Leu | Ser | Pro | Ser | Ala | Ala | Asp | Met | Arg | Pro | Glu | Pro | Pro | Asn | Ser | Leu | |
| | | 455 | | | | | 460 | | | | | 465 | | | | |
| gat | ctt | aat | gac | act | cat | cct | cgg | aga | atc | aag | ctc | aca | gcc | cca | aat | 1614 |
| Asp | Leu | Asn | Asp | Thr | His | Pro | Arg | Arg | Ile | Lys | Leu | Thr | Ala | Pro | Asn | |
| | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | | | | |

ES 2 401 137 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| atc Ile 485 | aat Asn | ctt Leu | tct Ser | ctg Leu | gac Asp 490 | caa Gln | agt Ser | gaa Glu | gga Gly | tct Ser 495 | att Ile | ctc Leu | tct Ser | gat Asp | gat Asp 500 | 1662 |
| aac Asn | ttg Leu | gac Asp | agc Ser | cca Pro 505 | gat Asp | gaa Glu | att Ile | gac Asp | atc Ile 510 | aat Asn | gtg Val | gat Asp | gaa Glu | ctt Leu 515 | gat Asp | 1710 |
| acc Thr | ccc Pro | gat Asp | gaa Glu 520 | gca Ala | gat Asp | tct Ser | ttt Phe | gag Glu 525 | tac Tyr | act Thr | ggc Gly | cat His | gaa Glu 530 | gat Asp | ccc Pro | 1758 |
| aca Thr | gcc Ala | acc Thr 535 | aaa Lys | gat Asp | tct Ser | ggc Gly | caa Gln 540 | gag Glu | tca Ser | gag Glu | tct Ser | att Ile 545 | cca Pro | gaa Glu | tat Tyr | 1806 |
| acg Thr | gcc Ala 550 | gaa Glu | gag Glu | gaa Glu | cgg Arg | gag Glu 555 | gac Asp | aac Asn | cgg Arg | ctt Leu | tgg Trp 560 | agg Arg | aca Thr | gtg Val | gtc Val | 1854 |
| att Ile 565 | gga Gly | gac Asp | caa Gln | gag Glu | cag Gln 570 | cgc Arg | att Ile | gac Asp | atg Met | aag Lys 575 | gtc Val | atc Ile | gag Glu | ccc Pro | tac Tyr 580 | 1902 |
| agg Arg | aga Arg | gtc Val | att Ile | tct Ser 585 | cac His | gga Gly | gga Gly | ctt Leu | aga Arg 590 | gga Gly | tac Tyr | tat Tyr | ggg Gly | gac Asp 595 | ggt Gly | 1950 |
| cta Leu | aat Asn | gcc Ala | atc Ile 600 | att Ile | gtg Val | ttt Phe | gcc Ala 605 | gcc Ala | tgt Cys | ttt Phe | ctg Leu | cca Pro | gac Asp 610 | agc Ser | agt Ser | 1998 |
| cgg Arg | gcg Ala | gat Asp 615 | tac Tyr | cac His | tat Tyr | gtc Val | atg Met 620 | gaa Glu | aat Asn | ctt Leu | ttc Phe | cta Leu 625 | tat Tyr | gta Val | ata Ile | 2046 |
| agt Ser | act Thr 630 | tta Leu | gag Glu | ttg Leu | atg Met | gta Val 635 | gct Ala | gaa Glu | gac Asp | tat Tyr | atg Met 640 | att Ile | gtg Val | tac Tyr | ttg Leu | 2094 |
| aat Asn 645 | ggt Gly | gca Ala | acc Thr | cca Pro | aga Arg 650 | agg Arg | agg Arg | atg Met | cca Pro | ggg Gly 655 | cta Leu | ggc Gly | tgg Trp | atg Met 660 | aag Lys | 2142 |
| aaa Lys | tgc Cys | tac Tyr | cag Gln | atg Met 665 | att Ile | gac Asp | aga Arg | cgg Arg | ttg Leu 670 | agg Arg | aag Lys | aat Asn | ttg Leu | aaa Lys 675 | tca Ser | 2190 |
| ttc Phe | atc Ile | att Ile | gtt Val 680 | cat His | cca Pro | tct Ser | tgg Trp | ttc Phe 685 | atc Ile | aga Arg | aca Thr | atc Ile | ctt Leu 690 | gct Ala | gtg Val | 2238 |
| aca Thr | cga Arg | cct Pro 695 | ttt Phe | ata Ile | agt Ser | tca Ser | aaa Lys 700 | ttc Phe | agc Ser | agt Ser | aaa Lys | att Ile 705 | aaa Lys | tat Tyr | gtc Val | 2286 |
| aat Asn 710 | agc Ser | tta Leu | tca Ser | gaa Glu | ctc Leu | agt Ser 715 | ggg Gly | ctg Leu | atc Ile | cca Pro | atg Met 720 | gat Asp | tgc Cys | atc Ile | cac His | 2334 |
| att Ile 725 | cca Pro | gag Glu | agc Ser | atc Ile 730 | atc Ile | aaa Lys | tat Tyr | tga | cttgaagctg aaagaaaagc | | | | | | | 2381 |
| cttagttggc catgctggaa gaag | | | | | | | | | | | | | | | 2405 | |

