

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 012**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2002 E 02711634 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1364025**

54 Título: **Un nuevo gen BNO1 cartografiado en el cromosoma 16q24.3**

30 Prioridad:

**31.01.2001 AU PP278301**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2013**

73 Titular/es:

**BIONOMICS LIMITED (100.0%)  
31 DALGLEISH STREET  
THEBARTON, SOUTH AUSTRALIA 5031, AU**

72 Inventor/es:

**CALLEN, DAVID, FREDERICK;  
POWELL, JASON, ANTHONY;  
KREMMIDIOTIS, GABRIEL;  
GARDNER, ALISON, ELAINE;  
CRAWFORD, JOANNA;  
BAIS, ANTHONY, JOHN y  
KOCHETKOVA, MARINA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 433 012 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

Un nuevo gen BNO1 cartografiado en el cromosoma 16q24.3.

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo gen que se ha identificado en la punta distal del brazo largo del cromosoma 16 en 16q24.3. El gen BNO1 codifica un polipéptido que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en el direccionamiento de proteínas mediante ubiquitinación para una degradación en el proteasoma. Considerando que BNO1 está involucrado en la ubiquitinación y la degradación de proteínas, la invención también se refiere a la terapia de trastornos asociados con este proceso, tales como el cáncer (en particular el carcinoma de mama y de próstata), la enfermedad inmune/inflamatoria y la enfermedad neurológica. Además, la invención se refiere al diagnóstico de trastornos asociados con la ubiquitinación y al escrutinio de fármacos para una intervención terapéutica en estos trastornos.

**Técnica anterior**

Se ha observado que el desarrollo de carcinomas humanos surge por una acumulación de cambios genéticos que implican agentes reguladores positivos de la función celular (oncogenes) y agentes reguladores negativos (genes supresores de tumores). Para que una célula somática normal se desarrolle en un tumor metastásico se requieren cambios a nivel celular, tales como la immortalización, la pérdida de inhibición por contacto y la capacidad de crecimiento invasivo, y cambios a nivel tisular, tales como evitar respuestas inmunes del hospedador y restricciones del crecimiento impuestas por las células circundantes, y la formación de un aporte de sangre para el tumor en crecimiento.

Estudios genéticos moleculares de carcinoma colorrectal han proporcionado pruebas sustanciales de que la generación de malignidad requiere la acumulación secuencial de una serie de cambios genéticos dentro de la misma célula madre epitelial del colon. Para que una célula epitelial colónica normal se convierta en un adenoma benigno, progrese a adenoma intermedio y final, y finalmente se convierta en una célula maligna, son necesarias mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumores y mutaciones activadoras en proto-oncogenes (Fearon y Vogelstein, 1990).

El empleo de una variedad de técnicas, tales como la pérdida de heterocigosidad (LOH), la hibridación genómica comparativa (CGH) y estudios citogenéticos de tejidos cancerosos, beneficiándose todas ellas de anomalías cromosómicas asociadas con la célula afectada, ha ayudado a identificar una variedad de genes supresores de tumores y de oncogenes asociados con una serie de tipos de tumores.

En un aspecto, estudios de cánceres tales como retinoblastoma y carcinoma de colon han respaldado el modelo de que LOH es un episodio específico en la patogénesis del cáncer y se ha proporcionado un mecanismo para identificar los genes causantes de cáncer. Este modelo se pone de relieve aún más en el síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), un trastorno raro que predispone individuos a una variedad de tumores, tales como carcinomas de células claras del riñón y tumores de células de los islotes del páncreas. Tanto los casos esporádicos como los casos heredados del síndrome muestran LOH en el brazo corto del cromosoma 3 y translocaciones somáticas que implican 3p en tumores esporádicos, y también se ha observado un ligamiento genético con la misma región en familias afectadas. El gen supresor del tumor de VHL ya se ha identificado a partir de esta región del cromosoma 3 y se han detectado mutaciones en el mismo en el 100% de los pacientes que tienen un diagnóstico clínico de enfermedad de VHL. Además, el gen de VHL se inactiva en aproximadamente el 50-80% de la forma esporádica más común de carcinoma renal de células claras.

Los determinantes genéticos implicados en el cáncer de mama no están tan bien definidos como los del cáncer de colon, debido en parte a que los estadios histológicos del desarrollo del cáncer de mama están peor caracterizados. Sin embargo, igual que con el carcinoma de colon, se cree que una tienen que estar implicados variedad de genes en una progresión por etapas, durante la génesis de tumores de mama.

Algunas mujeres parecen tener un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Análisis de ligamiento genético han mostrado que 5 a 10% de todos los cánceres de mama son debidos al menos a dos genes de susceptibilidad autosómicos dominantes. Generalmente, las mujeres portadoras de una mutación en un gen de susceptibilidad desarrollan cáncer de mama a una edad más temprana, en comparación con la población general, frecuentemente tienen tumores de mama bilaterales y tienen un mayor riesgo de desarrollar cánceres en otros órganos, particularmente carcinoma de ovario.

Un análisis de ligamiento genético en familias que muestran una alta incidencia de cáncer de mama de aparición temprana (antes de los 46 años de edad) fue un éxito en la cartografía del primer gen de susceptibilidad, *BRCA1*, en el cromosoma 17q21 (Hall *et al.*, 1990). Con posterioridad a esto, se cartografió el gen *BRCA2* en el cromosoma 13q12-q13 (Wooster *et al.*, 1994), confirmando este gen una mayor incidencia de cáncer de mama masculino y una menor incidencia de cáncer de ovario, cuando se comparaba con *BRCA1*.

Tanto *BRCA1* como *BRCA2*, ya han sido clonados (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995) y se han identificado numerosas mutaciones en estos genes en individuos susceptibles con casos familiares de cáncer de mama.

Existen otros síndromes de cáncer de mama heredado, sin embargo, son raros. Las mutaciones hereditarias en el gen *TP53* se han identificado en individuos con síndrome de Li-Fraumeni, un cáncer familiar que produce neoplasias epite-

liales que tienen lugar en sitios múltiples, incluyendo la mama. Del mismo modo, mutaciones de la línea germinal en el gen *MMC4C1/PTEN* implicado en la enfermedad de Cowden y en el gen de la ataxia telangiectasia (AT), han mostrado que confieren un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, entre otras manifestaciones clínicas, pero en conjunto solo representan un porcentaje bajo de las familias con una predisposición hereditaria al cáncer de mama.

5 Se ha mostrado que las mutaciones somáticas en el gen *TP53* se producen en un alto porcentaje de individuos con cáncer de mama esporádico. Sin embargo, a pesar de que se ha observado LOH en los loci de *BRCA1* y *BRCA2* con una frecuencia de 30 a 40% en los casos esporádicos (Cleiton-Jansen *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1993), no hay prácticamente ninguna señal de mutaciones somáticas en el alelo conservado de estos dos genes en los cánceres esporádicos (Futreal *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 1996). Datos recientes sugieren que la metilación del ADN de la secuencia del promotor  
10 de estos genes puede ser un importante mecanismo de regulación a la baja. El uso de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción y de marcadores polimórficos de pequeñas repeticiones en tándem, ha identificado numerosas regiones con desequilibrio alélico en el cáncer de mama, lo que sugiere la presencia de genes adicionales que pueden estar implicados en el cáncer de mama. Datos compilados a partir de más de 30 estudios revelan la pérdida de ADN en al menos 11 brazos de cromosomas, con una frecuencia superior al 25%, estando regiones tales como 16q y  
15 17p afectadas en más del 50% de los tumores (Devilee y Cornelisse, 1994; Brenner y Aldaz, 1995). Sin embargo, se conoce que solo algunas de estas regiones albergan genes supresores de tumores, los cuales se ha mostrado que están mutados en individuos con las dos formas de cáncer de mama, esporádica (genes *TP53* y *RB*) y familiar (genes *TP53*, *RB*, *BRCA1* y *BRCA2*).

20 Estudios citogenéticos han implicado la pérdida del brazo largo del cromosoma 16 como un episodio temprano en la carcinogénesis de mama, ya que se encuentra en tumores con pocas o ninguna otra anomalía citogenética. Alteraciones en el cromosoma 1 y 16 también se han observado en varios casos de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), el estadio preinvasivo de carcinoma de mama ductal. Además, estudios de LOH en muestras de DCIS identificaron la pérdida de marcadores de 16q en el 29 al 89% de los casos sometidos a ensayo (Chen *et al.*, 1996; Radford *et al.*, 1995). Además,  
25 el examen de tumores de otros tipos de tejido ha indicado que la LOH de 16q también se observa frecuentemente en los carcinomas de próstata, hígado, ovario y neuroectodérmicos primitivos. En conjunto, estos hallazgos sugieren la presencia de un gen que se cartografía en el brazo largo del cromosoma 16 que está involucrado de manera decisiva en el desarrollo temprano de una gran proporción de cánceres de mama, así como de cánceres de otros tipos de tejidos, pero hasta la fecha no se ha identificado un gen de este tipo.

#### Descripción de la invención

30 La presente invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que se cartografía en el cromosoma 16q24.3 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3.

También proporciona una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3, que codifica un polipéptido que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en el direccionamiento de proteínas mediante ubiquitinación para una degradación en el proteasoma.

35 La invención también incluye una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que es al menos 95% idéntica a una molécula de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3 y que codifica un polipéptido que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en el direccionamiento de proteínas mediante ubiquitinación para una degradación en el proteasoma.

40 Una cualquiera de las variantes de polinucleótidos descritas anteriormente puede codificar una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una característica funcional o estructural de BNO1.

Típicamente, la identidad de secuencia se calcula utilizando el algoritmo BLASTN con la matriz por defecto BLOSUM62.

45 La invención también incluye una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que codifica un polipéptido que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en la degradación de proteínas mediante ubiquitinación, y que se hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3.

50 En condiciones rigurosas, la hibridación tendrá lugar lo más preferiblemente a 42°C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM, 2% de SDS, 50% de formamida, 1X Denhart, 10% (p/v) de sulfato de dextrano y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Variaciones útiles de estas condiciones serán claramente evidentes para los expertos en la técnica. Las etapas de lavado que siguen a la hibridación se producen lo más preferiblemente a 65°C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y 1% de SDS. Variaciones adicionales de estas condiciones serán claramente evidentes para los expertos en la materia.

La invención también proporciona una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.

55 Preferiblemente, la identidad de la secuencia se determina utilizando el algoritmo BLASTP con la matriz por defecto BLOSUM62.

También describimos una molécula de ácido nucleico aislada que comprende los exones 1 a 9 o los exones 1, 2, 2.5 y 3 a 9, identificados en las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID Números: 1 y 3, respectivamente.

Aún más, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3.

- 5 También describimos una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 desde la base 4 hasta la base 1.621 o expuesta en SEQ ID NO: 3 desde la base 4 hasta la base 1.708.

También describimos un gen aislado que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3 y los elementos de control de **BNO1**.

- 10 Preferiblemente, los elementos de control de BNO1 son los que median en la expresión en el tejido de mama, próstata, hígado y ovario.

- 15 Las secuencias de nucleótidos de la presente invención se pueden modificar genéticamente usando métodos aceptados en la técnica para alterar las secuencias que codifican BNO1, para una variedad de objetivos. Estos incluyen, pero no se limitan a los mismos, la modificación de la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. El reacomplamiento con PCR de fragmentos génicos y el uso de oligonucleótidos sintéticos permiten la modificación genética de secuencias de nucleótidos de BNO1. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio mediada con nucleótidos puede introducir mutaciones que crean nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación y producir variantes por corte y empalme, etc.

- 20 Como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una serie de secuencias de polinucleótidos que codifican BNO1, algunas que pueden tener un mínimo de similitud con las secuencias de polinucleótidos de cualquier gen conocido y de origen natural. Por lo tanto, describimos todas y cada variación posible de la secuencia de polinucleótidos que se podría realizar mediante la selección de combinaciones basadas en posibles opciones de codones. Estas combinaciones se realizan de acuerdo con el código genético de tripletes convencional, tal como se aplica a la secuencia de polinucleótidos de BNO1 de origen natural, y todas las variaciones de este tipo se deben considerar como que se han descrito específicamente.

- 25 Los polinucleótidos de esta invención incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, cadenas codificantes y no codificantes, y se pueden modificar química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen marcadores, metilación, agentes intercalantes, alquilantes y enlaces modificados. En algunos casos, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican BNO1 o sus derivados que poseen un uso de codones sustancialmente diferente al de BNO1 de origen natural. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones para aumentar la tasa de expresión del péptido en un hospedador procariótico o eucariótico particular que se corresponda con la frecuencia con la que codones particulares son utilizados por el hospedador. Otras razones para alterar la secuencia de nucleótidos que codifica BNO1 y sus derivados, sin alterar las secuencias de aminoácidos codificadas, incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen propiedades más deseables, tales como una semivida mayor que los transcritos producidos a partir de la secuencia de origen natural.

- 35 La invención también incluye la producción de moléculas de ADN, que codifican BNO1 y sus derivados, o fragmentos de los mismos, enteramente mediante química sintética. Las secuencias sintéticas se pueden insertar en vectores de expresión y sistemas celulares que contienen los elementos necesarios para el control de la transcripción y la traducción de la secuencia codificadora insertada, en un hospedador adecuado. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas y señales de iniciación específicas (tales como un codón de iniciación ATG y la secuencia de consenso Kozak) que permiten una traducción más eficaz de las secuencias que codifican BNO1. En los casos en los que se inserta la secuencia completa que codifica BNO1, incluyendo su codón de iniciación y secuencias reguladoras aguas arriba, en el vector de expresión apropiado, puede que no sean necesarias unas señales de control adicionales. Sin embargo, en los casos en que solo se inserta la secuencia codificadora o un fragmento de la misma, el vector tiene que proporcionar señales exógenas de control de la traducción, tal y como se ha descrito anteriormente. Tales señales pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema particular de células hospedadoras empleado (Scharf *et al.*, 1994).

- 40 La presente invención permite la preparación de un polipéptido o una proteína purificada de BNO1, a partir de los polinucleótidos de la presente invención o de variantes de los mismos. Con el fin de realizar esto, las células hospedadoras se pueden transfectar con una molécula de ADN tal y como se ha descrito anteriormente. Típicamente, dichas células hospedadoras se transfectan con un vector de expresión que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la invención. Una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedador se puede utilizar para contener y expresar secuencias que codifican BNO1. Estos incluyen, pero no se limitan a los mismos, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de plásmido o cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura, sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión vírica (por ejemplo, baculovirus); o sistemas de células tisulares de ratón o de otros animales o de seres humanos. Las células de mamífero también se pueden utilizar para expresar la proteína de BNO1 usando diversos vectores de expresión que incluyen sistemas de

plásmido, cósmido y víricos tales como sistemas de expresión de virus adenovíricos, retrovíricos o vaccinia. La invención no está limitada por la célula hospedadora empleada.

Las secuencias de polinucleótidos, o variantes de las mismas, de la presente invención se pueden expresar de manera estable en líneas celulares para permitir una producción a largo plazo de proteínas recombinantes en sistemas de mamíferos. Las secuencias que codifican BNO1 se pueden transformar en líneas celulares utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación víricos y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector distinto. El marcador seleccionable confiere resistencia a un agente selectivo, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan convenientemente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de forma estable se pueden propagar utilizando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

La proteína producida por una célula transformada se puede secretar o retener intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Como bien entenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican BNO1 se pueden diseñar para que contengan secuencias señal que dirigen la secreción de BNO1 a través de una membrana celular procariota o eucariota.

Además, una cepa de células hospedadoras se puede seleccionar por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, glicosilación, fosforilación y acilación. La escisión postraducciona de una forma "prepro" de la proteína, también se puede usar para direccionar, plegar y/o para la actividad de una proteína específica. Diferentes células hospedadoras que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades postraduccionales (por ejemplo, células HeLa o CHO), están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) y se pueden seleccionar para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña.

Cuando se necesitan grandes cantidades de BNO1 como para la producción de anticuerpos, se pueden utilizar vectores que dirigen niveles elevados de expresión de BNO1 como los que contienen el promotor inducible del bacteriófago T5 y T7. La presente invención también incluye el uso de los sistemas de expresión descritos anteriormente para la generación y el aislamiento de proteínas de fusión que contienen dominios funcionales importantes de la proteína. Estas proteínas de fusión se utilizan para estudios de ligamiento, estructurales y funcionales, así como para la generación de anticuerpos apropiados.

Con el fin de expresar y purificar la proteína como una proteína de fusión, la secuencia apropiada de ADNc de BNO1 se inserta en un vector que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica otro péptido (por ejemplo, la glutatiónina succinil transferasa). La proteína de fusión se expresa y se recupera a partir de células procariotas o eucariotas. La proteína de fusión se puede purificar a continuación mediante cromatografía de afinidad basada en la secuencia del vector de fusión y la proteína de BNO1 obtenida mediante escisión enzimática de la proteína de fusión.

Los fragmentos de BNO1 también se pueden producir por síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida. La síntesis automatizada se puede lograr mediante el uso del sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin-Elmer). Varios fragmentos de BNO1 se pueden sintetizar por separado y después se combinan para producir la molécula de longitud completa.

De acuerdo con la invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4, que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa involucrado en la degradación de proteínas a través de la ubiquitinación.

La invención también incluye un polipéptido aislado que forma parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en la degradación de proteínas a través de la ubiquitinación que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.

Preferiblemente, la identidad de secuencia se determina utilizando el algoritmo BLASTP con la matriz por defecto BLOSSUM62.

También está previsto un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de un polipéptido tal y como se ha descrito anteriormente, que comprende las etapas de:

- (1) cultivar las células hospedadoras en condiciones eficaces para la producción del polipéptido; y
- (2) recoger el polipéptido.

La proteína de BNO1 sustancialmente purificada o fragmentos de la misma se pueden utilizar a continuación en otros

análisis bioquímicos para establecer la estructura secundaria y terciaria, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X de la proteína de BNO1 o mediante resonancia magnética nuclear (RMN). La determinación de la estructura permite el diseño racional de productos farmacéuticos que interaccionan con la proteína, alteran la configuración de la carga de la proteína o la interacción de la carga con otras proteínas, o modifican su función en la célula.

5 El gen BNO1 se ha identificado a partir de una región de LOH restringida, observada en el cáncer de mama y de próstata, y parece estar regulado a la baja en su expresión en líneas celulares de cáncer obtenidas a partir de estos tejidos. Además, existe una similitud estructural y química en el contexto de las secuencias y motivos, entre las regiones de BNO1 y las proteínas F-box. Las proteínas F-box son los componentes de reconocimiento del sustrato de una clase de las ligasas ubiquitina-E3, la clase denominada "SCF", que están implicadas en la degradación de proteínas a través de la ubiquitinación y la posterior proteólisis llevada a cabo por el proteasoma. Hasta la fecha, las proteínas que parecen estar reguladas por este mecanismo, incluyen oncogenes, genes supresores de tumores, factores de transcripción y otras moléculas de señalización. Estas proteínas influyen en muchos procesos celulares tales como la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, el desarrollo y la diferenciación, así como procesos que están implicados en el desarrollo del cáncer, tales como la regulación del ciclo celular y la apoptosis. También se ha observado que BNO1 interacciona con Skp1, un componente esencial de las ligasas ubiquitina-E3 SCF.

Se ha proporcionado previamente un precedente convincente de una proteína supresora tumoral que pertenece al sistema de degradación ubiquitina-proteasoma, a través del gen VHL. Se ha demostrado que este gen se asocia con elongina C, elongina B y culina-2 en un complejo denominado VCB-CUL-2. Este complejo multiproteico muestra una similitud estructural y funcional con las ligasas de ubiquitina SCF y se ha mostrado que está involucrado en la ubiquitinación de sustratos de VHL.

En conjunto, esta información sugiere que BNO1 está implicado en los procesos que conducen al cáncer, especialmente carcinoma de mama y de próstata, lo más probable a través de su papel en la ubiquitinación de proteínas que participan en importantes funciones celulares, tales como la regulación del ciclo celular. Como BNO1 se expresa en muchos tipos de tejidos, alteraciones en la función de BNO1 también pueden causar patologías en esos tejidos a través de las consiguientes alteraciones en el proceso de ubiquitinación.

Con la identificación de la secuencia de nucleótidos y proteínas de BNO1, se pueden utilizar sondas y anticuerpos dirigidos al gen en una variedad de ensayos de hibridación e inmunológicos, para escrutar y detectar la presencia de un gen normal o mutado o del producto génico. Además, la secuencia de nucleótidos y proteínas del gen BNO1 proporcionada en esta invención, permite métodos terapéuticos para el tratamiento de todas las enfermedades asociadas con anomalías de la función de BNO1, incluyendo cáncer, enfermedad inmune/inflamatoria y trastornos neurológicos, y también permite métodos para el diagnóstico o el pronóstico de todas las enfermedades asociadas con anomalías en la función de BNO1.

Ejemplos de tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, cánceres, trastornos inmunes/inflamatorios y trastornos neurológicos. Los cánceres incluyen adenocarcinoma, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, sarcoma, teratocarcinoma y, en particular, cánceres de mama, próstata, hígado, ovario, cabeza y cuello, corazón, cerebro, páncreas, pulmón, músculo esquelético, riñón, colon, útero, testículos, glándula suprarrenal, sangre, células germinales, placenta, membrana sinovial, amígdalas, cuello uterino, tejido linfático, piel, vejiga, médula espinal, glándula tiroides y estómago. Otros tipos de cáncer pueden incluir los de huesos, médula ósea, vesícula biliar, ganglios, tracto gastrointestinal, paratiroides, pene, glándulas salivales, bazo y timo. Los trastornos inmunes/inflamatorios incluyen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la enfermedad de Addison, el síndrome de dificultad respiratoria de adulto, alergias, espondilitis anquilosante, amiloidosis, anemia, asma, aterosclerosis, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, polienodocrinopatía-candidiasis-distrofia ectodérmica autoinmune (APECED), bronquitis, colecistitis, dermatitis de contacto, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, dermatitis atópica, dermatomiositis, diabetes mellitus, enfisema, linfopenia episódica con linfocitotoxinas, eritroblastosis fetal, eritema nodoso, gastritis atrófica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, gota, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hipereosinofilia, síndrome de intestino irritable, esclerosis múltiple, miastenia grave, inflamación miocárdica o pericárdica, osteoartritis, osteoporosis, pancreatitis, polimiositis, psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, anafilaxia sistémica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, púrpura trombocitopénica, colitis ulcerosa, uveítis, síndrome de Werner, complicaciones de la cicatrización de heridas (por ejemplo, formación de cicatrices), cáncer, hemodiálisis y circulación extracorpórea, infecciones víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias, de protozoos y helmintos, y trauma. Los trastornos neurológicos pueden incluir la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

En el tratamiento de enfermedades asociadas con una disminución de la expresión y/o de la actividad de BNO1, es deseable incrementar la expresión y/o la actividad de BNO1. En el tratamiento de trastornos asociados con el aumento de la expresión y/o de la actividad de BNO1, es deseable disminuir la expresión y/o la actividad de BNO1.

#### 55 Mejora del gen BNO1 o de la función proteica de BNO1

Mejorar, estimular o reactivar el gen BNO1 o la función proteica de BNO1 se puede lograr en una variedad de maneras. También describimos la administración de una molécula de ADN aislada, tal y como se ha descrito anteriormente, a un sujeto que requiere que tal tratamiento se pueda iniciar.

Típicamente, BNO1 se administra a un sujeto para tratar o prevenir un trastorno asociado con la disminución de la actividad y/o la expresión de BNO1.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de una molécula de ADN aislada, tal y como se ha descrito anteriormente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con una disminución de la actividad y/o la expresión de BNO1.