<210> 3
 <211> 732
 <212> PRT

ES 2 401 137 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Lys Leu Thr Leu Ser Glu Gly His Pro Glu Thr Pro Val Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Gly Lys Gln Asp Ile Cys Ser Ser Glu Ala Ser Trp Gly
 20 25 30

Asp Phe Glu Tyr Asp Val Met Gly Gln Asn Ile Asp Glu Asp Leu Leu
 35 40 45

Arg Glu Pro Glu His Phe Leu Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Leu Glu Glu
 50 55 60

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

Ser Tyr Ile Thr Glu Pro Ala Gln Ser Ala Glu Thr Ile Glu Glu Ala
 85 90 95

Gly Ser Pro Glu Asp Glu Ser Leu Gly Cys Arg Ala Ala Glu Ile Val
 100 105 110

Leu Ser Ala Leu Pro Asp Arg Arg Ser Glu Gly Asn Gln Ala Glu Thr
 115 120 125

Lys Asn Arg Leu Pro Gly Ser Gln Leu Ala Val Leu His Ile Arg Glu
 130 135 140

Asp Pro Glu Ser Val Tyr Leu Pro Val Gly Ala Gly Ser Asn Ile Leu
 145 150 155 160

Ser Pro Ser Asn Val Asp Trp Glu Val Glu Thr Asp Asn Ser Asp Leu
 165 170 175

Pro Ala Gly Gly Asp Ile Gly Pro Pro Asn Gly Ala Ser Lys Glu Ile
 180 185 190

Ser Glu Leu Glu Glu Glu Lys Thr Ile Pro Thr Lys Glu Pro Glu Gln
 195 200 205

Ile Lys Ser Glu Tyr Lys Glu Glu Arg Cys Thr Glu Lys Asn Glu Asp
 210 215 220

Arg His Ala Leu His Met Asp Tyr Ile Leu Val Asn Arg Glu Glu Asn
 225 230 235 240

Ser His Ser Lys Pro Glu Thr Cys Glu Glu Arg Glu Ser Ile Ala Glu
 245 250 255

ES 2 401 137 T3

Leu Glu Leu Tyr Val Gly Ser Lys Glu Thr Gly Leu Gln Gly Thr Gln
 260 265 270
 Leu Ala Ser Phe Pro Asp Thr Cys Gln Pro Ala Ser Leu Asn Glu Arg
 275 280 285
 Lys Gly Leu Ser Ala Glu Lys Met Ser Ser Lys Ser Asp Thr Arg Ser
 290 295 300
 Ser Phe Glu Ser Pro Ala Gln Asp Gln Ser Trp Met Phe Leu Gly His
 305 310 315 320
 Ser Glu Val Gly Asp Pro Ser Leu Asp Ala Arg Asp Ser Gly Pro Gly
 325 330 335
 Trp Ser Gly Lys Thr Val Glu Pro Phe Ser Glu Leu Gly Leu Gly Glu
 340 345 350
 Gly Pro Gln Leu Gln Ile Leu Glu Glu Met Lys Pro Leu Glu Ser Leu
 355 360 365
 Ala Leu Glu Glu Ala Ser Gly Pro Val Ser Gln Ser Gln Lys Ser Lys
 370 375 380
 Ser Arg Gly Arg Ala Gly Pro Asp Ala Val Thr His Asp Asn Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Met Leu Ser Pro Gln Pro Val Gln Lys Asn Met Ile Pro Asp Thr
 405 410 415
 Glu Met Glu Glu Glu Thr Glu Phe Leu Glu Leu Gly Thr Arg Ile Ser
 420 425 430
 Arg Pro Asn Gly Leu Leu Ser Glu Asp Val Gly Met Asp Ile Pro Phe
 435 440 445
 Glu Glu Gly Val Leu Ser Pro Ser Ala Ala Asp Met Arg Pro Glu Pro
 450 455 460
 Pro Asn Ser Leu Asp Leu Asn Asp Thr His Pro Arg Arg Ile Lys Leu
 465 470 475 480
 Thr Ala Pro Asn Ile Asn Leu Ser Leu Asp Gln Ser Glu Gly Ser Ile
 485 490 495
 Leu Ser Asp Asp Asn Leu Asp Ser Pro Asp Glu Ile Asp Ile Asn Val
 500 505 510
 Asp Glu Leu Asp Thr Pro Asp Glu Ala Asp Ser Phe Glu Tyr Thr Gly
 515 520 525
 His Glu Asp Pro Thr Ala Thr Lys Asp Ser Gly Gln Glu Ser Glu Ser