Típicamente, un vector capaz de expresar BNO1 o un fragmento o un derivado del mismo, se puede administrar a un sujeto para tratar o prevenir un trastorno asociado con una disminución de la actividad y/o la expresión de TSG18 incluyendo los descritos anteriormente, pero no limitado a los mismos. La transducción de vectores retrovíricos se utiliza frecuentemente para la terapia génica de células somáticas, debido a su elevada eficacia en la infección y la integración y la expresión estables. El gen BNO1 de longitud completa, o porciones del mismo, se pueden clonar en un vector retrovílico y se pueden dirigir desde su promotor endógeno o desde la repetición terminal larga retrovímica o desde un promotor específico para el tipo de célula diana de interés. Otros vectores víricos se pueden utilizar e incluyen, tal y como se conocen en la técnica, adenovirus, virus adenoasociado, virus vaccinia, papovavirus, lentivirus y retrovirus de origen aviar, murino y humano.

La terapia génica se llevaría a cabo según los métodos establecidos (Friedman, 1991; Culver, 1996). Se preparara un vector que contiene una copia del gen BNO1 ligada a elementos de control de la expresión y que es capaz de replicarse dentro de las células. Alternativamente, el vector puede tener una replicación incorrecta y puede requerir células auxiliares o un virus auxiliar para la replicación y la producción de virus y el uso en terapia génica.

La transferencia génica que emplea métodos no víricos de infección también se puede utilizar. Estos métodos incluyen la inyección directa de ADN, la captación de ADN desnudo en presencia de fosfato de calcio, la electroporación, la fusión de protoplastos o la entrega en liposomas. La transferencia génica también se puede lograr mediante la entrega como una parte de un cromosoma humano artificial o la transferencia génica mediada por receptores. Esto implica ligar el ADN a una molécula de direccionamiento que se unirá a receptores específicos de la superficie celular para inducir la endocitosis y la transferencia del ADN dentro de células de mamífero. Una de tales técnicas utiliza poli-L-lisina para enlazar la asialoglicoproteína al ADN. Un adenovirus también se añade al complejo para destruir los lisosomas y permitir de este modo que el ADN evite la degradación y pase al núcleo. La infusión de estas partículas por vía intravenosa ha dado lugar a la transferencia génica en hepatocitos.

En sujetos afectados que expresan una forma mutada de BNO1, se puede prevenir el trastorno introduciendo en las células afectadas una copia de tipo silvestre del gen, de tal manera que se recombina con el gen mutante. Esto requiere un caso de doble recombinación para la corrección de la mutación del gen. Los vectores para la introducción de genes de esta forma son conocidos en la técnica, y se puede utilizar cualquier vector adecuado. Alternativamente, la introducción de otra copia del gen que es portadora de una segunda mutación en ese gen, se puede emplear con el fin de anular la mutación del gen original y bloquear cualquier efecto negativo.

En sujetos afectados que tienen una expresión reducida de BNO1, un mecanismo de regulación a la baja puede ser la metilación anormal de la isla CpG presente en el extremo 5' del gen. Por lo tanto, en un enfoque alternativo de la terapia, la administración de agentes que eliminan la metilación del promotor de BNO1, reactivará la expresión del gen BNO1 y puede suprimir el fenotipo asociado con la enfermedad.

En un aspecto adicional, un agonista adecuado también puede incluir una molécula o un péptido pequeño que puede imitar la función de BNO1 de tipo silvestre.

#### Inhibición del gen BNO1 o de la función proteica de BNO1

La inhibición de la función de un gen o una proteína mutada se puede lograr por una variedad de vías. También describimos un método para tratar un trastorno asociado con el aumento de la actividad y/o la expresión de BNO1, que comprende administrar un antagonista de BNO1 a un sujeto que requiera tal tratamiento.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un antagonista de BNO1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con el aumento de la actividad y/o de la expresión de BNO1.

Tales trastornos pueden incluir los descritos anteriormente, pero no se limitan a los mismos. En un aspecto de la invención, una molécula de ADN aislada, que es el complemento de una cualquiera de las moléculas de ADN descritas anteriormente y que codifica una molécula de ARN que se hibrida con el ARNm codificado por BNO1, se puede administrar a un sujeto que requiera tal tratamiento.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una molécula de ADN aislada que es el complemento de una molécula de ADN de la invención y que codifica una molécula de ARN que se hibrida con el ARNm codificado por BNO1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con el aumento de la actividad y/o de la expresión de BNO1.

Típicamente, un vector que expresa el complemento del polinucleótido que codifica BNO1 se puede administrar a un sujeto para tratar o prevenir un trastorno asociado con el aumento de la actividad y/o la expresión de BNO1, que incluye

- los descritos anteriormente, pero no se limita a los mismos. Las estrategias no codificadoras (del inglés, "antisense strategies") pueden utilizar una variedad de enfoques incluyendo el uso de oligonucleótidos no codificadores, ribozimas, ADNzimas, inyección de ARN no codificador y transfección de vectores de expresión de ARN no codificador. Muchos métodos para introducir vectores en células o tejidos están disponibles y son igualmente adecuados para su uso *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Para la terapia *ex vivo*, los vectores se pueden introducir en células madre, excepto las células madre embrionarias humanas, tomadas del paciente y propagadas por clonación para un retrotrasplante autólogo en el mismo paciente. La entrega mediante transfección, inyecciones de liposomas o mediante polímeros amino policationicos, se puede lograr usando métodos que son bien conocidos en la técnica. (Por ejemplo, véase Goldman *et al.*, 1997).
- También describimos un método para tratar un trastorno asociado con un aumento de la actividad y/o de la expresión de BNO1 que comprende la administración de un antagonista de BNO1 a un sujeto que requiera tal tratamiento.
- En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un antagonista de BNO1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con el aumento de la actividad y/o la expresión de BNO1.
- Tales trastornos pueden incluir, los descritos anteriormente, pero no se limitan a los mismos. En un aspecto, una proteína purificada de acuerdo con la invención se puede usar para producir anticuerpos que se unen específicamente a BNO1. Estos anticuerpos se pueden usar directamente como antagonistas o indirectamente como un mecanismo de direccionamiento o de entrega para llevar un agente farmacéutico a las células o tejidos que expresan BNO1. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a los mismos, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de cadena sencilla, tal como lo entenderá una persona experta en la técnica.
- Para la producción de anticuerpos, diversos hospedadores que incluyen conejos, ratas, cabras, ratones, seres humanos y otros se pueden inmunizar mediante la inyección de una proteína de la invención o de cualquier fragmento u oligopéptido de la misma, que tiene propiedades inmunogénicas. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica e incluyen, pero no se limitan a los mismos, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina. Los adyuvantes utilizados en los seres humanos incluyen BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.
- Se prefiere que los oligopéptidos, péptidos o fragmentos utilizados para inducir anticuerpos frente a BNO1, tengan una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos aproximadamente 5 aminoácidos y, más preferiblemente, en al menos aproximadamente 10 aminoácidos. También es preferible que estos oligopéptidos, péptidos o fragmentos sean idénticos a una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína natural y que contengan la secuencia de aminoácidos completa de una pequeña molécula de origen natural. Tramos cortos de aminoácidos procedentes de estas proteínas se pueden fusionar con los de otra proteína, tal como KLH, y se pueden producir anticuerpos de la molécula quimérica.
- Los anticuerpos monoclonales de BNO1 se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a las mismas, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos y la técnica de hibridoma de VEB. (Por ejemplo, véase Kohler *et al.*, 1975; Kozbor *et al.*, 1985; Cote *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1984).
- Los anticuerpos también se pueden producir induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o mediante el escrutinio de genotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos que se unen de forma muy específica, tal y como se describe en la bibliografía. (Por ejemplo, véase Orlandi *et al.*, 1989; Winter *et al.*, 1991).
- Los fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específica a BNO1 también se pueden generar. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> producidos por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab generados por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, las genotecas de expresión de Fab se pueden construir para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada. (Por ejemplo, véase Huse *et al.*, 1989).
- Se pueden usar varios inmunoensayos para escrutar e identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas, son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos implican típicamente medir la formación de complejos entre una proteína y su anticuerpo específico. Se prefiere un inmunoensayo de dos sitios basado en anticuerpos monoclonales, que utiliza anticuerpos monoclonales que reaccionan con dos epítopos que no interfieren, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva.
- También describimos un método para el tratamiento de un trastorno que se ha mostrado que está asociado con una actividad y/o una expresión anormal de BNO1, que comprende la administración de una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o un compuesto tal y como se ha descrito anteriormente, a un sujeto que requiera tal tratamiento.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o un compuesto tal y como se ha descrito anteriormente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno que se ha mostrado que está asociado con una actividad y/o una expresión anormal de BNO1.
- En un aspecto adicional, se puede administrar una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido



nucleico, un anticuerpo o un compuesto tal y como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto para tratar o prevenir un trastorno asociado con una actividad y/o una expresión anormal de BNO1 que incluye los proporcionados anteriormente pero no se limitan a los mismos. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se preparan mezclando BNO1 o fragmentos activos de BNO1 o variantes de los mismos que tienen el grado de pureza deseado, con vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables que son bien conocidos. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcar alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).
- En otras realizaciones, cualquiera de los genes, péptidos, antagonistas, anticuerpos, secuencias complementarias o vectores de la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes terapéuticos apropiados. La selección de los agentes adecuados la pueden realizar los expertos en la técnica, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Con el uso de este enfoque, puede ser posible una eficacia terapéutica con dosificaciones más bajas de cada agente, reduciendo de este modo el potencial de efectos secundarios adversos.

#### Detección de fármacos

- De acuerdo con todavía otro aspecto de la invención, los péptidos de la invención, particularmente polipéptidos de BNO1 purificados y células que los expresan, son útiles para la detección de agentes farmacéuticos candidatos en una variedad de técnicas para el tratamiento de trastornos asociados con una disfunción de BNO1. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a las mismas, la utilización de células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de forma estable con moléculas recombinantes que expresan el polipéptido de BNO1 o un fragmento del mismo, preferiblemente en ensayos de unión competitiva. Los ensayos de unión medirán la formación de complejos entre el polipéptido de BNO1, o fragmentos del mismo, y el agente que se está sometiendo a ensayo, o medirán el grado con el que un agente que se está sometiendo a ensayo va a interferir con la formación de un complejo entre el polipéptido de BNO1, o un fragmento del mismo, y un ligando conocido, en particular otros miembros del complejo SCF y sustratos de BNO1 direccionados para la ubiquitinación.

- Otra técnica para escrutar fármacos proporciona una detección rápida de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada hacia el polipéptido de BNO1 (véase el documento de solicitud PCT publicada WO84/03564). En esta técnica mencionada, se puede sintetizar un gran número de pequeños compuestos peptídicos del ensayo sobre un sustrato sólido y se pueden analizar a través de la unión al polipéptido de BNO1 y lavar. El polipéptido de BNO1 unido se detecta a continuación por métodos bien conocidos en la técnica. En una variación de esta técnica, se pueden revestir placas directamente con los polipéptidos purificados para identificar los compuestos del ensayo que interaccionan.

- Un método adicional para seleccionar fármacos implica el uso de líneas de células hospedadoras eucariotas que son portadoras de mutaciones en el gen BNO1. Las líneas de células hospedadoras también son defectuosas a nivel de polipéptido. Se pueden utilizar otras líneas celulares en las que la expresión génica de BNO1 se puede desconectar. Las líneas de células hospedadoras o las células se cultivan en presencia de diversos compuestos farmacéuticos y se mide la tasa de crecimiento de las células hospedadoras para determinar si el compuesto es capaz de regular el crecimiento de las células defectuosas.

- El polipéptido de BNO1 también se puede usar para seleccionar compuestos obtenidos como resultado de la tecnología combinatoria de genotecas. Esta proporciona una forma de someter a ensayo un gran número de sustancias diferentes para estudiar su capacidad para modular la actividad de un polipéptido. Se prefiere el uso de bancos de péptidos (véase el documento de patente WO97/02048) con tales bancos y su uso conocido en la técnica.

- Una sustancia identificada como moduladora de la función del polipéptido puede ser un péptido o un no péptido en la naturaleza. Las "moléculas pequeñas" no peptídicas se prefieren frecuentemente para muchas aplicaciones farmacéuticas *in vivo*. Además, un imitador o un agente mimético de la sustancia se puede diseñar para uso farmacéutico. El diseño de agentes miméticos basándose en un compuesto farmacéuticamente activo conocido (compuesto "guía") es un método común para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Esto es deseable frecuentemente cuando el compuesto activo original es difícil de sintetizar o costoso, o cuando se proporciona un método inadecuado de administración. En el diseño de un agente mimético, se identifican partes particulares del compuesto activo original que son importantes para la determinación de la propiedad diana. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como su farmacóforo. Una vez encontrado, la estructura del farmacóforo sirve de modelo de acuerdo con sus propiedades físicas, utilizando datos que proceden de una variedad de fuentes, incluyendo los datos de difracción de rayos X y RMN. A continuación, se selecciona una molécula molde, a la que se pueden añadir grupos químicos

que imitan el fármaco. La selección puede hacerse de manera que el agente mimético sea fácil de sintetizar, sea probable que sea farmacológicamente aceptable, no se degrade *in vivo* y conserve la actividad biológica del compuesto guía. Una mejora o una modificación adicional se puede llevar a cabo para seleccionar uno o varios agentes miméticos finales, útiles para el ensayo *in vivo* o clínico.

- 5 También es posible aislar un anticuerpo específico de una diana y después explicar su estructura cristalina. En principio, este método produce un fármaco a partir del cual se puede basar el diseño de fármacos posteriores, tal y como se describió anteriormente. Puede ser posible evitar por completo la cristalografía de proteínas, generando anticuerpos anti-idiotípicos (anti-ids) de un anticuerpo funcional, farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión de los anti-ids fuera un análogo del sitio de unión original. El anti-id se  
10 podría usar entonces para aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente.

Cualquiera de los métodos terapéuticos descritos anteriormente se puede aplicar a cualquier sujeto que requiera una terapia de este tipo, incluyendo, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y, lo más preferiblemente, seres humanos.

#### Aplicaciones para diagnóstico y pronóstico

- 15 Las secuencias de polinucleótidos que codifican BNO1 se pueden utilizar para el diagnóstico o el pronóstico *in vitro* de trastornos asociados con una disfunción de BNO1, o una predisposición a tales trastornos. Ejemplos de tales trastornos incluyen, pero no se limitan a los mismos, cánceres, trastornos del sistema inmune/inflamatorio y trastornos neurológicos. Los cánceres incluyen adenocarcinoma, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, sarcoma, teratocarcinoma y, en particular, cánceres de mama, próstata, hígado, ovario, cabeza y cuello, corazón, cerebro, páncreas, pulmón, músculo  
20 esquelético, riñón, colon, útero, testículos, glándula suprarrenal, sangre, células germinales, placenta, membrana sinovial, amígdalas, cuello uterino, tejido linfático, piel, vejiga, médula espinal, glándula tiroidea y estómago. Otros cánceres pueden incluir los de hueso, médula ósea, vesícula biliar, ganglios, tracto gastrointestinal, paratiroides, pene, glándulas salivales, bazo y timo. Los trastornos inmuno/inflamatorios incluyen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la enfermedad de Addison, el síndrome de dificultad respiratoria de adulto, alergias, espondilitis anquilosante, amiloidosis, anemia, asma, aterosclerosis, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, polienodocrinopatía-candidiasis-distrofia ectodérmica autoinmune (APECED), bronquitis, colecistitis, dermatitis de contacto, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, dermatitis atópica, dermatomiositis, diabetes mellitus, enfisema, linfopenia episódica con linfocitotoxinas, eritroblastosis fetal, eritema nodoso, gastritis atrófica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, gota, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, hipereosinofilia, síndrome de intestino irritable, esclerosis múltiple, miastenia grave,  
30 inflamación miocárdica o pericárdica, osteoartritis, osteoporosis, pancreatitis, polimiositis, psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, anafilaxia sistémica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, púrpura trombocitopénica, colitis ulcerosa, uveítis, síndrome de Werner, complicaciones de la cicatrización de heridas (por ejemplo, formación de cicatrices), cáncer, hemodiálisis y circulación extracorpórea, infecciones víricas, bacterianas, fúngicas, parasitarias, de protozoos y helmintos, y trauma. Los trastornos neurológicos pueden incluir la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico o el pronóstico se pueden usar para determinar la gravedad, el tipo o el estadio del estado de la enfermedad con el fin de iniciar una intervención terapéutica apropiada.

- En otra realización de la invención, los polinucleótidos que se pueden utilizar con fines de diagnóstico o pronóstico incluyen secuencias de oligonucleótidos, ADN genómico y moléculas de ADN y ARN complementarias. Los polinucleótidos se pueden utilizar para detectar y cuantificar la expresión génica en tejidos de biopsias en los que mutaciones en BNO1 o una expresión anormal de BNO1 se pueden correlacionar con una enfermedad. El ADN genómico utilizado para el diagnóstico o el pronóstico se puede obtener a partir de células corporales, tales como las presentes en la sangre, biopsia de tejidos, muestra quirúrgica o material de autopsias. El ADN se puede aislar y usar directamente para la detección de una secuencia específica o se puede amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes del análisis. Del mismo modo, el ARN o ADNc también se pueden utilizar, con o sin amplificación mediante PCR. Para detectar una secuencia específica de ácido nucleico, se puede emplear la secuenciación directa de nucleótidos, la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), la hibridación usando oligonucleótidos específicos, la digestión con enzimas de restricción y cartografía, la cartografía mediante PCR, la protección contra ARNasa y varios otros métodos. Los oligonucleótidos específicos de secuencias particulares se pueden sintetizar químicamente y marcar radiactivamente o no radiactivamente e hibridar con muestras individuales, inmovilizadas sobre membranas u otros soportes sólidos o en solución. La presencia, la ausencia o el exceso de expresión de BNO1 se pueden visualizar a continuación usando métodos tales como autorradiografía, fluorometría o colorimetría.

- En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos que codifican BNO1 pueden ser útiles en ensayos que detectan la presencia de trastornos asociados, en particular los mencionados anteriormente. Las secuencias de nucleótidos que codifican BNO1 se pueden marcar por métodos convencionales y añadir a una muestra de fluido o de tejido de un paciente, en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor estándar. Si la cantidad de señal en la muestra del paciente está significativamente alterada en comparación con una muestra testigo, entonces la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican BNO1 en la muestra indica la presencia del trastorno asociado. Tales ensayos también se pueden usar para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico  
60

particular en estudios con animales, en ensayos clínicos o para vigilar el tratamiento de un paciente individual.

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno que se ha mostrado que está asociado con una mutación en BNO1, la secuencia de nucleótidos del gen BNO1 se puede comparar entre tejido normal y tejido enfermo con el fin de establecer si el paciente expresa un gen mutante.

- 5 Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno que se ha mostrado que está asociado con una expresión anormal de BNO1, se establece un perfil normal o estándar de la expresión. Esto se puede lograr combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, tanto animales como humanos, con una secuencia, o un fragmento de la misma, que codifica BNO1, en condiciones adecuadas para la hibridación o la amplificación. La hibridación convencional se puede cuantificar mediante la comparación de los valores obtenidos a partir de sujetos normales con los valores procedentes de un experimento en el que se utiliza una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Otro método para identificar un perfil normal o estándar de la expresión de BNO1 es a través de estudios con RT-PCR cuantitativa. El ARN aislado a partir de células corporales de un individuo normal, particularmente el ARN aislado a partir de células tumorales, se transcribe de forma inversa y se realiza una PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos del gen BNO1, para establecer un nivel normal de expresión del gen.

Los valores estándar obtenidos en estos dos ejemplos se pueden comparar con los valores obtenidos a partir de muestras de pacientes que son sintomáticos de un trastorno. Una desviación de los valores estándar se usa para establecer la presencia de un trastorno.

- 20 Una vez que se ha establecido la presencia de un trastorno y se inicia un protocolo de tratamiento, los ensayos de hibridación o los estudios con RT-PCR cuantitativa se pueden repetir regularmente para determinar si el nivel de expresión en el paciente comienza a aproximarse al que se observa en el sujeto normal. Los resultados obtenidos a partir de sucesivos ensayos se pueden usar para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período que oscila desde varios días a meses.

- 25 En un aspecto, la hibridación con sondas de PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican BNO1 o moléculas estrechamente relacionadas, se puede utilizar para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican BNO1. La especificidad de la sonda, tanto si se prepara a partir de una región altamente específica, por ejemplo, la región reguladora 5', o a partir de una región menos específica, por ejemplo, un motivo conservado, y el rigor de la hibridación o la amplificación, determinarán si la sonda identifica solo secuencias de origen natural que codifican BNO1, variantes alélicas o secuencias relacionadas.

- 30 Las sondas también se pueden utilizar para la detección de secuencias relacionadas y deben tener preferiblemente al menos 50% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias que codifican BNO1. Las sondas para la hibridación de la presente invención pueden ser ADN o ARN, y se pueden obtener a partir de la secuencia de SEQ ID Números: 1 o 3, o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, potenciadores e intrones del gen BNO1 (SEQ ID Números: 5-11).

- 35 Los medios para producir sondas de hibridación específicas para los ADNs que codifican BNO1, incluyen la clonación de secuencias de polinucleótidos que codifican BNO1 o derivados de BNO1 en vectores, para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Las sondas de hibridación pueden estar marcadas con radionucleidos tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S, o con marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de sistemas de acoplamiento de avidina/biotina u otros métodos conocidos en la técnica.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido tal y como se ha descrito anteriormente, en el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno que se ha mostrado que está asociado con BNO1, o una predisposición a tales trastornos.

- 45 Cuando un ensayo de diagnóstico o pronóstico se ha de basar en la proteína de BNO1, son posibles una variedad de métodos. Por ejemplo, el diagnóstico o el pronóstico se pueden conseguir vigilando las diferencias en la movilidad electroforética de proteínas normales y mutantes. Este método será particularmente útil para identificar mutantes en los que están presentes sustituciones de la carga, o en los que inserciones, deleciones o sustituciones han dado como resultado un cambio significativo en la migración electroforética de la proteína resultante. Alternativamente, el diagnóstico se puede basar en diferencias en los patrones de escisión proteolítica de proteínas normales y mutantes, diferencias en las relaciones molares de los diversos residuos de aminoácidos o mediante ensayos funcionales que muestran la función alterada de los productos génicos.

- 50 En otro aspecto, anticuerpos que se unen específicamente a BNO1 se pueden usar para el diagnóstico o el pronóstico de trastornos caracterizados por una expresión anormal de BNO1, o en ensayos para vigilar pacientes que están siendo tratados con BNO1 o con agonistas, antagonistas o inhibidores de BNO1. Los anticuerpos útiles para fines de diagnóstico se pueden preparar de la misma manera que como se ha descrito anteriormente para los agentes terapéuticos. Los ensayos de diagnóstico o pronóstico de BNO1 incluyen métodos que utilizan el anticuerpo y un marcador para detectar BNO1 en fluidos corporales humanos o en extractos de células o tejidos. Los anticuerpos se pueden usar con o sin modificación y se pueden marcar mediante la fijación covalente o no covalente de una molécula informadora.

Una variedad de protocolos para medir BNO1, que incluyen ELISAs, RIAs y FACS, son conocidos en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar unos niveles alterados o anormales de la expresión de BNO1. Los valores normales o convencionales de expresión de BNO1 se establecen combinando fluidos corporales o extractos de células tomadas de sujetos mamíferos normales, preferiblemente humanos, con un anticuerpo de BNO1 en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo convencional se puede cuantificar mediante varios métodos, preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades de BNO1 expresadas en muestras de un sujeto, un testigo y en muestras de la enfermedad procedentes de tejidos de biopsias, se comparan con los valores estándar. La desviación entre los valores estándar y los del sujeto establece los parámetros para diagnosticar una enfermedad.

Una vez que a un individuo se le ha diagnosticado un trastorno, se pueden iniciar los tratamientos efectivos. Estos pueden incluir la administración de un agonista selectivo del BNO1 mutante, a fin de restablecer su función hasta un nivel normal, o la introducción de BNO1 de tipo silvestre, especialmente a través de métodos de terapia génica, tal y como se ha descrito anteriormente. Típicamente, se puede administrar un vector capaz de expresar el gen BNO1 de longitud completa apropiado o un fragmento o un derivado del mismo. En un método alternativo a la terapia, un polipéptido de BNO1 sustancialmente purificado y un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden administrar tal y como se ha descrito anteriormente o se pueden administrar fármacos que pueden sustituir la función de BNO1, o que imitan la acción de BNO1.