ES 2 401 137 T3

| 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ile 545 | Pro | Glu | Tyr | Thr | Ala 550 | Glu | Glu | Glu | Arg | Glu 555 | Asp | Asn | Arg | Leu | Trp 560 |
| Arg | Thr | Val | Val | Ile 565 | Gly | Asp | Gln | Glu | Gln 570 | Arg | Ile | Asp | Met | Lys 575 | Val |
| Ile | Glu | Pro | Tyr 580 | Arg | Arg | Val | Ile | Ser 585 | His | Gly | Gly | Leu | Arg 590 | Gly | Tyr |
| Tyr | Gly | Asp 595 | Gly | Leu | Asn | Ala | Ile 600 | Ile | Val | Phe | Ala | Ala 605 | Cys | Phe | Leu |
| Pro | Asp 610 | Ser | Ser | Arg | Ala | Asp 615 | Tyr | His | Tyr | Val | Met 620 | Glu | Asn | Leu | Phe |
| Leu 625 | Tyr | Val | Ile | Ser | Thr 630 | Leu | Glu | Leu | Met | Val 635 | Ala | Glu | Asp | Tyr | Met 640 |
| Ile | Val | Tyr | Leu | Asn 645 | Gly | Ala | Thr | Pro | Arg 650 | Arg | Arg | Met | Pro | Gly 655 | Leu |
| Gly | Trp | Met | Lys 660 | Lys | Cys | Tyr | Gln | Met 665 | Ile | Asp | Arg | Arg | Leu 670 | Arg | Lys |
| Asn | Leu | Lys 675 | Ser | Phe | Ile | Ile | Val 680 | His | Pro | Ser | Trp | Phe 685 | Ile | Arg | Thr |
| Ile | Leu 690 | Ala | Val | Thr | Arg | Pro 695 | Phe | Ile | Ser | Ser | Lys 700 | Phe | Ser | Ser | Lys |
| Ile 705 | Lys | Tyr | Val | Asn | Ser 710 | Leu | Ser | Glu | Leu | Ser 715 | Gly | Leu | Ile | Pro | Met 720 |
| Asp | Cys | Ile | His | Ile 725 | Pro | Glu | Ser | Ile | Ile 730 | Lys | Tyr | | | | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una secuencia que presenta al menos un 90% de identidad con toda o parte de la secuencia SEC ID N°: 1, para una utilización terapéutica en el tratamiento o prevención de la canicie prematura en seres humanos, comprendiendo dicha parte al menos 30 aminoácidos.
- 10 2. Una molécula que comprende una secuencia ARNi que tiene al menos un 90% de identidad con toda o parte de la secuencia SEC ID N°: 2 para una utilización terapéutica en el tratamiento o prevención de canicie prematura en seres humanos, comprendiendo dicha parte al menos 18 nucleótidos.
- 15 3. Un procedimiento de selección de moléculas que modulen la expresión del gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1, para identificar un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación del cabello, que comprende las siguientes etapas:
- poner la molécula a ensayar en presencia del gen que codifica BNIPXL-beta, en condiciones que permitan la expresión de dicho gen en ausencia de la molécula a ensayar; y
 - detectar una variación en el nivel de expresión de dicho gen, debida a la presencia de dicha molécula a ensayar.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha modulación de la expresión es una inhibición de la transcripción o de la traducción del gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1.