En el tratamiento de trastornos que se ha mostrado que están asociados con el aumento de la expresión y/o la actividad de BNO1, el individuo afectado se puede tratar con un antagonista selectivo, tal como un anticuerpo de la proteína correspondiente o una sonda no codificante (complementaria) para el gen correspondiente, tal y como se ha descrito anteriormente, o mediante el uso de fármacos que pueden bloquear la acción de BNO1.

#### Micromatrices

En otra realización, ADNc completos, oligonucleótidos o fragmentos más largos obtenidos a partir de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento, se pueden utilizar como dianas en una micromatriz. La micromatriz se puede utilizar para controlar simultáneamente el nivel de expresión de un gran número de genes y para identificar variantes genéticas, mutaciones y polimorfismos. Esta información se puede utilizar para determinar la función génica, para comprender las bases genéticas de un trastorno, para diagnosticar o pronosticar un trastorno y para desarrollar y controlar las actividades de agentes terapéuticos. Las micromatrices se pueden preparar, utilizar y analizar usando métodos conocidos en la técnica. (Por ejemplo, véase Schena *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1997).

#### Hospedadores transformados

La presente invención también proporciona la producción de modelos animales no humanos modificados genéticamente (con gen desactivado (del inglés "knock-out"), con inserción de secuencias génicas (del inglés "knock-in") y transgénicos) transformados con las moléculas de ADN de la invención. Estos animales son útiles para el estudio de la función del gen BNO1, para estudiar los mecanismos de una enfermedad en lo que se refiere al gen BNO1, para escrutar compuestos farmacéuticos candidatos, para la creación de cultivos de células de mamífero explantados que expresan la proteína o una proteína mutante y para la evaluación de posibles intervenciones terapéuticas.

El gen BNO1 se puede haber inactivado mediante una delección desactivadora del gen y, por lo tanto, se proporcionan animales no humanos modificados genéticamente con gen desactivado.

Las especies animales que son adecuadas para uso en los modelos animales de la presente invención son ratas, ratones, hámsteres, cobayas, conejos, perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos y primates no humanos, tales como monos y chimpancés. Para los estudios iniciales, son muy deseables los ratones y las ratas genéticamente modificados, debido a su mantenimiento relativamente sencillo y a una vida más corta. Para ciertos estudios, levaduras o invertebrados transgénicos pueden ser adecuados y preferidos porque permiten una detección rápida y proporcionan un manejo mucho más fácil. Para estudios a largo plazo, los primates no humanos pueden ser deseables debido a su similitud con los seres humanos.

Para crear un modelo animal con BNO1 mutado, se pueden emplear varios métodos. Estos incluyen la generación de una mutación específica en un gen animal homólogo, la inserción de un gen humano de tipo silvestre y/o un gen animal humanizado por recombinación homóloga, la inserción de un gen humano mutante (única o múltiple) en forma de estructuras artificiales de ADNc genómico o minigén, usando elementos promotores de tipo silvestre, mutantes o artificiales, o la inserción de fragmentos modificados artificialmente del gen endógeno mediante recombinación homóloga. Las modificaciones incluyen la inserción de codones de detención mutantes, la delección de secuencias de ADN o la inclusión de elementos de recombinación (sitios lox p) reconocidos por enzimas tales como la recombinasa Cre.

Para crear un ratón transgénico, el cual se prefiere, una versión mutante de BNO1 se puede insertar en una línea germinal de ratón utilizando técnicas convencionales de microinyección de ovocitos o transfección o microinyección dentro de células madre embrionarias. Alternativamente, si se desea inactivar o reemplazar el gen BNO1 endógeno, se puede aplicar una recombinación homóloga utilizando células madre embrionarias murinas.

Para la inyección de ovocitos, una o varias copias del gen BNO1 mutante o de tipo silvestre se pueden insertar en el

pronúcleo de un ovocito de ratón recién fertilizado. El ovocito se reimplanta después en una madre adoptiva pseudopregñada. Los ratones nacidos vivos se pueden seleccionar entonces según los integrantes, utilizando el análisis del ADN de la cola, buscando la presencia de secuencias de genes BNO1 humanos. El transgén puede ser una secuencia genómica completa inyectada como YAC, BAC, PAC o bien otro fragmento de ADN cromosómico, un ADNc ya sea con el promotor natural o con un promotor heterólogo, o un minigén que contiene toda la región codificadora y otros elementos que son necesarios para una expresión óptima.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de animales no humanos modificados genéticamente, tal como se ha descrito anteriormente, para el escrutinio de compuestos farmacéuticos candidatos.

La identificación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de ambas isoformas de BNO1, permite la identificación de sustratos proteicos específicos de BNO1, utilizando estudios de interacción de proteínas, tales como el análisis del doble híbrido en levadura, como lo entenderán los expertos en la técnica. Estos sustratos proteicos serían dianas para la degradación a través de la ubiquitinación mediada por la ligasa ubiquitina-E3 que contiene BNO1. Cada isoforma de BNO1 puede compartir sustratos proteicos comunes o puede interaccionar con sustratos específicos de la isoforma.

También describimos un complejo de BNO1 de tipo silvestre y un sustrato específico de BNO1 que está destinado a una degradación mediante ubiquitinación.

También describimos un complejo de BNO1 y proteínas del complejo de ligasa ubiquitina-E3

También describimos un complejo de BNO1 de tipo silvestre y la proteína Skp1.

También describimos un ácido nucleico que codifica un polipéptido mutante de BNO1 que no puede formar un complejo con las proteínas de tipo silvestre con las que BNO1 de tipo silvestre forma un complejo. Típicamente, una de estas proteínas es Skp1, mientras que otras son sustratos proteicos específicos de BNO1 destinados a la degradación mediante ubiquitinación.

También describimos un polipéptido mutante de BNO1 que no puede formar un complejo con proteínas de tipo silvestre con las que BNO1 de tipo silvestre forma un complejo. Típicamente, una de estas proteínas es Skp1 mientras que otras son sustratos proteicos específicos de BNO1 destinados a la degradación mediante ubiquitinación.

También describimos el uso de complejos, tal y como se ha descrito anteriormente, en el escrutinio de compuestos farmacéuticos candidatos. También se puede escrutar en busca de un fármaco que sustituya la actividad de BNO1 en un paciente que carece de BNO1.

Se entenderá claramente que, aunque en el presente documento se hace referencia a un número de publicaciones de la técnica anterior, esta referencia no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica, en Australia o en cualquier otro país. En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, salvo cuando el contexto requiere lo contrario.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de tumores con pérdida alélica intersticial y terminal en el brazo del cromosoma 16q en las dos series de muestras tumorales. Los marcadores polimórficos se enumeran de acuerdo con su orden en 16q desde el centrómero al telómero y los marcadores utilizados para cada serie se indican con X. Los números de identificación de tumores se muestran en la parte superior de cada columna. A la derecha de la figura, se indican las tres regiones más pequeñas de pérdida de heterocigosidad.

Figura 2. Análisis por transferencia Northern del gen BNO1. El tamaño del gen BNO1 en kilobases se indica mediante una flecha en el lado izquierdo del Northern. La transferencia contenía ARN de los siguientes tejidos: 1: Glándula mamaria; 2: Médula ósea; 3: Testículo; 4: Ovario; 5: Útero; 6: Próstata; 7: Estómago; 8: Vejiga; 9: Médula espinal; 10: Cerebro; 11: Páncreas; 12: Tiroides. Una banda aislada de aproximadamente 3,6 Kb se observó en todos los tejidos excepto en la médula ósea. La expresión más potente del gen se observó en el cerebro.

Figura 3. Alineación de la secuencia de F-box de BNO1 en comparación con la secuencia de consenso de F-box de acuerdo con la descripción de Kipreos y Pagano (2000). Se utiliza el código de aminoácidos de una sola letra. Las mayúsculas en negrita indican los residuos que se encuentran en más del 40% de las secuencias de F-box; las mayúsculas sin negrita indican residuos que se encuentran en el 20-40% de las secuencias de F-box; las letras minúsculas en negrita indican los residuos que se encuentran en el 15-19% de las F-box; las letras minúsculas sin negrita indican residuos encontrados en el 10-14% de las F-box. La línea superior representa el motivo de F-box de BNO1 que indica un alto grado de homología con el de consenso.

Figura 4. Análisis de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa del gen BNO1 en líneas celulares de cáncer de mama. El número de copias de BNO1 en el ADNc de glándula mamaria normal (mama) se estableció arbitrariamente para un "valor de referencia" de 1.0e+06 (barra blanca). Los números de copias de ADNc de líneas celulares de cáncer de mama y de otros tejidos normales se calcularon en relación con el "valor de referencia". Las barras de color gris represen-

tan la regulación a la baja de la expresión en número de veces del amplicón, en comparación con la referencia del valor de referencia, mientras que las barras de color negro representan la regulación al alza de la expresión en número de veces del amplicón de la referencia del valor de referencia. Nota: las líneas celulares replicadas (a y b) representan cultivos celulares independientes, el aislamiento del ARN total y las reacciones de transcripción inversa. Las réplicas servían como otro nivel de control para vigilar la variabilidad de la expresión genética como resultado de las diferencias en las eficacias de la confluencia celular, la integridad del ARN total y la transcripción inversa.

### Modos de realizar la invención

#### EJEMPLO 1: Recogida de material a partir de pacientes con cáncer de mama

Para este estudio se analizaron dos series de pacientes con cáncer de mama. La clasificación histopatológica de cada espécimen tumoral la realizaron nuestros colaboradores de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1981). Los pacientes se catalogaron histopatológicamente según el método modificado de Bloom y Richardson (Elston y Ellis, 1990) y el material de los pacientes fue obtenido con la aprobación de los Comités locales de Ética Médica. El ADN del tejido tumoral y el ADN de sangre periférica de la misma persona se aislaron tal como se ha descrito anteriormente (Devilee *et al.*, 1991) utilizando protocolos convencionales de laboratorio.

La serie 1 consistía en 189 pacientes operados entre 1986 y 1993 en tres hospitales holandeses, una universidad holandesa y dos centros periféricos. El tejido tumoral se congeló rápidamente a las pocas horas de la resección. Para el aislamiento del ADN, se seleccionó un bloque de tejido únicamente si contenía por lo menos 50% de células tumorales, tras el examen de secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina, realizado por un patólogo. Los bloques de tejido que contenían menos de 50% de células tumorales se excluyeron de un análisis adicional.

La serie 2 consistía en 123 pacientes operados entre 1987 y 1997 en el Centro Médico Flinders en Adelaida, Australia. De todos ellos, 87 se recogieron como especímenes frescos pocas horas después de la resección quirúrgica, confirmados como tejido maligno por un análisis patológico, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Las 36 muestras restantes de tejido tumoral se obtuvieron a partir de bloques de tumores de archivo embebidos en parafina. Antes del aislamiento del ADN, las células tumorales se microdisecionaron desde secciones de tejido montadas en portaobjetos de vidrio, con el fin de obtener al menos 80% de células tumorales. En algunos casos, no había sangre periférica disponible, de tal manera que en su lugar se utilizó tejido de ganglios linfáticos no malignos embebido en parafina, identificado patológicamente.

#### EJEMPLO 2: Análisis de LOH de marcadores del cromosoma 16q en muestras de cáncer de mama.

Con el fin de identificar la posición de los genes asociados con el cáncer de mama, se llevó a cabo el análisis de LOH de muestras tumorales. Un total de 45 marcadores genéticos que cartografiaban el cromosoma 16 se utilizaron para el análisis de LOH del tumor de mama, y se emparejaron con muestras normales de ADN recogidas para este estudio. La Figura 1 indica para qué serie tumoral se utilizaron y su posición citogenética. Los detalles relativos a todos los marcadores se pueden obtener a partir de la base de datos del genoma (GDB) en <http://www.gdb.org>. El orden físico de los marcadores con respecto uno al otro se determinó a partir de una combinación de información en GDB, cartografiando sobre un mapa híbrido celular somático del cromosoma 16 (Callen *et al.*, 1995) y a través de la información de la secuencia genómica.

Se emplearon cuatro métodos alternativos para el análisis de LOH:

1) Para los marcadores de RFLP y VNTR, se utilizó la transferencia Southern para someter a ensayo el desequilibrio alélico. Estos marcadores se utilizaron solo sobre un subconjunto de muestras. Los métodos utilizados eran tal y como se han descrito previamente (Devilee *et al.*, 1991).

2) Los marcadores de microsatélites fueron amplificados a partir de ADN tumoral y normal usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incorporando metodologías convencionales (Weber y May, 1989; Sambrook *et al.*, 1989). Una reacción típica consistía en 12 µl y contenía 100 ng de molde, 5 pmol de ambos cebadores, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µCi[α-<sup>32</sup>P]dCTP, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1,2 µl de tampón Supertaq (HT biotechnologies). Se utilizó un formador de imágenes de fósforo de tipo 445 SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) para cuantificar los resultados ambiguos. En estos casos, el factor de desequilibrio alélico (FDA) se determinó como el cociente de las relaciones de altura de pico de la pareja de ADN normal y tumoral. El umbral de desequilibrio alélico se definió como una reducción del 40% de un alelo, de acuerdo con un FDA ≥1,7 o ≤0,59. Este umbral está de acuerdo con la selección de bloques de tejidos tumorales que contenían al menos 50% de células tumorales con un intervalo de error del 10%. El umbral de retención se ha determinado previamente dentro de un intervalo de 0,76 a 1,3 (Devilee *et al.*, 1994). Esto deja un intervalo de FDAs (0,58 - 0,75 y 1,31 - 1,69) para el que no se ha tomado ninguna decisión definitiva. Esta "zona gris" se indica por cuadros grises en la Figura 1 y los tumores que solo tienen valores en la "zona gris" se descartaron completamente del análisis.

3) El tercer método para determinar el desequilibrio alélico era similar al segundo método anterior, sin embargo, se omitió dCTP marcada radiactivamente. En su lugar, se realizó una PCR de marcadores de microsatélites polimórficos con uno de los cebadores de la PCR marcado con fluorescencia con FAM, TET o HEX. El análisis de los productos de la PCR generados se realizó en un secuenciador automático ABI 377 (PE Biosystems), utili-

zando geles de poliacrilamida al 6% que contenían urea 8 M. Los valores de la altura de los picos y los tamaños de los picos se analizaron con el programa GeneScan (PE Biosystems). Se utilizaron los mismos umbrales para desequilibrio alélico, retención y zonas grises que en el análisis radiactivo.

4) También se utilizó un sistema basado en fluorescencia alternativa. En este caso, los cebadores de la PCR se marcaron con fluoresceína o hexaclorofluoresceína. Los volúmenes de la reacción de PCR eran de 20 µl e incluían 100 ng de molde, 100 ng de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1-2 mM, 1X tampón AmpliTaq Gold y 0,8 unidades de enzima AmpliTaq Gold (Perkin Elmer). Las condiciones de la ciclación eran 10 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, seguidos por 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los amplímeros de la PCR fueron analizados en un secuenciador automatizado ABI 373 (PE Biosystems), utilizando el programa GeneScan (PE Biosystems). El intervalo del umbral de FDA para la retención alélica se definió como 0,61 - 1,69, la pérdida alélica como ≤0,5 o ≥2,0, o la "zona gris" como 0,51 - 0,6 o 1,7 - 1,99.

Los tres primeros métodos se aplicaron a la primera serie de tumores mientras que el último método se adoptó para la segunda serie de muestras tumorales. Para el análisis estadístico, se realizó una comparación de los datos de desequilibrio alélico para la validación de los diferentes métodos de detección y de las diferentes series tumorales, utilizando la prueba de Chi-cuadrado.

La identificación de la región más pequeña de solapamiento (SRO) implicada en LOH es instrumental para reducir las posibilidades de la posición del gen que es diana de LOH. La Figura 1 muestra los resultados de LOH para muestras tumorales, que muestran pequeñas regiones de pérdida (es decir, LOH intersticial y telomérica) y no incluye muestras que mostraron LOH compleja (pérdida y retención alternas de marcadores). Al comparar los dos grupos de muestras, aparecen al menos tres regiones compatibles, estando dos en el telómero en la banda 16q24.3 y una en 16q22.1. La región en 16q22.1 se define por los marcadores D16S398 y D16S301 y se basa en los casos de LOH intersticial observados en tres tumores de la serie 1 (239/335/478) y un tumor de la serie 2 (237). En el telómero (16q24.2 - 16q24.3), la primera región se define por los marcadores D16S498 y D16S3407 y se basa en cuatro tumores de la serie 2 (443/75/631/408), mientras que la segunda región (16q24.3) se extiende desde D16S3407 al telómero y se basa en un tumor de la serie 1 (559) y tres de la serie 2 (97/240/466). La LOH limitada al telómero pero que implicaba ambas regiones identificadas en este sitio, se pudo encontrar en 17 muestras tumorales adicionales.

Otros estudios han mostrado que el brazo largo del cromosoma 16 también es una diana para la LOH en tumores de próstata, de pulmón, hepatocelular, de ovario, de rhabdomyosarcoma y de Wilms. Un análisis detallado de los carcinomas de próstata ha revelado un solapamiento en las regiones más pequeñas de LOH observadas en este tipo de cáncer, con las observadas con cáncer de mama, lo que sugiere que 16q alberga un gen implicado en muchos tipos de tumores.

### EJEMPLO 3: Construcción de un mapa físico de 16q24.3

Para identificar nuevos genes candidatos de cáncer de mama que se cartografiaban en las regiones de solapamiento más pequeñas en 16q24.3, se necesitaba un cóntigo basado en clones para el mapa físico que cubriera esta región. Al comienzo de esta fase del proyecto, los fragmentos de ADN genómico clonados, utilizados más comúnmente y de fácil acceso estaban contenidos en vectores lambda, cósmidos o YAC. Durante la construcción de todos los mapas físicos del cromosoma 16, clones procedentes de una variedad de genotecas de YAC se incorporaron en el mapa (Doggett *et al.*, 1995). Estos incluían clones procedentes de una genoteca de YAC específica del cromosoma 16 clasificada por flujo (McCormick *et al.*, 1993), de las genotecas CEPH Mark I y MegaYAC y de una genoteca de YAC de medio-telómero (Riethman *et al.*, 1989). Un análisis de STS y Southern detallado de los clones de YAC que cartografiaban 16q24.3, estableció que muy pocos estaban localizados entre el punto de ruptura del híbrido celular somático CY2/CY3 y el telómero del brazo largo. Sin embargo, aquellos que se habían reorganizado en esta región proporcionaron resultados incompatibles con la cartografía y se sospechó que se habían reorganizado o eliminado. El hecho de que los clones de YAC producen sustratos de secuenciación débiles, junto con la dificultad para aislar el ADN humano clonado, la opción inicial preferida fue un mapa físico basado en clones de cósmidos.

Se había construido previamente una genoteca de cósmidos específicos del cromosoma 16 clasificada por flujo (Longmire *et al.*, 1993), con clones de cósmidos individuales reticulados en matrices de alta densidad sobre membranas de nailon. Estos filtros contenían colectivamente ~15.000 clones que representaban una cobertura de aproximadamente 5,5 veces el cromosoma 16. Los cósmidos individuales que cartografiaban las regiones decisivas en 16q24.3, se identificaron mediante la hibridación de estas membranas con marcadores identificados por cartografiar la región mediante este estudio y estudios anteriores. La estrategia para alinear clones de cósmidos solapantes se basa en su contenido en STS y en el patrón de digestión con endonucleasas de restricción. Aquellos clones que se extendían lo más lejos posible de cada cóntigo inicial, se utilizaron después para recorrer el cromosoma mediante la hibridación de nuevo de los extremos de estos cósmidos con las matrices de cósmidos de alta densidad. Este proceso continuó hasta que todos los cóntigos iniciales estaban unidos y, por lo tanto, la región que definía la posición de los genes supresores de tumores de cáncer de mama estaría contenida dentro del mapa. Los clones de cósmidos individuales que representaban el mínimo solapamiento posible en el cóntigo, se utilizaron a continuación para la identificación de secuencias transcritas mediante atrapamiento de exones y para la secuenciación genómica.

El cromosoma 16 se clasificó a partir del híbrido CY18 de células somáticas de ratón/humano, que contenía este cromosoma como el único ADN humano, y el ADN de CY18 parcialmente digerido con *Sau3A* se ligó en el sitio de clonación de *Bam*HI del vector del cósmido sCOS-1. Todas las matrices se hibridaron y se lavaron usando métodos descritos en Longmire *et al.* (1993). Resumiendo, los 10 filtros se hibridaron previamente en 2 botellas grandes durante al menos 2 horas en 20 ml de una solución que contenía 6X SSC, EDTA 10 mM (pH 8,0); 10X solución de Denhardt, 1% de SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado a 65°C. Las hibridaciones durante una noche con sondas marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP se realizaron en 20 ml de solución de hibridación de nuevo aporte a 65°C. Los filtros se lavaron secuencialmente en soluciones de 2X SSC; 0,1% de SDS (lavado a temperatura ambiente), 2X SSC, 0,1% de SDS (temperatura ambiente durante 15 minutos), 0,1X SSC, 0,1% de SDS (temperatura ambiente durante 15 minutos) y 0,1X SSC, 0,1% de SDS (dos veces durante 30 minutos a 50°C si es necesario). Las membranas se expusieron a -70°C entre 1 y 7 días.

Los marcadores iniciales utilizados para escrutar la matriz de cósmidos eran los conocidos por estar localizados por debajo de los puntos de ruptura de las células híbridas somáticas CY2/CY3 y el telómero del brazo largo (Callen *et al.*, 1995). Estos incluían tres genes, *CMAR*, *DPEP1* y *MC1R*; el marcador de microsatélites D16S303; un fragmento del extremo del cósmido 317E5, que contenía el gen *BBC1*; y cuatro clones de ADNc, yc81e09, yh09a04, D16S532E y ScDNA-C113. El clon de ADNc del consorcio IMAGEN, yc81e09, se obtuvo a través del escrutinio de una genoteca de ADNc cebada con oligo-dT de cerebro infantil, normalizada (Soares *et al.*, 1994), con el inserto procedente del clon de ADNc ScDNA-A55. Tanto el clon ScDNA-A55 como el ScDNA-C113 se aislaron originalmente a partir de una genoteca de ADNc heteronuclear cebada con hexámero, construida a partir del híbrido CY18 de células somáticas de ratón/humano (Whitmore *et al.*, 1994). El clon de ADNc de IMAGEN yh09a04 se identificó a partir de una selección de ADNc directa del cósmido 37B2 que se había observado previamente que se cartografiaba entre el punto de ruptura CY18A(D2) y el telómero 16q. El EST, D16S532E, también se cartografiaba en la misma región. Con posterioridad a estos escrutinios iniciales, se utilizaron fragmentos de restricción que representaban los extremos de cósmidos para identificar clones solapantes adicionales.

El conjunto de cóntigos se basaba en métodos descritos previamente (Whitmore *et al.*, 1998). Más tarde, durante la construcción del mapa físico, se pusieron a disposición genotecas genómicas clonadas en vectores BAC o PAC (Genome Systems o Rosewell Park Cancer Institute). Estas genotecas se escrutaron para ayudar en el recorrido por el cromosoma o cuando se toparon con huecos que no se pudieron puentear usando los filtros de cósmidos. Todos los filtros de BAC y PAC se hibridaron y se lavaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Inicialmente, las membranas se hibridaron previamente por separado en botellas grandes de vidrio durante al menos 2 horas en 20 ml de 6X SSC; 0,5% de SDS; 5X Denhardt; 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65°C. Las hibridaciones durante una noche con sondas marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP se realizaron a 65°C en 20 ml de una solución que contenía 6X SSC; 0,5% de SDS; 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se lavaron secuencialmente en soluciones de 2X SSC, 0,5% de SDS (temperatura ambiente, 5 minutos), 2X SSC, 0,1% de SDS (temperatura ambiente, 15 minutos) y 0,1X SSC, 0,5% de SDS (37°C 1 hora si es necesario). Los clones de PAC o BAC identificados se alinearon con el cóntigo existente basándose en su patrón de enzimas de restricción o formaban cóntigos únicos que se extendían mediante el escrutinio de filtros adicionales.

Cuando se observó que el microsatélite D16S303 era el marcador más telomérico en la región 16q24.3 (Callen *et al.*, 1995), se utilizó la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con cromosomas normales en metafase, utilizando cósmidos completos cartografiados en las proximidades de este marcador, para definir el límite telomérico del cóntigo. El ADN del cósmido completo se sometió a desplazamiento de mellas con biotina-14-dATP y se hibridó *in situ* con una concentración final de 20 ng/µl con metafases de 2 machos normales. El método FISH se había modificado en comparación con el previamente descrito (Callen *et al.*, 1990). Los cromosomas se tiñeron antes del análisis tanto con yoduro de propidio (como tinción de contraste) como con DAPI (para la identificación de cromosomas). Imágenes de preparaciones en metafase se capturaron por una cámara CCD refrigerada, utilizando la colección de imágenes CytoVision Ultra y un sistema de mejora (Applied Image Int. Ltd.). El cósmido 369E1 mostraba señales fluorescentes claras en el telómero del brazo largo del cromosoma 16. Sin embargo, esta sonda también proporcionó una señal clara en los telómeros de los brazos cromosómicos 3q, 7p, 9q, 11p y 17p. Por el contrario, el cósmido 439G8, que se cartografió próximo a D16S303, proporcionó señales fluorescentes solo en 16qter sin ninguna señal compatible detectada en otros telómeros. Estos resultados nos han permitido establecer el marcador de microsatélites D16S303 como el límite de la transición desde la eucromatina hasta las repeticiones subteloméricas, proporcionando un límite telomérico para el cóntigo (Whitmore *et al.*, 1998).

Se ha establecido un mapa físico de alta densidad que consistía en clones de cósmido, BAC y PAC, el cual se extiende aproximadamente 3 Mb desde el telómero del brazo largo del cromosoma 16. Este cóntigo se extiende más allá del punto de ruptura del híbrido celular somático CY2/CY3 e incluye las 2 regiones de LOH mínima, identificadas en la región 16q24.3 en muestras de cáncer de mama. Hasta la fecha, existe un solo hueco de tamaño desconocido en el cóntigo y se cerrará mediante experimentos adicionales de extensión del cóntigo. El grado de cobertura ha permitido la identificación del grupo de clones con mínimo solapamiento posible que se utilizaron posteriormente como moldes para métodos de identificación de genes, tales como la captura de exones y la secuenciación de ADN genómico.

**EJEMPLO 4:** Identificación de los genes candidatos de cáncer de mama mediante análisis de la secuencia de ADN genómico.



Clones de BAC y PAC seleccionados con un mínimo solapamiento a partir del cóntigo del mapa físico, se secuenciaron con el fin de ayudar en la identificación de los genes candidatos de cáncer de mama. Se preparó ADN a partir de clones seleccionados utilizando un kit para aislamiento de ADN de gran tamaño (Qiagen). Aproximadamente el 25-50 µg de ADN se cortó a continuación mediante nebulización (10 psi durante 45 segundos) y se establecieron extremos romos utilizando metodologías convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación, las muestras se aplicaron sobre un gel de agarosa con el fin de aislar el ADN en el intervalo de tamaño de 2-4 kb. Estos fragmentos se limpiaron eliminando la agarosa utilizando columnas QIAquick (Qiagen), se ligaron en puc18 y se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH10B o DH5a competentes. Se aisló el ADN a partir de clones transformados y se secuenció utilizando cebadores específicos del vector en un secuenciador ABI377. El análisis de la secuencia genómica se realizó empleando un programa informático PHRED, PHRAP y GAP4 en una estación de trabajo SUN. Para ayudar en la generación de cóntigos grandes de la secuencia genómica, la información presente en la base de datos de secuencias genómicas de gran productividad (htgs) en el NCBI, fue incorporada en la fase de ensamblado del análisis de la secuencia. En los cóntigos resultantes de la secuencia genómica se enmascararon las repeticiones y se analizaron usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para identificar la homología de nucleótidos y proteínas con secuencias en las bases de datos de GenBank no redundantes y de EST en el NCBI. La secuencia genómica también se analizó para estudiar la estructura génica prevista, utilizando el programa GENSCAN.

Los clones de ADNc homólogos del consorcio IMAGEN fueron adquiridos de Genome Systems y se secuenciaron. Estos tramos más largos de secuencia se compararon después con genes conocidos mediante comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, utilizando los procedimientos anteriores. Cualquier secuencia que se expresa en la mama se considera que es un gen candidato de cáncer de mama. Aquellos genes cuya función podría implicarlos en el proceso carcinogénico, tal y como se había previsto a partir de las búsquedas de homología con proteínas conocidas, fueron tratados como los candidatos más probables. La evidencia de que un candidato particular es el gen responsable, proviene de la identificación de alelos defectuosos del gen en individuos afectados o a partir del análisis de los niveles de expresión de un gen candidato particular en muestras de cáncer de mama, en comparación con tejidos normales testigos.

#### **EJEMPLO 5: Identificación de la secuencia de BNO1**

##### Análisis de la secuencia genómica

Secuencias procedentes de clones BAC que se cartografiaban cerca del punto de ruptura de CY2/CY3, se ensamblaron y se utilizaron en búsquedas de homología con BLASTN en la base de datos dbEST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Un gran número de clones de ADNc, se identificaron por formar parte de la secuencia en esta región y éstos se pudieron caracterizar adicionalmente en distintas agrupaciones de UniGene.

El clon de ADNc humano de IMAGE, 46795, correspondiente a la agrupación de UniGene Hs.7970, se secuenció y se utilizó en otras búsquedas de homología en bases de datos. Esto identificó un clon de ADNc solapante presente en la base de datos no redundante (GenBank número de orden AL117444) que extendía la secuencia del clon 46795 más allá de 5'. Como esta secuencia 5' adicional también estaba presente en la secuencia genómica situada en 5' de la secuencia del clon 46795, se confirmó que AL117444 lo más probablemente pertenecía al transcrito Hs.7970. Para verificar este hecho, se realizó una RT-PCR.

Brevemente, ARNm poliA<sup>+</sup> procedente de una glándula mamaria normal (Clontech) se cebó inicialmente con un cebador oligo-dT y se transcribió de forma inversa utilizando el kit de RT de OmniScript (Qiagen) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Las reacciones de control se incluyeron para cada molde de ARN en las que se omitía la transcriptasa inversa de la etapa de síntesis del ADNc. Esto era para determinar la presencia de cualquier contaminación del ADN genómico en las muestras de ARN. La primera hebra de ADNc resultante se amplificó con PCR usando los cebadores AL-1 (específico para AL117444; SEQ ID NO: 20) y 7970-1 (específico para el extremo 3' de Hs.7970; SEQ ID NO: 21) utilizando el kit de HotStarTag (Qiagen) en un volumen de reacción de 10 µl durante 35 ciclos. Inicialmente, los cebadores para el gen de mantenimiento testigo, Esterasa D (SEQ ID Números: 22 y 23) se utilizaron en una reacción distinta para confirmar la presencia de moldes de ADNc para cada reacción de transcripción inversa. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 1. Estos experimentos confirmaron que el clon de ADNc AL117444 y de IMAGE 46795, pertenecían al transcrito Hs.7970.

##### Análisis Northern

Para determinar el tamaño del gen correspondiente a Hs.7970, una transferencia Northern poliA<sup>+</sup> obtenida a partir de Clontech se investigó con una porción del gen que se había generado mediante PCR usando los cebadores BNO1-2 (SEQ ID NO: 24) y BNO1-3 (SEQ ID NO: 25). La Tabla 1 enumera las secuencias de los cebadores utilizados. Las hibridaciones se llevaron a cabo en 10 ml de solución ExpressHyb (Clontech) durante una noche a 65°C. Los filtros se lavaron de acuerdo con las condiciones del fabricante. La Figura 2 muestra los resultados de la hibridación. Una sola banda de aproximadamente 3,6 kb se detectó en la glándula mamaria, testículo, ovario, útero, próstata, estómago, vejiga, médula espinal, cerebro, páncreas y tiroides. La expresión más fuerte del gen se observó en el cerebro. El tamaño del ARNm correspondiente a Hs.7970 tal y como se determinó por la hibridación Northern, indicaba que se necesitaba obtener una secuencia 5' adicional para el gen.

Identificación de la secuencia 5'

Para identificar una secuencia 5' adicional para el transcrito Hs.7970, se utilizaron secuencias de ADNc presentes en dbEST correspondientes al ortólogo de ratón. El clon de ratón que se extendía más 5' (AU080856) incluía un sitio putativo de inicio de la traducción. La alineación de AU080856 con la secuencia genómica humana que contenía Hs.7970 definía la secuencia humana correspondiente de esta transcripción, hasta un sitio de inicio de la traducción idéntico. Se realizaron otros experimentos de RT-PCR que confirmaron la presencia de esta secuencia 5' en el transcrito Hs.7970 humano. Además, búsquedas adicionales en dbEST blast identificaron clones de ADNc humanos que contenían el extremo 5' del gen (por ejemplo, el clon de IMAGE 3958783).

Experimentos de RT-PCR indicaron también que Hs.7970 existe como una isoforma de corte y empalme alternativos. Esta variante se debe a la inclusión de un exón adicional en marco (exón 2.5) situado entre los exones 2 y 3.

Además, estos experimentos han establecido que el transcrito Hs.7970, denominado BNO1, existe como dos isoformas de corte y empalme alternativos. Una isoforma tiene 3.574 pb de longitud (SEQ ID NO: 1) y está compuesta por 9 exones que abarcan aproximadamente 55 kb de ADN genómico, mientras que la segunda forma de BNO1, que contiene el exón 2.5, tiene 3661 pb de longitud (SEQ ID NO: 3). La Tabla 2 muestra la estructura genómica del gen que indica el tamaño de los intrones y exones. El análisis de las isoformas de BNO1 indica que la isoforma 1 (menos el exón 2.5) tiene un marco de lectura abierto de 1.617 nucleótidos que codifica una proteína de 539 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). La isoforma 2 (más el exón 2.5) de BNO1 tiene un marco de lectura abierto de 1.704 pb de longitud y codifica una proteína de 568 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). Secuencias parciales de ADN genómico que indican uniones de exón/intrón para BNO1, se exponen en SEQ ID Números: 5-11.

**EJEMPLO 6:** Características de la secuencia de BNO1Secuencia de nucleótidos

Un gran número de clones de ADNc humano están presentes en dbEST, los cuales representan el gen BNO1. Una observación de los tejidos de estos clones de ADNc se obtuvo a partir de indicaciones de que el gen también se expresa en la glándula suprarrenal, la sangre, el colon, las células germinales, el corazón, el riñón, el hígado, el pulmón, el músculo, la placenta, la membrana sinovial, las amígdalas, el cuello uterino, el tejido linfático y la piel. Estos tejidos son adicionales a los que se ha mostrado que expresan BNO1 por el análisis Northern (por ejemplo, glándula mamaria, testículo, ovario, útero, próstata, estómago, vejiga, médula espinal, cerebro, páncreas y tiroides) y procedimientos de RT-PCR (por ejemplo, glándula mamaria humana).

La secuencia de nucleótidos de BNO1 humano también detecta un gran número de clones de ADNc de ratón, tal y como se ha mencionado anteriormente. El análisis de BLAST *in silico* de una secuencia de ADN genómico de ratón en la base de datos htgs en el NCBI usando la secuencia de nucleótidos de BNO1 humano, tuvo éxito en la identificación del nucleótido de BNO1 de ratón (SEQ ID NO: 12) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13). La homología de los aminoácidos entre los dos genes tiene un valor tan alto como 95% (desde el aminoácido 76 en el exón 1 hasta el aminoácido 369 en el exón 8), lo que sugiere que el gen está muy conservado entre las dos especies.

El análisis de la secuencia genómica humana situada en 3' con respecto al gen BNO1 identificó la presencia de una variedad de agrupaciones UniGene adicionales (Hs.130367, Hs.227170 y Hs.87068) que se ejecutaban en la misma orientación. Experimentos de RT-PCR que empleaban un cebador específico de Hs.130367 (130367-1; SEQ ID NO: 26) y Hs.87068 (87068-1; SEQ ID NO: 27) (véase la Tabla 1 para las secuencias de cebadores) indicaban que estas dos agrupaciones UniGene podrían estar ligadas. La secuenciación del producto de la RT-PCR también identificó la presencia de la agrupación Hs.227170. Otros experimentos de RT-PCR que empleaban un cebador específico de BNO1 (BNO1-1, SEQ ID NO: 28) en combinación con un cebador específico de Hs.130367 (130367-2; SEQ ID NO: 29) establecieron que Hs.130367 también podría estar ligado al gen BNO1 (véase la Tabla 1 para las secuencias de cebadores). Por lo tanto, las tres agrupaciones UniGene situadas en 3' de BNO1, representan lo más probablemente variantes de este gen que contienen secuencias 3' UTR adicionales. La ausencia de bandas de Northern que se corresponden con el tamaño de estas variantes de BNO1, sugiere que son formas raras del gen. SEQ ID Números: 14-19 representan las secuencias de nucleótidos de estas variantes.

Secuencia de aminoácidos

La secuencia de aminoácidos de BNO1 se utilizó en el análisis *in silico* para identificar proteínas homólogas con el fin de establecer la función del producto génico. El análisis de la proteína de BNO1 frente a las bases de datos Prosite y PfScan ([http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)), mostró que las dos isoformas de corte y empalme de esta proteína (SEQ ID Números: 2 y 4) contienen un dominio F-box en el extremo amino terminal con un valor de esperanza altamente significativo de 5.6e-10. La Figura 3 muestra la secuencia de F-box de BNO1 en comparación con la secuencia de consenso de F-box.

F-box es un motivo proteico de aproximadamente 50 aminoácidos que define una familia en expansión de proteínas eucariotas. Las proteínas que contienen F-box son los componentes de reconocimiento del sustrato de los complejos SCF ubiquitina-ligasa. Estos complejos contienen cuatro componentes: Skp1, Culina, Rbx/Roc1/Hrt1 y una proteína F-box. El motivo de F-box enlaza la proteína F-box a otros componentes del complejo SCF mediante la unión del compo-

nente central de SCF, Skp1. Este motivo se encuentra generalmente en la mitad amino de las proteínas y frecuentemente se acopla con otros dominios proteicos en el extremo carboxi-terminal variable de la proteína. Los dominios carboxi terminales más comunes incluyen repeticiones ricas en leucina (LRRs) y dominios WD-40. Existen actualmente tres subdivisiones de la familia de proteínas F-box en función del tipo de motivos carboxi terminales presentes en las secuencias de proteínas. Siguiendo el modelo propuesto por Cenciarelli et al. (1999) y Winston et al. (1999), la nomenclatura adoptada por la Organización del Genoma Humano especifica las F-box que contienen LRRs como FBXL, las que contienen repeticiones WD como FBXW y las que carecen de todos los dominios conocidos de interacción proteica, como FBXO. El análisis de la secuencia de BNO1 no pudo identificar motivos de proteínas adicionales presentes en el gen, lo que indica que BNO1 forma parte de la clase FBXO de las proteínas F-box.

La vía de degradación del proteasoma dependiente de ubiquitina es un mecanismo importante para regular la abundancia de proteínas en organismos eucariotas. Se ha mostrado que una amplia variedad de proteínas están reguladas por este mecanismo e incluyen oncogenes, genes supresores de tumores, factores de transcripción y otras moléculas de señalización (Hershko y Ciechanover, 1998; Baumeister *et al.*, 1998). Estas proteínas influyen sobre una serie de procesos celulares importantes tales como la regulación del ciclo celular y la apoptosis, la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, el desarrollo y la diferenciación. La amplia gama de proteínas y de procesos que están regulados por la ubiquitinación, sugiere que patologías derivadas de una interrupción del proceso de ubiquitinación también serán diversas. Por ejemplo, hay un precedente de esto en los trastornos neurodegenerativos. Parkin, una proteína mutada en formas hereditarias de la enfermedad de Parkinson, es una ligasa E3 de ubiquitina (Shimura *et al.*, 2000) y en la enfermedad de Alzheimer se ha identificado una ubiquitinación inadecuada de las proteínas cerebrales (López Salón *et al.*, 2000).

El proceso de ubiquitinación comienza con la adición de restos de ubiquitina (ubiquitinación) a proteínas diana y continúa con un proceso de múltiples etapas, cuyo punto final es la proteólisis de sustratos poliubiquitinados a través de un complejo multiproteico de 26S (Haas y Siepmann, 1997; Hochstrasser, 1996). La ubiquitinación de sustratos que son diana para la degradación requiere 3 clases de enzimas: las enzimas activadoras de ubiquitina (E1), las enzimas que se conjugan con ubiquitina (E2) y las ligasas de ubiquitina (E3). Las proteínas E3 tienen una función esencial en la progresión del ciclo celular. Se ha observado que los complejos SCF (una clase de ligasas E3) regulan la transición de la fase G1-S (revisado en Peters, 1998). Una amplia variedad de dianas de SCF se ha descrito e incluyen ciclinas de la fase G1, inhibidores de cinasas dependientes de ciclina, factores de replicación del ADN, factores de transcripción que favorecen la progresión del ciclo celular y otras proteínas celulares importantes. Las secuencias presentes en la región carboxi terminal variable de las proteínas F-box permiten, por lo tanto, la captación de sustratos específicos para la ubiquitinación y la degradación posterior.

Estudios recientes de la proteína supresora de tumores de Von Hippel-Lindau (VHL) han mostrado que forma parte de un complejo que actúa como una ligasa E3 de ubiquitina-proteína (Zaibo *et al.*, 2001). La proteína VHL se une al complejo de la ligasa para dirigirse a proteínas que incluyen HIF $\alpha$  (factor inducible de hipoxia) (Ohh *et al.*, 2000; Cockman *et al.*, 2000) y VDU1 (enzima 1 de desubiquitinación que interacciona con VHL) (Zaibo *et al.*, 2001). HIF $\alpha$  se ha mostrado que regula genes implicados en la angiogénesis, un proceso decisivo para el crecimiento de tumores (Wang *et al.*, 1995; Semenza, 2000), mientras que VDU1 tiene actividad desubiquitinadora.

La función prevista para BNO1, basada en la presencia del dominio de F-box, indica que el gen puede estar implicado en una amplia gama de procesos celulares que incluyen la regulación del ciclo celular. Junto con el hecho que BNO1 se encuentra en una región de LOH observada en el cáncer de mama y otros tipos de tumores, esto sugiere que BNO1 es un gen candidato ideal para el cáncer de mama.

#### **EJEMPLO 7:** Examen del nivel de expresión de BNO1 en líneas celulares de cáncer de mama

Para investigar una posible función de BNO1 en el cáncer de mama, se comparó el nivel de expresión del gen en líneas celulares de cáncer de mama con testigos de tejido normal. El examen de la secuencia genómica que rodea BNO1 muestra que el extremo 5' que incluye el exón 1, es extremadamente rico en GC lo que sugiere la presencia de una isla de CpG. Sin pretender imponer ninguna teoría, se plantea la posibilidad de que existan mecanismos epigenéticos para inactivar la función de BNO1. Una metilación anormal en este sitio puede dar como resultado una regulación a la baja de la transcripción de BNO1 de la copia restante del gen. Estudios recientes han mostrado que este mecanismo ha sido responsable de la inactivación de otros genes supresores de tumores, tales como RB1 (Ohtani-Fujita *et al.*, 1997), VHL (Prowse *et al.*, 1997), MLH1 (Herman *et al.*, 1998) y BRCA1 (Esteller *et al.*, 2000).

Para detectar el nivel de expresión de BNO1 en muestras de cáncer en comparación con testigos normales, se realizó una RT-PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos de BNO1. Esta implicaba inicialmente el aislamiento de ARN procedente de líneas celulares de cáncer de mama junto con testigos de líneas celulares apropiadas.

#### Líneas celulares de cáncer de mama/próstata y extracción de ARN

Las líneas celulares cancerígenas se adquirieron en la ATCC (EE.UU.) y se cultivaron en el medio de cultivo tisular recomendado. Se escogieron líneas celulares de cáncer de mama para el análisis con RT-PCR que mostraban homocigosidad para una serie de marcadores que cartografiaban el cromosoma 16q, indicando un potencial de LOH para este brazo cromosómico. Las células se recogieron de cultivos confluentes y el ARN total se extrajo usando el kit RNAeasy

(Qiagen). Las líneas celulares de cáncer de mama obtenidas para la extracción de ARN eran BT549, MDA-MB-468, CAMA-1, ZR75-30, MDAMB-157, ZR75-1, SKBR3, MDA-MB-231, T47D y MDA-MB-436. La línea celular epitelial de mama normal MCF12A y la línea celular de cáncer de próstata PC3 línea también se adquirieron. El ARNm poliA<sup>+</sup> se aisló posteriormente a partir de todas las fuentes, utilizando el sistema de perlas de Oligotex (Qiagen). El ARNm poliA<sup>+</sup> procedente de glándula mamaria, próstata, ovario e hígado normales fue adquirido comercialmente (Clontech, EE.UU.).

#### Transcripción inversa

El ARNm poliA<sup>+</sup> se cebó con cebadores oligo-dT y se transcribió de forma inversa utilizando el kit de RT Omniscript (Qiagen) de acuerdo con las condiciones del fabricante. Las reacciones testigo se incluyeron para cada molde de ARN en las que se omitía la transcriptasa inversa de la etapa de síntesis del ADNc. Esto era para determinar la presencia de cualquier contaminación con ADN genómico en las muestras de ARN.

#### Normalización del ADNc

Se generaron amplicones internos con curva estándar a partir de una mezcla mixta de ADNc de tejido normal, usando el kit de polimerasa de ADN HotStarTaq<sup>®</sup> (Qiagen). Una mezcla de reacción suficiente para generar >1 µg de ADNc de amplicón contenía 10 µl de tampón 10X PCR (que contenía MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 0,5 µM de cada cebador, 0,5 µl de 2,5 unidades de polimerasa HotStarTaq (Qiagen), 100 ng de molde de ADNc y agua tratada con DEPC hasta 100 µl. Los ciclos de la amplificación se realizaron del modo siguiente: 94°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 93°C durante 20 segundos, 60°C durante 30 segundos y 70°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 4 minutos. Los amplicones se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) de acuerdo con las condiciones del fabricante y las concentraciones se midieron a A<sub>260</sub>. Los amplicones purificados se diluyeron en serie 10 veces desde 10 ng/µl hasta 1 fg/µl. Estas diluciones sirvieron como patrones internos de concentración conocida para el análisis en tiempo real de amplicones específicos de BNO1, tal y como se describe a continuación.

#### PCR en tiempo real

Todos los moldes de ADNc se amplificaron utilizando el kit SYBR Green I PCR Master Mix (PE Biosystems, EE.UU.). Las reacciones de PCR tenían un volumen de 25 µl e incluían 12,5 µl de SYBR Green I PCR Master Mix, 0,5 µM de cada cebador, 2 µl de molde de ADNc normalizado (ver más abajo) y 9,5 µl de agua. El análisis con PCR en tiempo real se realizó utilizando el Rotor-Gene<sup>®</sup> 2000 (Corbett Research, AUS) con las siguientes condiciones de ciclos de amplificación: 94°C durante 10 minutos seguido por 45 ciclos a 93°C durante 20 s, 60°C durante 30 s y 70°C durante 30 s. Los datos de fluorescencia se adquirieron a 510 nm durante la fase de extensión a 72°C. El análisis de las curvas de fusión se realizó con una ciclación inicial de 99-50°C seguida de una monitorización de la fluorescencia durante el calentamiento a 0,2°C/segundo hasta 99°C. Antes de la cuantificación en tiempo real, el tamaño y la especificidad del producto se confirmaron mediante tinción con bromuro de etidio de los geles de agarosa al 2,5% después de una electroforesis de las PCRs completadas. Los cebadores específicos del testigo y de BNO1 utilizados para todas las aplicaciones de PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 1 y se representan por las SEQ ID Números: 30-41.