- 25 5. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 4, en el que las moléculas a ensayar son proteínas, ARNi, ribozimas o ARN antisentido que dirigen el gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1.
- 30 6. Un procedimiento de selección de moléculas que modulen la actividad del polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1, para la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos, en el campo de la pigmentación del cabello, que comprende las siguientes etapas:
- poner la molécula a ensayar en presencia del polipéptido BNIPXL-beta, en condiciones que permitan la detección de la actividad de dicho polipéptido en ausencia de la molécula a ensayar; y
 - detectar una variación en la actividad de dicho polipéptido, debida a la presencia de la molécula a ensayar.
- 35 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que las moléculas a ensayar son anticuerpos dirigidos contra el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1 o una parte del mismo.
- 40 8. La utilización del agente que module la expresión del gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación para la prevención o el tratamiento de la canicie, en el que dicho agente es una molécula según la reivindicación 2.
- 45 9. Un agente que module la expresión del gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1 para una utilización terapéutica en el campo de la pigmentación del cabello, en el que dicho agente es una molécula según la reivindicación 2.
- 50 10. La utilización de al menos un fragmento polinucleotídico que comprende al menos 18 nucleótidos consecutivos cuya secuencia corresponde a todo o a parte del gen que codifica el polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1 o del transcrito BNIPXL-beta que tiene la SEC ID N°: 2, con fines cosméticos, en el campo de la pigmentación, para la prevención o el tratamiento de la canicie.
- 55 11. Un procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la canicie prematura en un individuo, que comprende las siguientes etapas:
- i) Dosificación del nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 2 a partir de una muestra corporal procedente de dicho individuo;
 - ii) Comparación con un nivel de referencia, en el que el nivel de referencia es el nivel de expresión del transcrito BNIPXL-beta en un individuo no afectado por canicie prematura.
- 60 12. Un procedimiento de selección de moléculas que modulen la interacción entre un polipéptido BNIPXL-beta que tiene la secuencia SEC ID N°: 1 y un polipéptido derivado de la traducción del gen DDX31 que permita la identificación de un agente para una utilización con fines cosméticos o terapéuticos en el campo de la pigmentación del cabello.
- 65 13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha modulación es una modificación de la constante de asociación entre los dos polipéptidos.