#### Cuantificación de la PCR en tiempo real

Los análisis de cuantificación se realizaron en el sistema de análisis de muestras de ADN Rotor-Gene<sup>®</sup> (Versión 4.2, fabricado 96). Las curvas estándar se generaron amplificando diluciones en serie de 10 veces (1 µl de 10 pg/µl hasta 1 µl de 1 fg/µl por triplicado) del amplicón estándar interno durante la PCR en tiempo real de los amplicones de BNO1, procedentes de tejidos normales y de líneas celulares de cáncer de mama. Las concentraciones de los amplicones estándar internos se establecieron arbitrariamente en 1.0e+12 copias para patrones de 10 pg hasta 1.0e+08 copias para patrones de 1 fg. Los coeficientes de C<sub>T</sub> (ciclo umbral) de variación para todas las diluciones estándar internas se promediaron en 2% entre las muestras por triplicado dentro de la misma ejecución y ejecuciones diferentes. El programa informático para la cuantificación RotorGene<sup>®</sup> generaba una línea de mejor ajuste en el parámetro C<sub>T</sub> y determinaba el número de copias de amplicones de BNO1 de tejido normal desconocido y de la línea celular de cáncer de mama, mediante la interpolación de la intersección de ruido de fondo-banda de los amplicones de BNO1 frente a los patrones internos con un número de copias conocido.

#### Normalización y expresión relativa de los datos

Para tener en cuenta la variación de las concentraciones de partida del molde de muestra a muestra, se utilizó una cuantificación del ARN de RiboGreen<sup>®</sup> (Molecular Probes) para someter a ensayo de precisión 1 µg de ARN de tejido normal y ARN de líneas celulares de cáncer mama, para la síntesis de ADNc. Los niveles de expresión del gen de mantenimiento seleccionado se analizaron a continuación en todas las muestras para determinar el testigo endógeno más preciso para la normalización de datos. Los amplicones de mantenimiento incluían la Esterasa D (Número de orden M13450), la ciclofilina (número de orden X52851), APRT (número de orden M16446) y la ARN polimerasa II (número de orden Z47727). Como la ciclofilina mostraba el perfil de expresión menos variable, el número de copias calculado para BNO1 se dividió entre el número de copias respectivo de amplicones de ciclofilina, para cada línea celular de cáncer de mama y de tejido normal analizados. El número de copias de BNO1 en ADNc normalizado de mama normal se estableció arbitrariamente en un "valor de referencia" de 1.0e+06 copias. El número de copias de ADNc de líneas celulares de cáncer de mama y de otros tejidos normales se calculó en relación con el "valor de referencia". Los datos se expresaron

como el log del número de copias relativo de ARNm. La Figura 4 muestra los resultados de estos experimentos.

El grado de variación en los niveles de expresión de ARNm para la ciclofilina, la subunidad de la ARN polimerasa II y APRT era relativamente uniforme entre los tejidos normales y las líneas celulares de cáncer. Combinaciones de tres vías para la normalización entre ciclofilina, subunidad de ARN polimerasa II y APRT mostraron una variación media de 7 veces y como máximo 50 veces en el nivel de expresión del ARNm entre las muestras. La significación de los niveles de expresión variables del ARNm dentro de un gen de interés se puede evaluar, por lo tanto, razonablemente basándose en estos resultados de normalización. Una disminución aberrante prevista en el número de copias de un ARNm de un gen de interés de ~100 veces en líneas celulares de cáncer de mama, en relación con un nivel de expresión en mama normal de "valor de referencia", se consideró, por lo tanto, que era significativamente anormal.

La Figura 4 indica que los amplicones de BNO1 específicos para el exón 5-7 y la isoforma 1 (menos el exón 2.5) muestran un patrón compatible de expresión de ARNm entre los tejidos normales y las líneas celulares de cáncer de mama. Para ambos amplicones analizados, las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468, SK-BR3, MDA-MB-231 y la línea celular de cáncer de próstata PC3, todas ellas mostraban un bajo nivel de expresión del ARNm con respecto al tejido de mama normal del "valor de referencia". Una reducción significativa de 725 veces en la expresión del ARNm del exón 5-7 de BNO1 se detectó en SK-BR3 con respecto a la expresión en tejidos normales de mama (equivalente a una regulación a la baja de aproximadamente 350.000-480.000 en la expresión de la molécula de ARNm). Se obtuvieron resultados similares para la isoforma 1 de BNO1 (menos el exón 2.5), con una reducción de 248 veces de la expresión del ARNm en SK-BR3 (equivalente a una regulación a la baja de aproximadamente 300.000-1.000.000 en la expresión de la molécula de ARNm). La isoforma 2 de BNO1 (más el exón 2.5) mostraba una expresión del ARNm significativamente baja en las líneas celulares MDA-MB-468, CAMA-1, SK-BR3 y MDA-MB-231, sin expresión detectada en ZR75-30. Estos resultados indican que ambas isoformas del gen BNO1 están reguladas a la baja en ciertas líneas celulares de cáncer de mama, así como en una línea celular de cáncer de próstata. El mecanismo exacto de esta regulación a la baja no se conoce en este estadio, pero puede ser el resultado de mecanismos tales como una mutación o una metilación del promotor. Partiendo de estos estudios de la expresión proponemos que BNO1 es una proteína responsable del desarrollo de cáncer de mama y de próstata. Debido a su amplio patrón de expresión tisular, BNO1 también puede estar implicada en cánceres que se originan en otros tejidos.

Se pueden utilizar otros métodos para detectar los niveles de expresión de BNO1. Estos incluyen la generación de anticuerpos policlonales o monoclonales, que son capaces de detectar cantidades relativas de las formas tanto normales como mutantes de BNO1, utilizando diversos inmunoensayos tales como los ensayos ELISA (véase el Ejemplo 11 y 12).

#### **EJEMPLO 8: Análisis de tumores y de líneas celulares para estudiar mutaciones en BNO1**

El gen BNO1 se escrutó mediante análisis de SSCP en ADN aislado a partir de tumores de la serie 1, así como de un subconjunto de tumores de la serie 2 (no se muestra en la Figura 1) que mostraban la pérdida de todo el brazo largo del cromosoma 16. Estas muestras de la serie 2 se utilizaron debido a que estaban disponibles mayores cantidades de ADN. En total se examinaron mutaciones en 45 tumores primarios de mama con LOH en 16q.

En una diversidad de líneas celulares también se escrutaron mutaciones. Estas incluían 22 líneas celulares de cáncer de mama (BT20, BT474, BT483, BT549, CAMA-1, DU4475, Hs578T, MCF7, MB157, MB231, MB361, MB415, MB436, MB453, MB468, SKBR3, T47D, UACC893, ZR75-1, ZR75-30, MB134 y MB175), 2 líneas celulares de cáncer de próstata (LNCAP y PC3), 2 líneas celulares de carcinoma gástrico (AGS y KATO), 1 línea celular de cáncer de hígado (HEP2) y 2 líneas de células epiteliales normales de mama (HBL100 y MCF12A). Todas las líneas celulares se adquirieron en la ATCC, se dejaron crecer de acuerdo con las condiciones de los fabricantes y el ADN se aisló a partir de las células cultivadas, utilizando protocolos convencionales (Wyman y White, 1980; Sambrook *et al.*, 1989).

Los exones de BNO1 se amplificaron mediante PCR usando cebadores intrónicos flanqueantes que se marcaron en sus extremos 5' con HEX. Se hizo una excepción para el exón 1 y 8, ya que debido a su tamaño se tuvieron que dividir en 2 amplímeros solapantes. En la Tabla 3 se enumeran las secuencias de todos los cebadores utilizados para el análisis de SSCP, el tamaño esperado del amplímero y la concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizada en la reacción de PCR. Las reacciones típicas de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos con un volumen de 10 µl utilizando 30 ng de ADN molde. Las condiciones de ciclación fueron una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1<sup>1/2</sup> minutos y 72°C durante 1<sup>1/2</sup> minutos. Una etapa final de extensión a 72°C durante 10 minutos se realizó a continuación. Veinte µl de colorante de carga que comprendía 50% (v/v) de formamida, EDTA 12,5 mM y 0,02% (p/v) de azul de bromofenol se añadieron a las reacciones completadas, que se aplicaron posteriormente sobre geles de poliacrilamida al 4% y se analizaron en el sistema GelScan 2000 (Corbett Research, AUS) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

De los 12 amplicones sometidos a ensayo, solo en 2 se identificaron desplazamientos de bandas en SSCP. En el exón 2.5, se observaron desplazamientos de bandas idénticos en 2 muestras de tumores de la serie 1 (380 y 355) y en la línea celular de cáncer de mama MCF7. El análisis de SSCP del ADN normal correspondiente procedente de la muestra 380 y 355, identificaba el mismo desplazamiento de bandas, indicando que el cambio lo más probablemente no causaba la enfermedad. El análisis de la secuencia de este desplazamiento de bandas en todas las muestras mostró que un solo cambio de una base de nucleótidos (-5T→C) era responsable de este desplazamiento de bandas. Este cambio no afectó a la puntuación de sitios de consenso aceptores de corte y empalme para este exón y, por lo tanto, lo más probable

es que represente un polimorfismo. La incidencia de este cambio en la población general no se ha examinado aún. En el exón 8b, un desplazamiento de bandas fue identificado en una sola línea celular de cáncer (KATO). La secuenciación de este desplazamiento de bandas indica un cambio de C→T en la posición +10 de este amplicón que se encuentra en el sitio donante de corte y empalme (5' del sitio de corte y empalme). Este cambio de base se produce fuera de la secuencia de consenso de unión de corte y empalme y se prevé que la mutación no tenga efecto sobre el corte y empalme de este exón.

#### **EJEMPLO 9:** Inmunoprecipitación de BNO1 y Skp1

Para someter a ensayo si BNO1 contenía un motivo de F-box funcional, se empleó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Este implicaba la clonación del marco de lectura abierto de longitud completa, marcado con Myc de BNO1 en los sitios Sall/Clal del vector de expresión retroviral LNCX2 (Clontech), utilizando técnicas convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Después de esto, 10<sup>7</sup> células 293T se transfectaron con 10 µg de la estructura artificial BNO1-LNCX2 o por separado con el vector LNCX2 solo como testigo usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se recogieron 24 horas después de la transfección y se lisaron en 2 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, 0,5% de Nonidet P-40 suplementado con PMSF 1 mM y 5 µg/ml de leupeptina, antipaina y aprotinina). Después de esto, se incubaron 0,5 ml de lisado celular con 2 µg de anticuerpo monoclonal anti-Myc (Roche) o un anticuerpo policlonal de conejo anti-p19<sup>Skp1</sup> (Neo Markers, Fremont, CA) durante 1 hora y proteína A-Sefarosa durante 1 hora a 4°C. Los complejos inmunes se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de lisis seguido de separación en 10% de SDS-PAGE e inmunotransferencia de acuerdo con técnicas convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

Los resultados de estos experimentos indicaron que BNO1 coprecipitaba específicamente con Skp1 endógena, lo que confirma tanto una asociación entre estas dos proteínas como la presencia de una F-box funcional dentro de BNO1. Esta interacción indica que BNO1 pertenece a un nuevo complejo de ligasas ubiquitina-E3 que puede ser decisivo para la degradación controlada de sustratos específicos de BNO1.

#### **EJEMPLO 10:** Análisis del gen BNO1

Los siguientes métodos se utilizan para determinar la estructura y la función de BNO1.

##### Estudios biológicos

Los vectores de expresión de mamíferos que contienen ADNc de BNO1 (que representa ambas isoformas de BNO1) se pueden transfectar en líneas celulares de carcinoma de mama, de próstata u otros que tienen lesiones en el gen. Se examina la inversión fenotípica en cultivos (por ejemplo, la morfología celular, el crecimiento de transformantes en agar blando, la tasa de crecimiento) y en animales no humanos (por ejemplo, la tumorigenicidad en ratones sin pelo). Estos estudios pueden utilizar formas de BNO1 de tipo silvestre o mutante. La delección y los mutantes sustitutivos de BNO1, se pueden construir por mutagénesis *in vitro*.

##### Estudios biológicos moleculares

La capacidad de ambas isoformas de la proteína de BNO1 para unirse a proteínas conocidas y desconocidas, se puede examinar. Procedimientos tales como el sistema de doble híbrido en levadura se utilizan para descubrir e identificar cualquier ligando funcional, particularmente sustratos específicos de BNO1 o sustratos específicos de una isoforma que son dianas para la degradación por ubiquitinación. El principio que subyace al procedimiento de doble híbrido en levadura es que muchos activadores de la transcripción eucariota, que incluyen los de levadura, consisten en dos dominios modulares discretos. El primero es un dominio de unión al ADN que se une a una secuencia promotora específica y el segundo es un dominio de activación que dirige el complejo de la ARN polimerasa II para transcribir el gen aguas abajo del sitio de unión a ADN. Ambos dominios son necesarios para la activación de la transcripción ya que ninguno de los dos dominios puede activar la transcripción por sí mismo. En el procedimiento de doble híbrido en levadura, el gen de interés o partes del mismo (CEBO), se clona de tal manera que se expresa como una fusión con un péptido que tiene un dominio de unión al ADN. Un segundo gen, o una variedad de genes, tales como los de una genoteca de ADNc (DIANA), se clona de forma que se expresa como una fusión con un dominio de activación. La interacción de la proteína de interés con su ligando junta el péptido que se une a ADN con el dominio de activación e inicia la transcripción de los genes informadores. El primer gen informador seleccionará células de levadura que contienen proteínas que interaccionan (este informador es por lo general un gen nutricional requerido para el crecimiento en medios selectivos). El segundo informador se utiliza para la confirmación y aunque se expresa como respuesta a proteínas que interaccionan, generalmente no es necesario para el crecimiento.

La naturaleza de los genes y las proteínas que interaccionan con BNO1 también se puede estudiar de tal manera que estos ligandos también pueden ser dianas para el descubrimiento de fármacos. Son de particular interés las proteínas que interaccionan con BNO1 que se dirigen a una diana para la ubiquitinación y la posterior degradación mediante las ligasas ubiquitina-E3 que contiene BNO1.

##### Estudios estructurales

Proteínas recombinantes de BNO1 se pueden producir en células bacterianas, de levaduras, de insectos y/o de mamíferos.

ro, y se utilizan en estudios cristalográficos y de RMN. Junto con la formación de modelos moleculares de la proteína, se puede facilitar el diseño de fármacos dirigido por la estructura.

#### **EJEMPLO 11:** Generación de anticuerpos policlonales contra BNO1

La información de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de BNO1 permite la producción de anticuerpos, que se unen selectivamente a la proteína de BNO1 o a fragmentos de la misma. Después de la identificación de mutaciones en el gen, los anticuerpos también se pueden preparar para que se unan selectivamente y distingan una proteína mutante de una proteína normal. Los anticuerpos específicos de epítopos mutagenizados son especialmente útiles en ensayos en cultivos celulares para la detección de células malignas en diferentes estadios del desarrollo tumoral. Estos anticuerpos también se pueden usar para detectar células malignas que se han tratado con agentes farmacéuticos, para evaluar el potencial terapéutico del agente.

Para preparar anticuerpos policlonales, se pueden diseñar péptidos cortos homólogos a la secuencia de aminoácidos de BNO1. Tales péptidos tienen típicamente una longitud de 10 a 15 aminoácidos. Estos péptidos se deben diseñar en regiones de menor homología con el ortólogo de ratón, para evitar interacciones cruzadas con especies en experimentos adicionales posteriores, tales como la producción de anticuerpos monoclonales. Los péptidos sintéticos se pueden conjugar entonces con biotina (Sulfo-NHS-LC biotina) usando protocolos convencionales suministrados con los kits disponibles comercialmente, tales como el kit de PIERCE® (PIERCE). Los péptidos biotinilados forman posteriormente complejos con avidina en solución y para cada complejo peptídico, se inmunizan 2 conejos con 4 dosis de antígeno (200 µg por dosis) a intervalos de tres semanas entre las dosis. La dosis inicial se mezcla con adyuvante completo de Freund, mientras que las dosis posteriores se combinan con inmuno-adyuvante de Freund. Después de completar la inmunización, a los conejos se les extrae sangre para el ensayo y la reactividad de los sueros se somete a ensayo mediante transferencia de manchas con diluciones en serie de los péptidos originales. Si los conejos muestran una reactividad significativa en comparación con el suero previo a la inmunización, son sacrificados posteriormente y la sangre se recoge de tal manera que se pueda separar el suero inmune para experimentos adicionales.

#### **EJEMPLO 12:** Generación de anticuerpos monoclonales específicos de BNO1

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar para BNO1 de la siguiente manera. Un inmunógeno que comprende proteína intacta de BNO1 o péptidos de BNO1 (de tipo silvestre o mutante) se inyecta en adyuvante de Freund a ratones, en donde cada ratón recibe cuatro inyecciones de 10 a 100 µg de inmunógeno. Después de la cuarta inyección, muestras de sangre tomadas de los ratones se examinan para estudiar la presencia de anticuerpos para el inmunógeno. Los ratones inmunes se sacrifican, se extirpan sus bazo y se preparan suspensiones de células individuales (Harlow y Lane, 1988). Las células del bazo sirven como fuente de linfocitos, que se fusionan a continuación con una célula asociada de mieloma de crecimiento permanente (Kohler y Milstein, 1975). Las células se siembran en placas con una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 96 pocillos y los pocillos individuales se examinan para estudiar el crecimiento. Estos pocillos se analizan a continuación para estudiar la presencia de anticuerpos específicos de BNO1 mediante ELISA o RIA, utilizando proteína diana de BNO1 de tipo silvestre o mutante. Las células en los pocillos positivos se expanden y se subclonan para establecer y confirmar la capacidad de monoclonación. Los clones con la especificidad deseada se expanden y se cultivan como ascitis en ratones seguido de purificación, usando cromatografía de afinidad utilizando proteína A Sefarosa, cromatografía de intercambio iónico o variaciones y combinaciones de estas técnicas.

#### Aplicabilidad industrial

El gen BNO1 está implicado en el cáncer y basándose en su función en el proceso de ubiquitinación, BNO1 también puede estar implicado en mecanismos celulares que están regulados por este proceso. Las nuevas moléculas de ADN de la presente invención son por lo tanto útiles en métodos para la detección temprana de individuos susceptibles a una enfermedad, así como en procedimientos terapéuticos asociados con estos estados de la enfermedad.

**TABLA 1**

Cebadores empleados para el análisis de BNO1	
Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' → 3')
AL-1	GTG AAG AAG GAT GAG TTC TCC
7970-1	AGC TGA GCA TCA CAA TCT CC
ESTD-F	GGA GCT TCC CCA ACT CAT AAA TGC C
ESTD-R	GCA TGA TGT CTG ATG TGG TCA GTA A

Cebadores empleados para el análisis de BNO1	
Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' → 3')
BNO1-2	TGC GAA GCT GCT TCA CCG AT
BNO1-3	GGC CGT ACA TGC ACT CCA CTG
130367-1	GAG AAC CTG CAG TTG TGC TG
87068-1	ATG GTG CTG CTT GTA GCA AG
BNO1-1	TGC CCA TAT GAG ATG ACG AGG
130367-2	ACA CTC AGC AGT GGA CAC TTG
Ciclofilina-F <sup>1</sup>	GGC AAA TGC TGG ACC CAA CAC AAA
Ciclofilina-R <sup>1</sup>	CTA GGC ATG GGA GGG AAC AAG GAA
APRT-F <sup>1</sup>	GAC TGG GCT GCG TGC TCA TCC
APRT-R <sup>1</sup>	AGG CCC TGT GGT CAC TCA TAC TGC
ARN Polimerasa II-F <sup>1</sup>	AGG GGC TAA CAA TGG ACA CC
ARN Polimerasa II-R <sup>1</sup>	CCG AAG ATA AGG GGG AAC TAC T
BNO1 (Exón 5-7)-F <sup>1</sup>	CCG GCG GGA GGC AGG AGG AGT
BNO1 (Exón 5-7)-R <sup>1</sup>	GCG GCG GTA GGT CAG GCA GTT GTC
BNO1 (Isoforma 1)-F <sup>1</sup>	TGC GAA GCT GCT TCA CCG AT
BNO1 (Isoforma 1)-R <sup>1</sup>	GGC CGT ACA TGC ACT CCA CTG
BNO1 (Isoforma 2)-F <sup>1</sup>	GTG AAG TCG GGA CGT TTT GTG A
BNO1 (Isoforma 2)-R <sup>1</sup>	CCG TGG TGG GGC CCT TTG TGG
<p><i>Nota:</i> <sup>1</sup> Estos cebadores se marcaron en sus extremos 5' con HEX. La isoforma 1 de BNO1 carece de exón 2.5 (SEQ ID NO: 1). La isoforma 2 de BNO1 contiene el exón 2.5 (SEQ ID NO: 3).</p>	

TABLA 2

Sitios de corte y empalme del gen <i>BNO1</i>						
Exón	Tamaño (pb)	Sitio 3' de corte y empalme (intrón/exón)	Potencia de consenso (%)	Sitio 5' de corte y empalme (intrón/exón)	Potencia de consenso (%)	Tamaño del intrón (pb)
1	343	5'UTR		TGCCGTGAGG/gtgagcgcg	83,03	23042



Sitios de corte y empalme del gen <i>BNO1</i>						
Exón	Tamaño (pb)	Sitio 3' de corte y empalme (intrón/exón)	Potencia de consenso (%)	Sitio 5' de corte y empalme (intrón/exón)	Potencia de consenso (%)	Tamaño del intrón (pb)
2	72	cctgttac <b>ag</b> /AGTATGGTGT	94,28	TATGCGAAGC/ <b>gtg</b> agtgaat	75,36	1797
2.5	87	gtctgttc <b>ag</b> /GTATAAACCC	90,0	TACACCTGCC/ <b>gtat</b> gtacct	66,97	11160
3	77	cctcctg <b>tag</b> /TGCTTCACCG	78,70	GAACGTGGTG/ <b>gta</b> agtcg	92,15	3408
4	168	cctcctg <b>tag</b> /GTGGACGGCC	84,95	CCACATCCAG/ <b>gtg</b> gtgcag	85,40	646
5	75	aacactga <b>ag</b> /ATTGTGAAGA	63,39	GAGGCAGGAG / <b>gtg</b> agccac	90,87	6612
6	110	cttttga <b>ag</b> /GAGTTTCGGA	85,65	GTCAGTACGA/ <b>gtg</b> agtgcg	76,46	697
7	154	ctccccac <b>ag</b> /CAACTGCCTG	85,32	CAAGATCACG/ <b>gtg</b> agtggcg	88,50	1017
8	401	tgctccac <b>ag</b> /GGCGACCCCA	89,22	GCAGGATGTG/ <b>gta</b> aggatg	87,59	2375
9	2174	ttctgctc <b>ag</b> /TTTTTATGGC	90,62	3'UTR		

**TABLA 3**

Cebadores empleados para el análisis de SSCP de <i>BNO1</i>				
Exón	Cebador 1 (5' → 3')	Cebador 2 (5' → 3')	[MgCl <sub>2</sub> ]	Tamaño del producto (pb)
1a	GCGCTGGAGCGTGCGACA	AGCTCGGGCGGCAGCTCCA	2,0 mM	269
1b	GGTCGGGGGCGGCTTGTG	GCCTCCACCTGGCAGGGA	2,0 mM	252
2	CTGTGCGGTTATGAGTTGTTG	GTACAAAGTTAATCATGGATGGT	2,0 mM	168
2.5	AGGCATTGGGTCGTATTCAC	AGAAGCCAAAGCTCGCAGGA	1,5 mM	198
3	GGCACGCTGGGTCTAACAC	CCTGCCCCGTGCACAGACCT	1,5 mM	167
4	CTCATGGACCTTTGCCCATCT	GTCTGCAGCTGAGAATAGCAC	1,0 mM	290
5	GTGATGGACTCTGTTCTCAC	AGGTCCGCACCATATGAACAC	2,0 mM	170
6	CACAGCCTCCTGTCATATGGA	ACCCAGCACCGAGCAGGA	1,5 mM	187
7	GGCGTTCTCAGTCCTGCCT	CCCTGACTCCACAGCCCAC	1,5 mM	284
8a	CTGGCCTGAGCCCTGCTGA	ACCCTCTCGCGCACCTCCA	1,0 mM	171
8b	CAATGAGCTCTCCCGCATC	CCATGCTGTCCACCTTCA	1,5 mM	354
9	AGAATGCTGTACGTGGCGTG	AGGAGGTGAGGGACTGAATG	1,0 mM	292

Cebadores empleados para el análisis de SSCP de <i>BNO1</i>				
Exón	Cebador 1 (5' → 3')	Cebador 2 (5' → 3')	[MgCl <sub>2</sub> ]	Tamaño del producto (pb)
<i>Nota:</i> Todos los cebadores se marcaron en sus extremos 5' con HEX.				

### **Referencias**

Las referencias citadas en esta memoria se enumeran en las páginas siguientes y se incorporan en esta memoria como referencia.

- 5 Altschul, SF. *et al.* (1997). Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Brenner, AJ. y Aldaz CM. (1995). Cancer Res. 55: 2892-2895.
- Baumeister, W. *et al.* (1998). Cell 92: 367-380.
- Callen, DF. *et al.* (1990). Ann. Genet. 33: 219-221.
- Callen, DF. *et al.* (1995). Genomics 29: 503-511.
- 10 Cenciarelli, C. *et al.* (1999). Curr. Biol. 9 : 1177-1179.
- Chen, T. *et al.* (1996). Cancer Res. 56: 5605-5609.
- Cleton-Jansen, A-M. *et al.* (1995). Br. J. Cancer 72: 1241-1244.
- Cockman, ME. *et al.* (2000). J. Biol. Chem. 275: 25733-25741.
- Cole, SP. *et al.* (1984). Mol. Cell Biol. 62: 109-120.
- 15 Cote, RJ. *et al.* (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030.
- Culver, K. (1996). Gene Therapy : A Primer for Physicians. Segunda edición. (Mary Ann Liebert).
- Devilee, P. *et al.* (1991). Oncogene 6: 1705-1711.
- Devilee, P. y Cornelisse, CJ. (1994). Biochimica et Biophysica Acta 1198: 113-130.
- Doggett, NA. *et al.* (1995). Nature 377 Supl: 335-365.
- 20 Elston, CW. y Ellis, IO. (1990). Histopathology 16: 109-118.
- Esteller, M. *et al.* (2000). J. Natl. Cancer Inst. 92: 564-569.
- Fearon, ER. y Vogelstein, B. (1990). Cell 61: 759-767.
- Friedman, T. (1991). In Therapy for Genetic Diseases. T Friedman (Ed). Oxford University Press, págs. 105-121.
- Futreal, PA. *et al.* (1994). Science 266: 120-122.
- 25 Goldman, CK. *et al.* (1997). Nature Biotechnology 15: 462-466.
- Haas, AL, y Siepmann, TJ. (1997). FASEB 11: 1257-1268.
- Hall, JM. *et al.* (1990). Science 250: 1684-1689.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 30 Heller, RA. *et al.* (1997). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2150-2155.
- Herman, JG. *et al.* (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6870-6875.
- Hershko, A. y Ciechanover, A. (1998). Annu. Rev. Biochem. 67: 425-479.
- Hochstrasser, M. (1996). Ann. Rev. Gene. 30: 405-439.

- Huse, WD. *et al.* (1989). Science 246: 1275-1281.
- Kipreos, ET. y Pagano, M. (2000). Genome Biology 1: revisiones 3002.1-3002.7.
- Kohler, G. y Milstein, C. (1975). Nature 256: 495-497.
- Kozbor, D. *et al.* (1985). J. Immunol. Methods 81:31-42.
- 5 Longmire, JL. *et al.* (1993). GATA 10: 69-76.
- Lopez Salon, M. *et al.* (2000). J. Neurosci. Res. 62: 302-310.
- McCormick, MK. *et al.* (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1063-1067.
- Miki, Y. *et al.* (1994). Science 266: 66-71.
- Miki, Y. *et al.* (1996). Nature Genet. 13: 245-247.
- 10 Ohh, M. *et al.* (2000). Nat. Cell Biol. 2: 423-427.
- Ohtani-Fujita, N. *et al.* (1997). Cancer Genet. Cytogenet. 98:43-49.
- Orlandi, R. *et al.* (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837.
- Peters, JM. (1998). Curr. Opin. Cell Biology 10: 759-768.
- Prowse, AH. *et al.* (1997). Am. J. Hum. Genet. 60:765-771.
- 15 Radford, DM. *et al.* (1995). Cancer Res. 55: 3399-3405.
- Riethman, HC. *et al.* (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6240-6244.
- Saito, H. *et al.* (1993). Cancer Res. 53: 3382-3385.
- Sambrook, J. *et al.* (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Segunda edición. (Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York).
- 20 Scharf, D. *et al.* (1994). Results Probl. Cell Differ. 20: 125-162.
- Schena, M. *et al.* (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-10619.
- Semenza, GL. (2000). Gene Dev. 14: 1983-1991.
- Sharan, SK. *et al.* (1997). Nature 386: 804-810.
- Shimura, H. *et al.* (2001). Science 293: 263-269.
- 25 Soares, MB. *et al.* (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9228-9232.
- Wang, GL. *et al.* (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5510-5514.
- Weber, JL. y May, PE. (1989). Am. J. Hum. Genet. 44: 388-396.
- Whitmore, SA. *et al.* (1994). Genomics 20: 169-175.
- Whitmore, SA. *et al.* (1998). Genomics 50: 1-8.
- 30 WHO. (1981). Histological Typing of Breast Tumours. Segunda edición. (Geneva).
- Winston, JT. *et al.* (1999). Current Biology 9: 1180-1182.
- Winter, G. *et al.* (1991). Nature 349: 293-299.
- Wooster, R. *et al.* (1995). Nature 378: 789-791.
- Wooster, R. *et al.* (1994). Science 265: 2088-2090.
- 35 Wyman, A. y White, R. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6754-6758.
- Zaibo, L. *et al.* (2001). J. Biol. Chem. (Artículos en prensa, Manuscrito M108269200).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Bionomics Limited

<120> BNO1

<130> P3

5 <160> 41

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 3574

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccggt cgcgcggatg tcggcgccgc

60

cagcagcgcc gggggcccgcc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc

120

gaggaggagc gcacgcaggc tagcgccggg gtccggggcg gcttgtgcgc gggcccctcg

180

ccgcgcggcc cgcgctgctc gctgctggag ctgccgcccg agctgctggt ggagatcttc

240

gcgtcgctgc cgggcacgga cctaccagc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc

300

atcctccaca ccgacacccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa

360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagctgctt

420

caccgatata gacacatddd gggattgtgg cagccagata tcggggccata cggaggactg

480

ctgaacgtgg tgggtggacgg cctgttcac atcgggtgga tgtacctgcc tccccatgac

540

ccccacgtcg atgaccctat gagattcaag cctctgttca ggatccacct gatggagagg

600

aaggctgcca cagtggagtg catgtacggc cacaaagggc cccaccacgg ccacatccag

660

attgtgaaga aggatgagtt ctccaccaag tgcaaccaga cggaccacca caggatgtcc

720

ggcgggagggc aggaggagtt tcggacgtgg ctgagggagg aatgggggcg cacgctggag

780

gacatcttcc acgagcacat gcaggagctc atcctgatga agttcatcta caccagtcag

840

tacgacaact gcctgaccta ccgccgcac tacctgccgc ccagccgcc ccagcgcctc

900

atcaagcctg gcctcttcaa aggtacctat ggcagccacg gcctggagat tgtgatgctc

960

agcttccacg gccggcggtg caggggcacc aagatcacgg gcgaccccaa catccccgct

1020

gggcagcaga cagtggagat cgacctgagg catcgcatcc agctgccga cctcgagaac

1080

cagcgcaact tcaatgagct ctcccgcatc gtccctggagg tgcgcgagag ggtgcgccag

1140

gagcagcagg aaggcgggca cgaggcgggc gagggtcgtg gccggcaggg cccccgggag

1200

tcccagccaa gccctgccc gccagggca gaggcgcca gcaagggccc agatgggaca

1260

cctggtgagg atggtggcga gcctggggat gccgtagctg cggccgagca gcctgcccag

1320

tgtgggcagg ggcagccgtt cgtgctgcc gtgggcgtga gctccaggaa tgaggactac

1380

## ES 2 433 012 T3

ccccgaacct gcaggatgtg tttttatggc acaggcctca tcgcggggcca cggcttcacc  
1440

agccctgaac gcacccccgg ggtcttcac cttctcgatg aggaccgctt cgggttcgtc  
1500

tggtctggagc tgaaatcctt cagcctgtac agccgggtcc aggccacctt ccggaacgca  
1560

gatgcgccgt cccacaggc cttcgatgag atgctcaaga acattcagtc cctcacctcc  
1620

tgaccggcca catccttgcc gccacatccc ggggtggctct ggggtctga actctgacct  
1680

gtgaatagaa gcagcatgca ctttggaat ccggcctttt gaccagaacg cacacctcgt  
1740

cggggggccc agtccagcca cccccagca ctttatgtag agagtgtgac atagacctgc  
1800

atatttgtca gtgccatgat ggaagaagct gagcatgtct taccaaaaac agagagaacg  
1860

agcctgaata cagcagatgt aggggacagc cgtgggaccg cgtgagaatt gaagcgggtg  
1920

ggttccccga ccttgggctg gctggtggtt ttctcgggaa gcaggacctt cctgactggt  
1980

gctcttctctg tgagcggata gagtgataga ctgggtcgtg tgtgagacgc atgtgctcca  
2040

cccactcct tttgggggaa gccaggcaac agtggcctct gggaggggggt caggaagagg  
2100

cgaacagctc aggcagcgca ggtgtgatgg gcacagtacg cagagcaagc tcgggaagtt  
2160

ggtaggatct caggcttggg gccgggactc tggagtgaat cccatttct ctaccggctt  
2220

gcttggagtt tggacagaag catttcacct ctgatctcag cttccccacc tgtggagtg  
2280  
gttttagtgac ctgagtcact agggaatgtc acctgaatgc acagcccagc ccatgcacct  
2340  
gccccagccc ctccagcttt ggagccaagg ccatcggtcc agccacttga ctgtectcga  
2400  
cggcctgttc cagacagggc gtttgttttg tccatgcctt cctccctgca cgcacacggc  
2460  
gtcaaaadca agctgccggc cactgtctcc agaacgcaag gctccaggcc cgtgtgtctg  
2520  
aagcagtgag tggccacac aggtgccagg agtgcccata tgagatgacg aggaaacccc  
2580  
tttgcaggtg aggggacagc tttctagaaa agccacacct gcactctggg acacactttg  
2640  
gaaagtggga cctccagcc tggagacccc atggactgat gcctccactg ctgtgtgccc  
2700  
catgttgtgt taacacctgc gtgtggggac cccatctgag gtcttggtg aggttggcat  
2760  
ctcctgaaga acagagagca cgggtgtccag agctggccct tccccagcc cacagccagc  
2820  
tccgtgcccg agtgggctgc cccagcgagc cttccctctc tgccgcttgt ccttgtgtct  
2880  
gggctgctcc aagtccttgt gctgggcacc ctggacacgt cctgctggtg agggacctcg  
2940  
ggaaggtgac agtctgtgtg ccttggtgtg gagaccaacc tgaggatgtc ctgggaaatg  
3000  
ttttcctgat gaatttctcc ttgactggcc tttaaagaac ataagaattc ccattgccca

3060

gcctcagtgc atttggcaaa tgcttacttt gcttcccaga gtcagagaat tggcaaaggt

3120

tcttaaattgg taatctggcc ggcttgggag aaagactcac gagaaaagcc agtggagaaa

3180

gcgccttcc agggcgccag cagcgggagc cagcagacc ccgagggcga cctgctggct

3240

cttggtgtgtg gcccagttt ctacgggctt ttgcagcatt agcctacaag ctttgtcact

3300

ccctgcctc tgtggtggtc actgtttttc tctcttgcca aatgaggcag tctctgagt

3360

acggtgactg tggccttgaa gcctggagga ctgttgggca tgtagactgg caccttgaag

3420

attcaccatt gtttaaataa aatcaagcaa atgctttttt accaagagcc cgagcctcgc

3480

tctaagggac gcagtcctag aggcgtgccc tttggggctt gaagagcaca ctgtgggacg

3540

cacgtgcttc tgattaaagg aatctcagat ctca

3574

<210> 2

<211> 539

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Val	Cys	Ala	Arg	Leu	Cys	Gly	Val	Gly	Pro	Ser	Arg	Gly	Cys
1				5				10						15	

Arg	Arg	Arg	Gln	Gln	Arg	Arg	Gly	Pro	Ala	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Asp
			20				25						30		

Ser Glu Pro Asp Thr Asp Pro Glu Glu Glu Arg Ile Glu Ala Ser Ala



# ES 2 433 012 T3

	35		40		45												
Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	Ala	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	
	50					55					60						
Cys	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Val	Glu	Ile	Phe	Ala		
65					70					75					80		
Ser	Leu	Pro	Gly	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Cys	Thr	Lys		
				85					90					95			
Phe	Arg	Arg	Ile	Leu	His	Thr	Asp	Thr	Ile	Trp	Arg	Arg	Arg	Cys	Arg		
			100					105						110			
Glu	Glu	Tyr	Gly	Val	Cys	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly		
		115					120					125					
Val	Ser	Cys	Arg	Asp	Val	Tyr	Ala	Lys	Leu	Leu	His	Arg	Tyr	Arg	His		
	130					135					140						
Ile	Leu	Gly	Leu	Trp	Gln	Pro	Asp	Ile	Gly	Pro	Tyr	Gly	Gly	Leu	Leu		
145					150					155					160		
Asn	Val	Val	Val	Asp	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Gly	Trp	Met	Tyr	Leu	Pro		
				165					170					175			
Pro	His	Asp	Pro	His	Val	Asp	Asp	Pro	Met	Arg	Phe	Lys	Pro	Leu	Phe		
			180					185					190				
Arg	Ile	His	Leu	Met	Glu	Arg	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Glu	Cys	Met	Tyr		
		195					200					205					
Gly	His	Lys	Gly	Pro	His	His	Gly	His	Ile	Gln	Ile	Val	Lys	Lys	Asp		
	210					215					220						
Glu	Phe	Ser	Thr	Lys	Cys	Asn	Gln	Thr	Asp	His	His	Arg	Met	Ser	Gly		
225					230					235					240		
Gly	Arg	Gln	Glu	Glu	Phe	Arg	Thr	Trp	Leu	Arg	Glu	Glu	Trp	Gly	Arg		
				245					250					255			

# ES 2 433 012 T3

Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Glu His Met Gln Glu Leu Ile Leu Met  
 260 265 270

Lys Phe Ile Tyr Thr Ser Gln Tyr Asp Asn Cys Leu Thr Tyr Arg Arg  
 275 280 285

Ile Tyr Leu Pro Pro Ser Arg Pro Asp Asp Leu Ile Lys Pro Gly Leu  
 290 295 300

Phe Lys Gly Thr Tyr Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Val Met Leu Ser  
 305 310 315 320

Phe His Gly Arg Arg Ala Arg Gly Thr Lys Ile Thr Gly Asp Pro Asn  
 325 330 335

Ile Pro Ala Gly Gln Gln Thr Val Glu Ile Asp Leu Arg His Arg Ile  
 340 345 350

Gln Leu Pro Asp Leu Glu Asn Gln Arg Asn Phe Asn Glu Leu Ser Arg  
 355 360 365

Ile Val Leu Glu Val Arg Glu Arg Val Arg Gln Glu Gln Gln Glu Gly  
 370 375 380

Gly His Glu Ala Gly Glu Gly Arg Gly Arg Gln Gly Pro Arg Glu Ser  
 385 390 395 400

Gln Pro Ser Pro Ala Gln Pro Arg Ala Glu Ala Pro Ser Lys Gly Pro  
 405 410 415

Asp Gly Thr Pro Gly Glu Asp Gly Gly Glu Pro Gly Asp Ala Val Ala  
 420 425 430

Ala Ala Glu Gln Pro Ala Gln Cys Gly Gln Gly Gln Pro Phe Val Leu  
 435 440 445

Pro Val Gly Val Ser Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Pro Arg Thr Cys Arg  
 450 455 460

Met Cys Phe Tyr Gly Thr Gly Leu Ile Ala Gly His Gly Phe Thr Ser  
 465 470 475 480

# ES 2 433 012 T3

Pro Glu Arg Thr Pro Gly Val Phe Ile Leu Phe Asp Glu Asp Arg Phe  
485 490 495

Gly Phe Val Trp Leu Glu Leu Lys Ser Phe Ser Leu Tyr Ser Arg Val  
500 505 510

Gln Ala Thr Phe Arg Asn Ala Asp Ala Pro Ser Pro Gln Ala Phe Asp  
515 520 525

Glu Met Leu Lys Asn Ile Gln Ser Leu Thr Ser  
530 535

<210> 3

<211> 3661

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccgt cgcgcggatg tcggcgccgc

60

cagcagcgcc ggggcccggc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc

120

gaggaggagc gcacgagggc tagcgccggg gtcggggggc gcttgtgcgc gggcccctcg

180

ccgcgcggcc cgcgctgctc gctgctggag ctgccggccg agctgctggt ggagatcttc

240

gcgtcgctgc cgggcacgga cctacccagc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc

300

atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa

360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagcgtata

420

aaccctcgcg tgaagtcggg acgttttgtg aaaattctcc ctgattatga gcacatggcg

480

## ES 2 433 012 T3

tacagagacg ttacacctg cctgcttcac cgatatagac acatthttggg attgtggcag  
540  
ccagatatcg ggccatacgg aggactgctg aacgtgggtgg tggacggcct gttcatcatc  
600  
gggtggatgt acctgcctcc ccatgacccc cacgtcgatg accctatgag attcaagcct  
660  
ctgttcagga tccacctgat ggagaggaag gctgccacag tggagtgcac gtacggccac  
720  
aaagggcccc accacggcca catccagatt gtgaagaagg atgagttctc caccaagtgc  
780  
aaccagacgg accaccacag gatgtccggc gggaggcagg aggagtthtcg gacgtggctg  
840  
agggaggaat gggggcgcac gctggaggac atcttccacg agcacatgca ggagctcatc  
900  
ctgatgaagt tcatctacac cagtcagtac gacaactgcc tgacctaccg ccgcatctac  
960  
ctgccgcccc gccgccccga cgacctcatc aagcctggcc tcttcaaagg tacctatggc  
1020  
agccacggcc tggagattgt gatgctcagc ttccacggcc ggcgtgccag gggcaccaag  
1080  
atcacgggcg accccaacat ccccgctggg cagcagacag tggagatcga cctgaggcat  
1140  
cggatccage tgcccgacct cgagaaccag cgcaacttca atgagctctc ccgcatcgtc  
1200  
ctggaggtgc gcgagagggg gcgccaggag cagcaggaag gcggggcacga ggcgggagag  
1260  
ggtcgtggcc ggcagggccc ccgggagtc cagccaagcc ctgccagcc cagggcagag  
1320

gcgccagca agggcccaga tgggacacct ggtgaggatg gtggcgagcc tggggatgcc  
1380

gtagctgcgg ccgagcagcc tgcccagtgt gggcaggggc agccgttcgt gctgcccgtg  
1440

ggcgtgagct ccaggaatga ggactacccc cgaacctgca ggatgtgttt ttatggcaca  
1500

ggcctcatcg cgggccacgg cttcaccagc cctgaacgca cccccggggc cttcatcctc  
1560

ttcgatgagg accgcttcgg gttcgtctgg ctggagctga aatccttcag cctgtacagc  
1620

cgggtccagg ccaccttcgg gaacgcagat gcgccgtccc cacaggcctt cgatgagatg  
1680

ctcaagaaca ttcagtccct cacctcctga ccggccacat ccttgccgcc acatcccggg  
1740

tggctctggg gctctgaact ctgacctgtg aatagaagca gcatgcactt tggaaatccg  
1800

gccttttgac cagaacgcac acctcgtcgg ggggccagc ccagccaccc ccagcactt  
1860

tatgtagaga gtgtgacata gacctgcata tttgtcagt ccatgatgga agaagctgag  
1920

catgtcttac caaaaacaga gagaacgagc ctgaatacag cagatgtagg ggacagccgt  
1980

gggaccgcgt gagaattgaa gcggtggggc tcccgacccc tgggctggct ggtggttttc  
2040

tcggaagca ggacctcct gactggtgct cttcctgtga gcggatagag tgatagactg  
2100

ggtcgtgtgt gagacgcatg tgctccaccc cactcctttt gggggaagcc aggcaacagt

2160

ggcctctggg aggggggtcag gaagaggcga acagctcagg cagcgcaggt gtgatgggca

2220

cagtacgcag agcaagctcg ggaagttagt aggatctcag gcttggggcc gggactctgg

2280

agtgaatccc catttctcta ccggttget tggagtttgg acagaagcat ttcacctctg

2340

atctcagctt cccacctgt ggagtgggtt tagtgacctg agtcactagg gaatgtcacc

2400

tgaatgcaca gccagccca tgcacctgcc ccagccctc cagctttgga gccaaaggcca

2460

tgtttccagc cacttgactg tcttcgacgg cctgttccag acaggcggtt tgttttgtcc

2520

atgccttctt ccttgcacgc acacggcgtc aaaaccaagc tgccggccac tgttccaga

2580

acgcaaggct ccaggcccggt gtgtctgaag cagtgaagtgg tccacacagg tgccaggagt

2640

gcccatatga gatgacgagg aaacccttt gcaggtgagg ggacagcttt ctagaaaagc

2700

cacacctgca tctggggaca cactttggaa agtgggaccc tccagcctgg agaccccatg

2760

gactgatgcc tccactgctg tgtgccccat gttgtgttaa cacctgcgtg tggggacccc

2820

atctgaggtc ttggtgagg ttggcatctc ctgaagaaca gagagcacgg tgtccagagc

2880

tggcccttcc ccagcccac agccagctcc gtgcccaggt gggcgcccc agcgagcctt

2940

ccctctctgc cgttgtctt tgtgtctggg ctgctccaag tccttgtgct gggcacctg

3000

gacacgtcct gctgggtgagg gacctcggga aggtgacagt ctgtgtgcct tgggtgtggag

3060

accaacctga ggatgtcctg ggaaatgttt tctgatgaa tttctccttg actggccttt

3120

aaagaacata agaattccca ttgccagcc tcagtgcatt tggcaaagtc ttactttgct

3180

tcccagagtc agagaattgg caaagggtcc taaatggtaa tctggccggc ctgggagaaa

3240

gactcacgag aaaagccagt ggagaaagcg ccttccagg gcggcagcag cgggagccac

3300

gcagaccccg agggcacct gctggctctt gtgtgtggcc ccagtttcta gcggcctttg

3360

cagcattagc ctacaagctt tgcactccc tgccctctgt ggtggcact gtttttctct

3420

cttgccaaat gaggcagtct ctgagtgcg gtgactgtgg ccttgaagcc tggaggactg

3480

ttgggcatgt agactggcac cttgaagatt caccattgtt taaataaaat caagcaaag

3540

cttttttacc aagagcccg gctcgtctt aagggacgca gtccatagagg cgtgcccttt

3600

ggggcttgaa gagcacactg tgggacgcac gtgcttctga ttaaaggaat ctcagatctc

3660

a

3661

<210> 4

<211> 568

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

# ES 2 433 012 T3

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



# ES 2 433 012 T3

Pro His Val Asp Asp Pro Met Arg Phe Lys Pro Leu Phe Arg Ile His  
 210 215 220

Leu Met Glu Arg Lys Ala Ala Thr Val Glu Cys Met Tyr Gly His Lys  
 225 230 235 240

Gly Pro His His Gly His Ile Gln Ile Val Lys Lys Asp Glu Phe Ser  
 245 250 255

Thr Lys Cys Asn Gln Thr Asp His His Arg Met Ser Gly Gly Arg Gln  
 260 265 270

Glu Glu Phe Arg Thr Trp Leu Arg Glu Glu Trp Gly Arg Thr Leu Glu  
 275 280 285

Asp Ile Phe His Glu His Met Gln Glu Leu Ile Leu Met Lys Phe Ile  
 290 295 300

Tyr Thr Ser Gln Tyr Asp Asn Cys Leu Thr Tyr Arg Arg Ile Tyr Leu  
 305 310 315 320