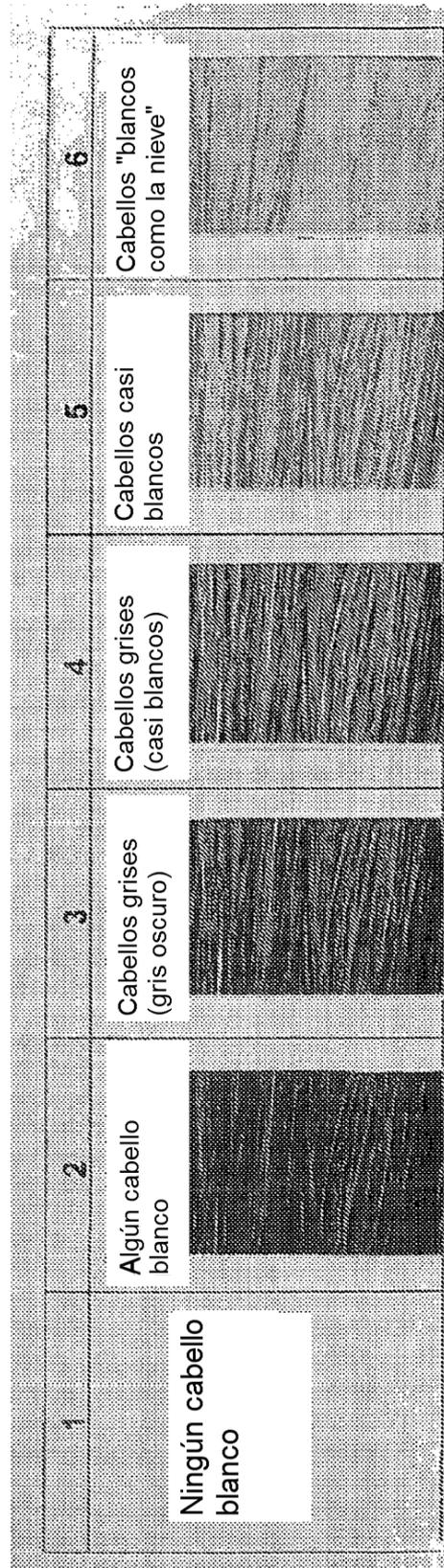


FIG. 1

Nº de acceso: AY439214, AAR15151

GI : 38259615

Localización: cromosoma/hebra: 9q21.31

SEC ID Nº 1

MSKLTLSSEGHPEPTVVDGDLGKQDICSSEASWGDFFEYDVMGQNIDEDLLREPEHFLYGGDPPL
EEDSLKQSLAPYTPPFDLSEYITEPAQSAETIEEAGSPEDESLGCRAAEIVLSALPDRRSEGN
QAETKNRLPGSQLAVLHIREDPESVYLPVGAGSNILSPSNVDWEVETDNSDLPAGGDIGPPN
GASKEISELEEEKTIPTKEPEQIKSEYKEERCTEKNEDRHALHMDYILVNRENSHSPKPETC
EERESIAELELYVGSKETGLQGTQLASFPDTCQPASLNERKGLSAEKMSSKSDTRSSFESPA
QDQSWMFLGHSEVGDPSLDARDSGPGWSGKTVEPFSELGLGEGPQLQILEEMKPLESLALEE
ASGPVSQSQKSKSRGRAGPDAVTHDNEWEMLSFPQVQKNMIPDTEMEEEETFLELGTRISRP
NGLLEDVGMIDPFEEGVLSPSAADMRPEPPNSLDLNDTHPRRIKLTAPNINLSLDQSECSI
LSDDNLDSPDEIDINVDELTPDEADSFYTGHEPTATKDSGQESSEIPEYTAEEREDNR
LWRTVVIGDQEQRIDMKVIEPYRRVISHGGLRGYYGDGLNAIIVFAACFLPDSSRADYHYVM
ENFLYVISTLELMVAEDYMIVYLNATPRRRMPGLGWMKKCYQMIDRRLRKNLKSFIIVHP
SWFIRTI LAVTRPFISSKFSSKIKYVNSLSELSGLIPMDCIHIPESI IKY