Pro Pro Ser Arg Pro Asp Asp Leu Ile Lys Pro Gly Leu Phe Lys Gly  
 325 330 335

Thr Tyr Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Val Met Leu Ser Phe His Gly  
 340 345 350

Arg Arg Ala Arg Gly Thr Lys Ile Thr Gly Asp Pro Asn Ile Pro Ala  
 355 360 365

Gly Gln Gln Thr Val Glu Ile Asp Leu Arg His Arg Ile Gln Leu Pro  
 370 375 380

Asp Leu Glu Asn Gln Arg Asn Phe Asn Glu Leu Ser Arg Ile Val Leu  
 385 390 395 400

Glu Val Arg Glu Arg Val Arg Gln Glu Gln Glu Gly Gly His Glu  
 405 410 415

Ala Gly Glu Gly Arg Gly Arg Gln Gly Pro Arg Glu Ser Gln Pro Ser  
 420 425 430

# ES 2 433 012 T3

Pro Ala Gln Pro Arg Ala Glu Ala Pro Ser Lys Gly Pro Asp Gly Thr  
435 440 445

Pro Gly Glu Asp Gly Gly Glu Pro Gly Asp Ala Val Ala Ala Ala Glu  
450 455 460

Gln Pro Ala Gln Cys Gly Gln Gly Gln Pro Phe Val Leu Pro Val Gly  
465 470 475 480

Val Ser Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Pro Arg Thr Cys Arg Met Cys Phe  
485 490 495

Tyr Gly Thr Gly Leu Ile Ala Gly His Gly Phe Thr Ser Pro Glu Arg  
500 505 510

Thr Pro Gly Val Phe Ile Leu Phe Asp Glu Asp Arg Phe Gly Phe Val  
515 520 525

Trp Leu Glu Leu Lys Ser Phe Ser Leu Tyr Ser Arg Val Gln Ala Thr  
530 535 540

Phe Arg Asn Ala Asp Ala Pro Ser Pro Gln Ala Phe Asp Glu Met Leu  
545 550 555 560

Lys Asn Ile Gln Ser Leu Thr Ser  
565

<210> 5

<211> 2340

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

tatttggttt gtagacaggg tctcgctgta ttgccagggc cgggtctcgag ctcttggcct

60

cgattgatac tcccgcttgg gctccaaga gatgggggtcc gaggcgagcc cacggcgacg

120

tgcgcggctg ctccaggtgag aggacgcctt cgcgggtcacc acccgcgagc ctgggagacg

180

accccgctca ggggcctcgg cggagcccag ctggagcagg cgtgcgcggc tcccagcagc  
 240  
 tgcaggaaca ggcgcctttt gggcggcgcc gcctggcagg gcctcccttt ccagaccggg  
 300  
 cgcgcataccc cggatctctt gggcgcgcgc gccgcgcgc cctccaagcc ctccccgggg  
 360  
 cttccgcagg gagetcggga tccccgaagg tccctgcaga gctccgcagc tcgggccttt  
 420  
 tggttaccat aaggcggaga cgatggaacg cgcgttggtt caatggacaa aagggtctct  
 480  
 aggcgccttt tggggttctg gctgctgcct ctgtatttgg aggcgtgaag gcgcatactt  
 540  
 ctactcaccg gccggcgcg cagagtttcg ggcgcgggaa gcgggacgca cgggcgcgag  
 600  
 gggcgacccc tatctccaca aaagccgcgg cgcgaagtgg tcgcagagca gcctcgttag  
 660  
 cgcagtaggc agcgcgtcag tctcataatc tgaaggctgt gagttcgagc ctcacacggg  
 720  
 gcagtctaac gttttgcaact cggcatcacc actttctttt ctcatgcccc tcacggggcg  
 780  
 cgccctcagc ctggagggga gggcagcagt gcgggggtctc tgaggctgcc gccccgcggg  
 840  
 gaggggggtg cgcggccggg gcggagctct acgtaggggc ggggctaggc tctccagggg  
 900  
 gcgtggcgag ctctgcggcg ggggcgtggc tcggcgctgg cggggcgggg ccgcgctgga  
 960  
 gcgtgcgcac aggcggcagc agtggccgtc actgggcggc atggcggtgt gtgctcgcct

1020

ttgcggcgctg ggcccgtcgc gcggatgtcg gcgccgccag cagcgccggg gcccggccga

1080

gacggcggcg gccgacagcg agccggacac agaccccag gagggagcgca tcgaggctag

1140

cgcgggggtc gggggcggtt tgtgcgcggg cccctcgccg ccgccccgc gctgctcgt

1200

gctggagctg ccgcccagc tgctgggtga gatcttcgcg tcgctgccgg gcacggacct

1260

accagcttg gccaggtct gcacgaagtt ccggcgcatc ctccacaccg acaccatctg

1320

gaggaggcgt tgccgtgagg gtgagcgcg gcgggtggcg gggccgggag gggcggggg

1380

tcctgccag gtggaggcct cggagctggg agtggcgggg gcggtggccc cggccggggg

1440

ccaccagttg ggcgcggggc ccggcgatgt ggtgttttgg gtgtgggtgg ggagcggcgg

1500

cggtgacacc acgttgaggg gcccaggag gtatttgagg cggttaggga gggccgagg

1560

ggtccaagag aggcagacgg ggtagggagg ggttgagggc gtcagggagg catcgaagag

1620

gccctgacgc ggggcacggg acaccacggg gccgaggccg tgccgggagc tggggctggg

1680

atccctcgag gtctgcgcgg ggcctaagct gacgcctggg ggcgcctcc tctgccctg

1740

tcttgaaggc gagccgaggg tgccccgctg gccctgacca gagacgaggt gaacttgaag

1800

aaatgggagc aggcggggcg cggtttcacg cctgtaatct cagcacttag ggaggccgag

## ES 2 433 012 T3

1860

gcggggcgggt cacctgaggt caggagttcg agaccagcct ggtgaagatg gtaaaacccc

1920

gtctctactt acaaaaatac aaaaattagc cgggcgtgggt agcggggcgcc tgtaatccca

1980

gctactcggg aggggtgaggc agaagaatgg cttgaaccgc ggaggcggag gttgcactga

2040

gccaacatct gggccattgc actccaccct aggcgacaga gtgcgacttg gtctcaaaca

2100

acagcaacaa aaaaaattac gggagtaggg gaagcccagt gtcgggggct cctgatggtg

2160

ggggcgtaga gagacggatg gatcacagcg gtgcgggctg gacttttgcc ttcagcaata

2220

ttggatgtaa cagatcacag gaggagatgt ttatttaato tggagttcaa ggctctctct

2280

gtttaaaggt tgacagctct ttgatgttca agcagctcat atttaggtaa aaaggacagg

2340

<210> 6

<211> 2072

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

aaggaagctt ttgatctag gttcaattc ttgggtcccag ctgaccataa gctccaggtc

60

ctttgtggag tcatgtcacc tctctgcact tgttttctct gttaaaatgg agatgacagt

120

ggtgactctc ttatgggact gctgtaggat gcagtgaggt gatgccacgc atggcttggc

180

atggtacaca gcacgtggaa agctcaatgc aggtgttgcc agtagcagct cttggcccat

240

gtgcagttct gtagttgtgt ggattagtcc ctggcgggtct ttcctttcaa aggctagcgg

300

agacccaagc eggaggacct gggattttgc ttgggacgtg ctgggtgttg gtgattgtga

360

aaagtgcagc tgtggtgggg tgggagtagg ggacaaagag gaagggtgtg tcagcaggtg

420

aggggtgtgag gacagggggt gcgggaggtg tccagggccc tgcactgggc cctggccaag

480

cctagccagt ggagaaggga caatgttcac ccttccccc atgtcttgca cggccccctc

540

ttggccttgg gctgagttga acacacaggc agcacaggga agtacatggg gtggactggc

600

ctctggcact gtctgaacc taacaccagt ggtgaatttg tttccatgga aacatggcac

660

tgtgtccaga caactgaatt ctgcctcacc ttgttcataa actagggatt gtctgatatt

720

ggtttgtgtg gttaggcttc tagagcttat tagaatagac attgcagatt attatattgt

780

aaagggtgac attgactaaa atagaataat gtcttcacg gtgaacaagg gtgtttactg

840

aatgtggaga agtcagtga atctccacag tgacagatgc actctggaga tggggctgag

900

gctaggtgtg cacctccct gccagccatc agcagcctgc ccacgtctgt cgcgttatga

960

gttggtgatc ttaaatttct gcaaagtgtt cttgttacag agtatgggtg ttgcgaaaac

1020

ttgcggaagc tggagatcac aggcgtgtct tgtcgggacg tctatgcgaa gcgtgagtga  
1080  
atctatttgt taccatccat gattaacttt gtaccagaag cagacagtgc acatcaatga  
1140  
caaataatca aagtgattta gtccacactt ttgtttttctc agacaccatc ttacagtcac  
1200  
attttgaata gagcactggt agtaacagca ctaaaattag ggagggggaca ccgattttctc  
1260  
ccattctggg catcgtagat actagtgtct ttaccaggc atcgaggccc tttagagctg  
1320  
agaaatgtag gctgcaccag agcgacttgg gtgttcctgg aggctgcctg tttctctggc  
1380  
ttctgggcct ccagccttca ggatgggact gcctgtggtc attgggaaat gaagctgtgg  
1440  
tgccttctgt ccaagcccca ggtacggaga acagccccc tgctagagtt ctcttcctc  
1500  
ttagcattct gtgagcaggc tgagccccc agcccgttt catgtttctc tggttcacc  
1560  
gctttccaga gtcaactgtg acactcaccg atcaggcaga ggctccttgg cccagggctg  
1620  
tcttcccgcg ggtgtttctt cagtgccagg gactttccca tttcttgctc actggacgaa  
1680  
gctcttggt tttttggatg gtcagagggg ttctgtgagt gtctcatacc ccacgttttc  
1740  
atcttctgac cattctttga gcttcttttc tttttctttt ttcatttctg caaggcagtt  
1800  
gctctttgag tttcttaggc catttgggtc atatcatctc aaagtgacat gaagacatat  
1860

ttctctcttaa gagttgtcag caccaaaagt catgtcccgg tagggacaca ggtgtttggc

1920

ctgcccaggt gttagggttt cctgtaacag ccataggagt gtacacatgg atgtccttc

1980

cagctgtggg ggtcggaggt gttgcctgag cactgagtc tctgtcctg tgggagaggc

2040

catccgggca taggcaggca ggaggcagtg tg

2072

<210> 7

<211> 2087

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

agagttgtca gcacaaaaag tcatgtcccg gtagggacac aggtgtttgg cctgcccagg

60

tgtaggggtt tctgttaaca gccataggag tgtacacatg gatgtcctt ccagctgtgg

120

gggtcggagg tggtgcctga gcactgagtc ctctgtcct gtgggagagg ccatccgggc

180

ataggcaggc aggaggcagt gtggccgagg gtagggcagg gggtagggcac agaagagggg

240

ataggaggac agggcattgg gagatttctt ttcactgctg attcttgacc ccttgaaagt

300

gtttgcaaaa tgccggagaat tcacatgac tgtttccgac agtggtttatt ccccgagtg

360

ttagtctgca gtggccaaag caaatgtcag tgttcatttt cacagcgcag caactgtgtt

420

tctgtgaatt tgctttaagg cttatccagg agaaaattac ttagcttttg gaacaggtgg

480



ES 2 433 012 T3

tggaagaaaa tcagccttag ctccagaaac gggtaggtgta gttgggcaac cttggatgac

540

ctgtgacgag gctggcctga gttagcaggc tgggaaacgc caggtaggtg ctgggcaaag

600

tgagtatggt agccggggta agtggttctt agacgggtcat cccagatgct caccatgccag

660

gacacctgcc ctcccacctc ctgagcccca gtgagctgtg gctgggggcc tggcgggagt

720

gtgctggccc cgggaggagt gtgatcaaat atggaaagga tttccaagct tgctgccacc

780

gtgagtttct ggtggcacca ctgatggaag gaaaacgtgt cacagtgttg ttctctccag

840

caggttttct agagccacct ctctgtgtcc tgggtggctg cataaacacg aggggattgt

900

atcacactgg tgagggggcag gcattgggtc gtattcacgc tgtttgcaca gtctgtataa

960

gggagccatc cttagccctt tcctgtgtgt gtctgttcag gtataaaccc tcgctgaag

1020

tcgggacgtt ttgtgaaaat tctccctgat tatgagcaca tggcgtacag agacgtttac

1080

acctgccgta tgtacctcct gcgagctttg gcttctgcgg cagccagcac ggccaagaac

1140

tgcattggga gggccctctg attcacacat gggacagctt tggctcctgga gcaagcggac

1200

ctcgtggctt tttgtcatcc tttcacgttc acttgcgtga gcgtaggtct gcttcagctg

1260

tgacagagat cacacctgtg tgttggaacc aggtgcatt tggcttacct ttctgcagtg

1320

gtttctgggt actaccagtc gagatcactt taatgcacat tttcacatgt atcgtttatt

1380

gaggagctac tgcagacaca gagaggaacg aacagagtag aagctttaaa attttattct

1440

aaagtgaaat atgaataatt gacttctgac ctttattagt tttaatcaca ttttaatagc

1500

ctatgtgaat taaaaatcac atatgcatat accctcaata gacaaaggca ggtagcaaca

1560

gttgactcct tttttttttt tgaggcagag tctcactctg tcaccaagc tggagtgcag

1620

tgtcacaacc tctgcctcct cggttcaagt aatactgcc cctcagcctc ccaggtagct

1680

aggattacag gcatacacca ccatgccag caaatTTTTT tgtattttta gtagagatgg

1740

ggtttcatca tggtggccag gctggtctca agtgatctgc ccatctcggc ctcccagagt

1800

tctgggatta caggcatgag gtaccgtgcc tggctaacag ttgactcttt agaacttaat

1860

tcttcttttt ggccagacat ggtggctaata gcctgtaata ccagtgcctt gggaggccga

1920

ggcaggtgga tcatctgagg tcaggagtgc gagacctgac tggccaacat ggtgaaactc

1980

atctctacta aaagtacaaa aattagctgg gtgtggtggc gtgtgcttgt aatcccaggt

2040

accagagggc tgagggtgggg gaatcgcttg aaccggggag gtgaagg

2087

<210> 8

<211> 2077

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

gctgatggag agcgggcagg taggggtggag aggcaggaag gttgggtggca gccacatggc  
60  
tgagggccta gagcctggcc agggagtcgt ggagagagggc agtgggtggg ctgggggttc  
120  
aggcctgcct gaaggggagg cagctggtgc agtggcccat accccatggg gtgaaggcct  
180  
gggcagggcc caggggcagc ttcgagggtg acctggagct gctcaggaag tgagatggcc  
240  
cagcctgacc tgaccattgg ctggcaagga acgggatgga gaagttgtgt cctgggcctt  
300  
cagcgagtgt gacattgtca ttgttgggat agctttaaag atctgattgc ttatgacatg  
360  
ccttgtagcg ctaccagcat cttggcattt ggcaggtcta gtccagctcg ctgtttgcac  
420  
gtcttctgtc ttattcctag aagagagagt tcccagcctt gcttgatttc cccccattga  
480  
tgggaggctc atcacttcac gggagactca ttttacttag gccttctgag gatagtttca  
540  
ttctgatagt tttttttttt tttttttttt ggagactgag tttccctctg tcgcccgggc  
600  
tggagtgcag ttgtgtgatc tcggctcact gcaagctcca cctcccaggt tcatgccatt  
660  
ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga ctacaggcac ccgccaccac acccggctaa  
720  
ttttttgtag ttttagtaga gacggggttt caccgtgtta gccaggatgg tctgaatctc

780

ctgaccttgt aatccgccc aagtgtggtg attaaaggcg tgagccaccg caccggcct

840

cattctgata catctttaga ggcttggtgt gcatgtgttt ggagggctct tgcaagcctt

900

ttgtgagtec tcatggttcc ttctccctc tcgggggttcc tgggctccct gggcacgct

960

gggtetaaca cagagacttg ctctttctct cctcctgtag tgcttcaccg atatagacac

1020

atthtgggat tgtggcagcc agatatcggt ccatacggag gactgtgaa cgtggtggtg

1080

agtcgggag cctcgcgacg aggtctgtgc acgggcagga gtggtgcctt acgtggagga

1140

atthgagggc ctcttctacc tgggtacaag ctggcccaga tgtgcgtttg aggtaattac

1200

caaaaaattc ttgtctgtc acttttcagg agccaatttt atthtccaaa tgagcaaagg

1260

tttgcttaga gcaacacttc ggccttggtg cccgtccttg gactctctgg tctgaggggg

1320

tggcttggtg gggcctttgc ttctggacg ctgaggccca tcgcgacat gttggcgggg

1380

tctggagccc gccctcagcc aggtccttc gttcctggtc tttgcccccc atgttcagc

1440

catggtgcac tctgacgtct gtttccttg gttctgtgt ggaccgctc tgaccacct

1500

gcctcccgcc cctgtgccc tctactgga gcctctcgaa cggaaagccc tgccttgact

1560

## ES 2 433 012 T3

ttgttgagct ctgggcaggt ggctggcccc tgctagaaag tgctagaacg ttgcaggcgg  
1620

aagtccaggc tggtaggcaga gtcgtctccg tttcccttct cccggcagcc tgcttgccgt  
1680

tgggggtctga ggaccocgtga ggacatttct ttctgttccg ttgggtctgc catggcagtg  
1740

cctgtctagt cctgggtact tgatcatggc tggagatgga agtctggctt tcttttttat  
1800

taaattcccg tttttcgggtg aagttttcct tctctttggt aatctttttg ggtacagtag  
1860

tgaagtttct tttcaggtct agcccccgcc tttctctctg atctccaggc gtgttggtg  
1920

ccccccacc ctcactgtgc gcctggggac ttgctgggtg ccgtggcctg gtctcctcaa  
1980

gaggccctgg ccccgccctg cgggcaaagt ggagtcaggg cacctgctct gcgcaggccc  
2040

ggggtatgcg cgcgtctcag gcttggggaa gcgtccc  
2077

<210> 9

<211> 2889

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ggatgtttcc tctgagagac cagcccggca gctcacaggg tgggcagatt gctttccttt  
60

cttttagtgg aggaagggtg attgttttac ttactggcag tgagtaatag agtaaaaaaa  
120

aaaaccccaa aaaacaaaaa gcagtggata attggggaaa gtggagtctg tgagagaaca  
180

## ES 2 433 012 T3

gcaccagetc acgcttgacc caggctcgtg agccacagaa atgatggaat tctctccttg  
240  
gttgctggag ctggcagtct catgggtccc agctctccca gaaggggggtg aggctaggct  
300  
gtccttcctt ataagcatgt ggctgctgtg gccagagcgt gctggggccc acccgctct  
360  
gcatttgcac gatcggcgcc cggacacgcy agatcgcaag ggcaacgcac tcctcggctc  
420  
ttcccgtcc tgagcgcccc tcccggggtc ttggcgtctc tctctcccc tgcacttcgg  
480  
ttttgaagca aatcccaggc ccgtggcatt tcagctgtcc gtccctccgg gcagcgccct  
540  
aagaaagggg gtgtttcctg catctccgtg tcaactgccac acctgacaaa agtggcacac  
600  
ggtccttggtg ttgcctggtg cccaggccat gggatgcttc cctgatcacc tcaaagcctc  
660  
ctttgaatgg caatttggtc agctcaggac gcgaacgagg cccttgcaact gctgttggtc  
720  
actctttcct gttgggagat gcaccccctt tccctctgtc tggtcggcac ctcaccccgt  
780  
gtcactttct ggattattct gctcctcct ggtgtccacc tgcattctcag agctggaaga  
840  
tagtgctggg attcgaggca cctcgagggg gggcgtgcag gtcccatgtg ctggtctggc  
900  
aggagcttct ctgtgccatt gcagtgcggg gagccgtgcg gggccgccc tgcctctggcc  
960  
cgggagccac tcatggacct ttgccatct cctcctgtag gtggacggcc tgttcacat  
1020