FIG. 2A

gctttgtttgatggtgatccacatttatccacagagaatcctgccttggttcctgatgcttt
gctagcctcagacacttgtctggatataagcgaagctgcctttgaccacagtttcagcgatg
cctcaggtctcaacacatcccacgggaacaatagatgac**ATGAGTAAACTGACATTATCCGAA**
GGCCATCCGGAAACGCCAGTTGATGGGGACCTAGGGAAGCAAGATATCTGCTCATCTGAAGC
CTCGTGGGGTGATTTTGAATATGATGTAATGGGCCAGAATATCGATGAAGATTTACTGAGAG
AGCCTGAACACTTCCTGTATGGTGGTGACCCTCCTTTGGAGGAAGATTCTCTGAAGCAGTCTG
CTGGCACCGTACACACCTCCCTTTGATTTGTCTTATATCACAGAACCTGCCAGAGTGCTGA
AACAATAGAGGAAGCTGGGTCTCCAGAGGATGAATCTCTGGGATGCAGAGCAGCAGAGATAG
TGCTTTCTGCACTTCCTGATCGAAGAAGTGAGGGAAACCAGGCTGAGACCAAAAACAGACTG
CCTGGATCCCAGCTGGCTGTGCTGCATATTCGTGAAGACCCTGAGTCCGTTTATTGCCGGT
AGGAGCAGGCTCCAACATTTTGTCTCCATCAAACGTTGACTGGGAAGTAGAAAACAGATAATT
CTGATTTACCAGCAGGTGGAGACATAGGACCACCAAATGGTGCCAGCAAGGAAATATCAGAA
TTGGAAGAAGAAAAACAATTCCTACCAAAGAGCCTGAGCAGATAAAATCAGAATACAAGGA
AGAAAGATGTACAGAGAAGAATGAAGATCGTCATGCACTACACATGGATTACATACTTGTA
ACCGTGAAGAAAATTCACACTCAAAGCCAGAGACCTGTGAAGAAAGAGAAAAGCATAGCTGAA
TTAGAATTGTATGTAGGTTCCAAAGAAACAGGGCTGCAGGGAACCTCAGTTAGCAAGCTTCCC
AGACACATGTCAGCCAGCCTCCTTAAATGAAAGAAAAGGTCTCTCTGCAGAGAAAATGTCTT
CTAAAAGCGATACGAGATCATCTTTTGAAGCCCTGCACAAGACCAGAGTTGGATGTTCTTG
GGCCATAGTGAGGTTGGTGATCCATCACTGGATGCCAGGGACTCAGGGCCTGGGTGGTCCGG
CAAGACTGTGGAGCCGTTCTCTGAACTCGGCTTGGGTGAGGGTCCCCAGCTGCAGATTCTGG
AAGAAATGAAGCCTCTAGAATCTTTAGCACTAGAGGAAGCCTCTGGTCCAGTCAGCCAATCA
CAGAAGAGTAAGAGCCGAGGCAGGGCTGGCCCCGATGCAGTTACCCATGACAAATGAATGGGA
AATGCTTTTACCACAGCCTGTTTCAAGAAAACATGATCCCTGACACGGAAATGGAGGAGGAGA
CAGAGTTCCCTTGAGCTCGGAACCAGGATATCAAGACCAAATGGACTACTGTCAGAGGATGTA
GGAATGGACATCCCCTTTGAAGAGGGCGTGCTGAGTCCCAGTGCTGCAGACATGAGGCCTGA
ACCTCCTAATTCTCTGGATCTTAATGACACTCATCCTCGGAGAATCAAGCTCACAGCCCCAA
ATATCAATCTTTCTCTGGACCAAAGTGAAGGATCTATTCTCTCTGATGATAACTTGGACAGC
CCAGATGAAATTGACATCAATGTGGATGAACTTGATAACCCCGATGAAGCAGATTCTTTTGA
GTACACTGGCCATGAAGATCCCACAGCCACCAAAGATTCTGGCCAAGAGTCAGAGTCTATTC
CAGAATATACGGCCGAAGAGGAACGGGAGGACAACCGGCTTTGGAGGACAGTGGTCATTGGA
GACCAAGAGCAGCGCATTGACATGAAGGTCATCGAGCCCTACAGGAGAGTCATTTCTCACGG
AGGACTTAGAGGATACTATGGGGACGGTCTAAATGCCATCATTGTGTTTGGCCCTGTTTTT
TGCCAGACAGCAGTCGGGCGGATTACCACTATGTCATGGAAAATCTTTTCTATATGTAATA
AGTACTTTAGAGTTGATGGTAGCTGAAGACTATATGATTGTGTACTTGAATGGTGCAACCCC
AAGAAGGAGGATGCCAGGGCTAGGCTGGATGAAGAAATGCTACCAGATGATTGACAGACGGT
TGAGGAAGAATTTGAAATCATTATCATTGTTTCCATCCATCTTGGTTCATCAGAACAATCCTT
GCTGTGACACGACCTTTTATAAGTTCAAATTCAGCAGTAAAATTAATATGTCAATAGCTT
ATCAGAACTCAGTGGGCTGATCCCAATGGATTGCATCCACATTCAGAGAGCATCATCAAAT
ATTGActtgaagctgaaagaaaagccttagttggccatgctggaagaag

SEC ID N° 2

FIG. 2B