cggttgatg tacctgcctc cccatgacc ccaagtcgat gacctatga gattcaagcc  
1080

tctgttcagg atccacctga tggagaggaa ggctgccaca gtggagtga tgtacggcca  
1140

caaagggccc caccacggcc acatccaggt gtgtgcagcg gcggggctgg gtctcactg  
1200

tcccagggct gtctgtgtg ggctccagcc aggcctgccg tgctattctc agctgcagac  
1260

ctgggctgta gcagatcggc ggggtggagg gaggtccgc cctgccctgc tgtgcattgt  
1320

ttacgcctcc gtggcgagc ggactctgca gcggtcactt gctggacccc tcttgattct  
1380

gctctcagtt agagccgctg tttctttgca acttcagttc ctctgtcttt ttttctgtt  
1440

tgcaagaata tcagtgtgga atcaagtgcg ctctctgttc tctgatctgg tctggcagtg  
1500

gccccacgg tgagcacagc gtgtcatctg ccacacctg tgtgtgagat gcagccctt  
1560

tgctgctctg tgtaacgctg ggaaatgcaa acgccactct ctcagatgtg ccaactgcctc  
1620

ctgctcttgg gggagtgttg ctcagggaga ctcagctccc tccgctggca ccgcgttgg  
1680

cgcctcttgg gtgcctgcag tggggtttgg tgggtgtggt gagggagggg tctggccac  
1740

ctgcctgggg tgggggatgc tgtgatggac tctgttctc actcttctct ttccttgtgt  
1800

tgcaaacact gaagattgtg aagaaggatg agttctccac caagtccaac cagacggacc

1860

accacaggat gtccggcggg aggcaggagg tgagcccacc agccggccct gtgttcatat

1920

ggtgcggacc tttcctttcc ccacggggaa agtacagacc catgcgggag agaagtcagc

1980

agcatgcgac ctgcatggtg gctgtttcac atggttcagc cggattgtc agtcagacc

2040

gtgcatccgg cactctgag gaacagcacc gtgcgggcgg gcaggttgcc ggtccctcc

2100

ccctgcagaa cgaacgaacc acacaggccg tttcttcagt tagctctgct ttgccctct

2160

ggcgggcaca tccacttget gagggggtgc tgggaggctg cttctaggat gtgagctgca

2220

gggagaccgg agggctgcac ccagagttcc tgtgtttccc atccttgagc agaccgtgtg

2280

gaggcttccg gatcgtgcca gtgcagcggg gaagcctgtg tgtgattgtt tgccctgagta

2340

ttttaatat gccccttgagt tttagctttc aaggatctaa gtcttactgc cctctcaaaa

2400

tactcttaag aaggaagggt cggtggctca cacctgtatt ccagctctt tgggaggctg

2460

aggcaagagg atcacttaaa gtcaggagtt caaaaccagc ctgggcaaca tagtgagacc

2520

ctgtctctac aaaaaccaa aatattagct gggatatggtg gcatgccagc tactcaggag

2580

gctgagggtga gaggattgtc tgagcccagg aggtggagac tgcagtgagc tatgagcgca

2640

ccaccgcact cccatgtggg tggcagagtg agaccctgcc tcaaaaggaa aaacaaaaaa



2700

ttagccaggc atgetaccat gctacggggt tatgccatgt tgcccaggct ggtcacaaac

2760

tcctgggctc aagccgtctt cccacctga cctcccaaag tgctgggatt gcagggtgga

2820

gccatcgccg gcggccaggg tgtgcttttc ttagctagtt tgagttgtgg tggtttcccc

2880

atcagccag

2889

<210> 10

<211> 4378

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

gtgggttttca gaatagatct taaacgtatt ttgtaacatt tattcccaag ttttatgttt

60

ttttgaggat tttgtacata gaattttttt aaattttatt tttatatattt gtgctgctag

120

gacataaaaa tccagggtggc ttctgtgttg accatgtggg cctgccagggt gctcagtgca

180

gctcctgcag tgattttctgt ttcttgtcgg agtttggagc agtgatgtat gaaagcgatt

240

gaccatcgtg tttcctcttt tttgtgagtt gcttatgcgt ccctttcaga gttagggtcta

300

gataatgact ggaaacactg tattgagctg ggaacttgga agtttgggtg aattctgtaa

360

attgtgtaga atcaaaccat taagcacgaa atatcctcag caccatgtga tggcagaatg

420

cagggcggac tgggtggggct gcggagtttt tgggaaccgc cttaacatac ctgcttttcc

480

tttgaaaaag gaaaatccac ccagtcactg gccgagggct cagtgcacgc tccttggtg

540

actcgcacgg ctcaggggtg gtggtgaggg cttctggaac actcaggctc ccaggagcca

600

gagaagcagg ctgaggggct gtgctgtgca gggccagagt ctgtgtagat gctgttcctg

660

ccccaccggg gggcatggaa gggaggccca cctgagttc tggtcacggc tgtggcccc

720

gcctcacctg ggctccctgt agccctgct gcctccgacc cagcagacca agggcccga

780

accttcactt tttgttgga ggcacctctg acgtggggc aaatccggca gctcccttt

840

ctcttccag cgccaagtc atctccccc accaagaggg cctgcaggt gcctgtgcac

900

tgacaaagaa ggacacactg tgtctctca gggcacagc cggcagcctc ttcacagcct

960

cctgtcatat ggatattcat gacctgtgtt cttttggaag gagtttcgga cgtggctgag

1020

ggaggaatgg gggcgcacgc tggaggacat ctccacagag cacatgcagg agctcatcct

1080

gatgaagttc atctacacca gtcagtacga gtgagtgcgg ctctgctcg gtgctggggt

1140

agccctctcc tgggtgtgtc tggggaccag cctgtcccg gtgggtgctg gggcatagtc

1200

ctttgtctca gtgggtgctg ggggtcagcc ctctctctg ctgggggctg ggagtacagc

1260

## ES 2 433 012 T3

ccctctctct ctgggtgctt ggagcatagt tcgtctcttc tgtgggtact tggaacacag  
1320

ccccctcttc tgtgggtgct gggagtgcag gcctccctgt agctgctgtg gcacagcccc  
1380

agaccccatc cttcaccggt gtgtctgttt ttatctgatt tcctgtcacc cctgccaaca  
1440

ctggcactct agagctcagc ccgctcagc ccagtgcggg gatccctcc atggtgactt  
1500

gggtctcttt ctctgggta atggagcaaa ctggcacttc ctttccctc ccacctaaag  
1560

ctctgccctg gcgctgatgc ccccttaac ccagaagtc ctgttggaag cgtgcgtgct  
1620

ggtgggtggt gggggtgagg gctccctgg gcgcattgct gccacaggc ctggtggaca  
1680

cctggccctg gttgagctga gctgccgcc ctacccgccc ctgcaaagct catccctggc  
1740

accttggggt ttctcagtc tgctgcccc acgaggtctc ctgtactgac cgtccgctc  
1800

cccacagcaa ctgcctgacc taccgccgca tctacctgcc gccagccgc cccgacgacc  
1860

tcacaaagcc tggcctcttc aaaggtacct atggcagcca cggcctggag attgtgatgc  
1920

tcagcttcca cggccggcgt gccaggggca ccaagatcac ggtgagtggc ggctgacctg  
1980

gttggtgggg ctctgggggc acctggccca agtgggctgt ggagtcaggg aacttgggca  
2040

gacactgac cccggcacc ttgtctctca gagtgggctt gcacctgcag ccccgggagc  
2100

# ES 2 433 012 T3

ttgggaaagc agattctcgg gccccagcca gccccactga accagaattg catttccacg  
2160

agaccctcag ggagtctgtg tgettccaag gtggccttcc cacagcaccg ctcagccccg  
2220

gccaccctgg cagccctgtg gggtttagga agtctggaca gcagacccca cacagaggct  
2280

cagatttaac tggggacagc ctgggaaagg ggcccccca gcagctgcat ggagaccctt  
2340

gtgcttgacg acagctccca cctgtctga gcttcagcag ctctctctct tggagtggcc  
2400

tgagggtggg ctgtgtggtg agcccagcag tgaacagggg ctcatgttcc catgccaggg  
2460

ctctggcac atgctgcccg cctgcctga atggttattg gggatcctgg cagacagcgc  
2520

ctgaaggggc gaagcctatt ccccgagcct ccagggatca gggccacatc tggcataatg  
2580

gggcattccc tggaccccag agttttggct cctggactcc tcaaggagtt ttggggctga  
2640

cgcattctcc cagggtctgg ctcccagct ctgcctttca ggcagacaga tgtgggctgc  
2700

ccccttgggc tgetgcccag ctctgggatg ttctttgaac ttctctgggc gcagttgagc  
2760

aggtatgagc caccgtctc aggggcactc ataggtgttg ctggccctgc cactttctaa  
2820

gggattctga gaattcttct tctgtaaggg acgttgctaa gtcagtagga gggctggtgc  
2880

cagctcgtc agccagaggt ggatctgggc tggagccac acagtggtag tgetgctgct

2940

gctggcctga gccctgctga ctgccacctg ctccacaggg cgaccccaac atccccctg

3000

ggcagcagac agtggagatc gacctgagge atcgatcca gctgcccagac ctcgagaacc

3060

agcgcaactt caatgagctc tcccgcatcg tcctggaggt ggcgagagg gtgcgccagg

3120

agcagcagga aggcgggcac gaggcgggcg agggctcgtgg ccggcagggc ccccgaggat

3180

cccagccaag ccctgcccag ccagggcag aggcgcccag caaggccca gatgggacac

3240

ctggtgagga tgggtggcag cctggggatg ccgtagctgc ggccgagcag cctgcccagt

3300

gtgggcaggg gcagccgttc gtgctgcccg tgggcgtgag ctccaggaat gaggactacc

3360

cccgaacctg caggatgtgg taaggatgcg gcgggtactg gggcctgaag gtgggacagc

3420

atgggcttca gcgagggccc cagccccaca cctagcacag gcggagaggg cctgtgacct

3480

cacagagggc ggcagccggt gctttgggac aggagtgcgg cctctgacct cttgggcat

3540

gttccccagc acctgagcaa gcggccgcgc agctgggtcc cgtcttgag gtcctgtcc

3600

ttccaccct tctgggttac ctgagagctg caggggcatg aggcttcag atgcctcaca

3660

tcctgcaat agtgccgctc cccaggggc ttctaaagct acttgtttgc agtcaatcaa

3720

gtgaaatata atgtaaactg tccagcagct ttgaaagtag agaataaaca aggcccttc

3780

cccacccacc ctgtggaaag cccgtctggt ttggtgtcct cctggacagc gtcttgccgg

3840

tcacctttgg ccctctcccg gtgcgtgggt cagatgtggg tcctgctttc ctgccccctc

3900

cctcctctgt gcctgcctgc ctctgctgtg cggggccagt gccttggtgg ccagtggagt

3960

ggacaccagc tgcgactgcg tgggaggggc tggcattgcc gctgccactg cagggttgg

4020

gcggctgaca tgggacgagg ctgtcacagc tgccagctcc tgtctcgctg acttttttta

4080

tacagttttg tctgggccac cgccttcagt gccacgggac ccttgccgtt caggctgctc

4140

ctcatagatg aacaaggccc tgccccgtgt ccttaccctt tagagctgtt taaattcaaa

4200

tgaactgaaa ctgaatatga aaaatccagg ccctcagccg cccaggccat gtttcaagt

4260

ctccatggcc acatgtggct ggtggacagt gcagctctag aacattccat caccacagag

4320

ggttctgctg gacagtggcc ttgggggctg ttttgagggg ccgcctgtca gtctcctg

4378

<210> 11

<211> 3174

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

atagctaaaa aaggaaaaag ctctgttacc cttaaacaat ctcagaactc ctaatacctc

60

acagtgggct cagagccagt ttgcgagtca cagcacgtgc tgcagccact gaccaggaag

120

acctgtccag cctccgtccc cagctaacct gcaggacagt ccctgacgtg ctgaatatgg

180

gggctcccgg gcccttccct gtctagttta tggatctgca gggcctggcc acggcacctg

240

tacaggggaat gcctgttgct ttttttctga ccacagtgcc gatggctgca cctgcctctg

300

ggccctggaa cttctccccg agcttgagaa gccctctgag gccaggccct ggtccacggg

360

gctgttcttt cccccggcct ttggagcctc agtgggtgat tccaggccag ccccttactt

420

ctcgtcatct gttggaagaa tttagctgct tgcaagacag acataagtgt cttcctgtct

480

gatgttgacc tcaaagccat aaatgggtgt ttgcgacttc tgagttaatg tcagctgcag

540

gctgcttgta ttagagctaa ttgtatgggg acataactcc cagacattaa gatttttttt

600

cacattgggc ctcctttatg aaatgtgtgt ttggaacag agctctctgg gcctgcagag

660

acctcgtttt agttcagtgt ttcagcattg tgcagtcagt gggatgaatcc ctcacgggtg

720

ctgcgagtea ggcgccatcc ccgagcagc ccgagctct ggcctctgag tccatcatca

780

ggtgggctcg gcctgcgccc ttagctaccc cttcagagac aggctcagcc cacaccccca

840

gctgcccctg cagagacagg ctggctctgg gagtcagctt ctggctgatg aacagtggat

900

## ES 2 433 012 T3

gtggctcttg cggcacagag cggggtcgca gaatgctgta cgtggcgtgc atttgactca  
960  
gccctcccc agctcacagt ttccctcttg tttctgctca gtttttatgg cacaggcctc  
1020  
atcgcgggcc acggcttcac cagccctgaa cgcacccccg gggcttcat cctcttcgat  
1080  
gaggaccgct tcgggttcgt ctggctggag ctgaaatcct tcagcctgta cagccgggctc  
1140  
caggccacct tccggaacgc agatgcgccg tccccacagg ccttcgatga gatgctcaag  
1200  
aacattcagt cctcacctc ctgaccggcc acatccttgc cgcacatcc cgggtggctc  
1260  
tggggctctg aactctgacc tgtgaataga agcagcatgc actttggaaa tccggccttt  
1320  
tgaccagaac gcacacctcg tcggggggcc cagtccagcc accccccagc actttatgta  
1380  
gagagtgtga catagacctg catatttgtc agtgccatga tggaagaagc tgagcatgtc  
1440  
ttacaaaaa cagagagaac gagcctgaat acagcagatg taggggacag ccgtgggacc  
1500  
gcgtgagaat tgaagcgggtg gggttcccgc accctgggct ggctgggtggt tttctcggga  
1560  
agcaggacct tctgactgg tgctcttctc gtgagcggat agagtgatag actgggtcgt  
1620  
gtgtgagacg catgtgctcc accccactcc ttttggggga agccaggcaa cagtggcctc  
1680  
tgggaggggg tcaggaagag gcgaacagct caggcagcgc aggtgtgatg ggcacagtac  
1740



gcagagcaag ctggggaagt tggtaggata tcaggcttgg ggccgggact ctggagtga  
1800  
tccccatttc tctaccggt tgcctggagt ttggacagaa gcatttcacc tctgatctca  
1860  
gcttccccac ctgtggagtg ggtttagtga cctgagtcac tagggaatgt cacctgaatg  
1920  
cacagcccag cccatgcacc tgcccagcc cctccagctt tggagccaag gccatcgttc  
1980  
cagccacttg actgtcctcg acggcctgtt ccagacaggg cgtttgtttt gtccatgcct  
2040  
tcctccctgc acgcacacgg cgtcaaaacc aagctgccgg ccactgtctc cagaacgcaa  
2100  
ggctccaggc ccgtgtgtct gaagcagtga gtgggtccaca caggtgccag gagtgccat  
2160  
atgagatgac gaggaaaccc ctttgcaggt gaggggacag ctttctagaa aagccacacc  
2220  
tgcatctggg gacacacttt ggaaagtggg accctccagc ctggagacc ccatggactga  
2280  
tgccctcact gctgtgtgcc ccatgttgtg ttaacacctg cgtgtgggga ccccatctga  
2340  
ggtcttggct gaggttggca tctcctgaag aacagagagc acggtgtcca gagctggccc  
2400  
ttccccagc ccacagccag ctccgtgcc gagtgggcgt cccagcgag ccttccctct  
2460  
ctgccgttg tcttgtgtc tgggctgtc caagtcttg tgctgggcac cctggacacg  
2520  
tcctgtggt gagggacctc gggaaggatga cagtctgtgt gccttgggtg ggagaccaac

2580

ctgaggatgt cctgggaaat gttttcctga tgaatttctc cttgactggc ctttaaagaa

2640

cataagaatt cccattgccc agcctcagtg catttggcaa atgettactt tgcttcccag

2700

agtcagagaa ttggcaaagg ttcttaaagt gtaattctggc cggcctggga gaaagactca

2760

cgagaaaagc cagtggagaa agcgcccttc cagggcggca gcagcgggag ccacgcagac

2820

cccgaggcgc acctgctggc tcttgtgtgt ggccccagtt tctagcggct tttgcagcat

2880

tagcctacaa gctttgtcac tcctgcct ctgtggtggt cactgttttt ctctcttgcc

2940

aatgaggca gtctctgagt gacggtgact gtggccttga agcctggagg actgttgggc

3000

atgtagactg gcaccttgaa gattcaccat tgtttaaata aaatcaagca aatgcttttt

3060

taccaagagc ccgagcctcg ctctaaggga cgcagtccta gaggcgtgcc ctttggggct

3120

tgaagagcac actgtgggac gcacgtgctt ctgattaaag gaatctcaga tctc

3174

<210> 12

<211> 1767

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 12

cgcgtccgcg tgcgcgcctc cgcggtggtg acgggcatgg cgggtgtgtgc tcggctctgc

60

ggcgtggggc ccgcgcgtgg gtgccgcgcg cgccagcagc gccgcggccc ggccgagact

120

gcggcgccgg acagtgaggc ggacacggac cccgaggagg agcgcatcga ggcggggccc

180

gcgcgttgct ctctgctgga gctcccgcct gagctgctcg tggagatctt cgcgtcgtcg

240

cccgccaccg acctgcccag cctggctcag gtctgcagca ggttcgcgcg aatcttgca

300

acggacacca tctggagacg gcgctgccgc gaggagtatg gcgtttgtga gaacctgcgg

360

aagctggaga tcacaggtgt gtcttgccgg gacgtctatg caaaactgct tcaccgatac

420

agacacattt tggggctgtg gcagccagat atcgggccgt acggaggatt gctgaacgtc

480

gtggtggacg gactgttcat cattggctgg atgtacctgc cacctcatga cccccacgtg

540

ggagacccca tgcggttcaa gccactgttt agaatccatc tgatggagag gaagtcggct

600

acagtggagt gtatgtacgg ccacaaaggc cccacaacg gccacatcca gattgtgaag

660

agggacgagt tctccaccaa gtgtaaccag acagatcacc acaggatgtc cggctggagg

720

caggaggagt ttcggacgtg gctgaaggag gactggggcc gcacgctgga agacatcttc

780

cacgagcaca tgcaggagct gattctgatg aagttcatct acaccagtca gtacgacaac

840

tgctgacct accgacggat ctacctccc cccagccacc ctgacgacct catcaagccc

900

ggcctcttca agggcaccta tggcagccac gggctggaga ttgtgatgct cagcttccac

960

ggctcacgcg cctggggcac caagatcacg ggcgacccca acatccccgc gggacagcag

1020

actgtagaga ttgacctgca ggcgcgcac cagctgccgg acgtggagaa cctccgaaac

1080

ttcaacgagc tctccaggat tgtcctggag gtccgggagc aggtgccgca ggagcaggag

1140

gccggcgagg ggcgcgcgc accccgggag ccttcagcca aggccgctga tgggccacct

1200

gctaaggacg gcaaagagcc tggagggtga gccgaggcag ctgagcagtc ggcctcgtct

1260

gggcaggggc agccgtttgt gcttctgtg ggtgtcagct cgaggaacga ggattacccc

1320

cgcacttgcc gcctatgttt ctatggcaca ggcctcatcg ctggccacgg ctttaccagc

1380

cctgagcgca cccccggagt cttcgtctg ttgatgagg accgctttgg atttctgtgg

1440

ctggaattga agtccttcag cttgtacagc cgagtccagg ccaccttcca gaacgccgcc

1500

ggcgcgtcgc cgcaggcctt tgacgagatg ctcaggaaca tccagtctct cacctcctga

1560

cctccgcac,gtggggcgag aggtgcacc ggggcccggg tgggggaagc atgcacttta

1620

gaaatgaacg cacacctcct cactggggtc ccggtcgccc cgggacgctt cttgtatagt

1680

gtgtaacata ctcttgtaga ttgacttgt tggtagctat gaaggagaac gctaagcatg

1740

gtgagaaaat aaacggagtt gagccag

1767

<210> 13

<211> 507

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

5

# ES 2 433 012 T3

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

# ES 2 433 012 T3

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

# ES 2 433 012 T3

Ala Ala Glu Gln Ser Ala Ser Ser Gly Gln Gly Gln Pro Phe Val Leu  
405 410 415

Pro Val Gly Val Ser Ser Arg Asn Glu Asp Tyr Pro Arg Thr Cys Arg  
420 425 430

Leu Cys Phe Tyr Gly Thr Gly Leu Ile Ala Gly His Gly Phe Thr Ser  
435 440 445

Pro Glu Arg Thr Pro Gly Val Phe Val Leu Phe Asp Glu Asp Arg Phe  
450 455 460

Gly Phe Leu Trp Leu Glu Leu Lys Ser Phe Ser Leu Tyr Ser Arg Val  
465 470 475 480

Gln Ala Thr Phe Gln Asn Ala Ala Ala Pro Ser Pro Gln Ala Phe Asp  
485 490 495

Glu Met Leu Arg Asn Ile Gln Ser Leu Thr Ser  
500 505

<210> 14

<211> 5106

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

ggcatggcgg tgtgtgctcg ctttgcggc gtgggcccggt cgcgcggatg tcggcgccgc

60

cagcagcgcc ggggcccggc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc

120

gaggaggagc gcacgagggc tagcgccggg gtcggggggcg gcttgtgcgc gggcccctcg

180

ccgccgcccc cgcgctgctc gctgctggag ctgccgcccg agctgctggt ggagatcttc

240

gcgtcgctgc cgggcacgga cctaccacgc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc

300

## ES 2 433 012 T3

atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa

360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagctgctt

420

caccgatata gacacatttt gggattgtgg cagccagata tcgggccata cggaggactg

480

ctgaacgtgg tggatggacgg cctgttcac atcgggtgga tgtacctgcc tccccatgac

540

ccccacgtcg atgacctat gagattcaag cctctgttca ggatccacct gatggagagg

600

aaggctgcca cagtggagtg catgtacggc caciaagggc cccaccacgg ccacatccag

660

attgtgaaga aggatgagtt ctccaccaag tgcaaccaga cggaccacca caggatgtcc

720

ggcgggagggc aggaggagtt tcggacgtgg ctgagggagg aatggggggcg cacgctggag

780

gacatcttcc acgagcacat gcaggagctc atcctgatga agttcatcta caccagtcag

840

tacgacaact gcctgaccta ccgcgcacac tacctgccgc ccagccgccc cgacgacctc

900

atcaagcctg gcctcttcaa aggtacctat ggcagccacg gcctggagat tgtgatgctc

960

agcttccacg gccggcgtgc caggggcacc aagatcacgg gcgaccccaa catccccgct

1020

gggcagcaga cagtggagat cgacctgagg catcggatcc agctgccga cctcgagaac

1080

cagcgcaact tcaatgagct ctcccgcatc gtccctggagg tgcgcgagag ggtgcgccag



1140

gagcagcagg aaggcgggca cgaggcgggc gagggtcgtg gccggcaggg cccccgggag

1200

tcccagccaa gccctgccc gcccagggca gaggcgccc gcaaggggcc agatgggaca

1260

cctgggtgagg atgggtggcga gcctggggat gccgtagctg cggccgagca gcctgcccag

1320

tgtgggcagg ggcagccgtt cgtgctgccc gtgggcgtga gctccaggaa tgaggactac

1380

ccccgaacct gcaggatgtg tttttatggc acaggcctca tcgcgggcca cggcttcacc

1440

agccctgaac gcacccccgg ggtcttcac cctctcgatg aggaccgctt cgggttcgtc

1500

tggctggagc tgaaatcctt cagcctgtac agccgggtcc aggccacctt ccggaacgca

1560

gatgcgccgt cccacagge cttegatgag atgctcaaga acattcagtc cctcacctcc

1620

tgaccggcca catccttgcc gccacatccc ggggtggctct ggggctctga actctgacct

1680

gtgaatagaa gcagcatgca ctttggaat ccggcctttt gaccagaacg cacacctcgt

1740

cggggggccc agtccagcca cccccagca ctttatgtag agagtgtgac atagacctgc

1800

atatttgtca gtgccatgat ggaagaagct gagcatgtct taccaaaaac agagagaacg

1860

agcctgaata cagcagatgt aggggacagc cgtgggaccg cgtgagaatt gaagcgggtg

1920

ggttcccgca ccctgggctg gctgggtggtt ttctcgggaa gcaggaccct cctgactggt

1980

gctcttcctg tgagcggata gagtgataga ctgggtcgtg tgtgagacgc atgtgctcca

2040

ccccactcct tttgggggaa gccaggcaac agtggcctct gggaggggggt caggaagagg

2100

cgaacagctc aggcagcgca ggtgtgatgg gcacagtacg cagagcaagc tcgggaagtt

2160

ggtaggatct caggcttggg gccgggactc tggagtgaat cccatttct ctaccggctt

2220

gcttggagtt tggacagaag catttcacct ctgatctcag cttccccacc tgtggagtgg

2280

gtttagtgc ctgagtcact agggaatgct acctgaatgc acagcccagc ccatgcacct

2340

gccccagccc ctccagcttt ggagccaagg ccatcgctcc agccacttga ctgtcctcga

2400

cggcctgttc cagacagggc gtttgttttg tccatgcctt cctccctgca cgcacacggc

2460

gtcaaaacca agctgccggc cactgtctcc agaacgcaag gctccaggcc cgtgtgtctg

2520

aagcagtgcg tggccacac aggtgccagg agtgcccata tgagatgacg aggaaacccc

2580

tttgagggtg aggggacagc tttctagaaa agccacacct gcctctgggg acacactttg

2640

gaaagtggga cctccagcc tggagacccc atggactgat gcctccactg ctgtgtgccc

2700

catgttgtgt taacacctgc gtgtggggac cccatctgag gtcttggctg aggttggcat

2760

ctcctgaaga acagagagca cgggtgtccag agctggccct tccccagcc cacagccagc  
2820

tccgtgcccg agtgggcgtc cccagcgagc cttccctctc tgccgcttgt ccttgtgtct  
2880

gggctgctcc aagtccctgt gctgggcacc ctggacacgt cctgctgggtg agggacctcg  
2940

ggaaggtgac agtctgtgtg ccttgggtgtg gagaccaacc tgaggatgtc ctgggaaatg  
3000

ttttcctgat gaatttctcc ttgactggcc tttaaagaac ataagaattc ccattgccca  
3060

gcctcagtgc atttggcaaa tgcttacttt gcttcccaga gtcagagaat tggcaaaggt  
3120

tcctaaatgg taatctggcc ggctggggag aaagactcac gagaaaagcc agtggagaaa  
3180

gcgcccttcc agggcgggcag cagcgggagc cacgcagacc ccgaggcgca cctgctggct  
3240

cttgtgtgtg gccccagttt ctageggctt ttgcagcatt agcctacaag ctttgtcact  
3300

ccctgccctc tgtgggtggc actgtttttc tctcttgcca aatgaggcag tctctgagtg  
3360

acggtgactg tggccttgaa gcctggagga ctgttgggca tgtagactgg caccttgaag  
3420

attcaccatt gtttaaataa aatcaagcaa atgctttttt accaagagcc cgagcctcgc  
3480

tctaagggac gcagtcctag aggcgtgccc ttgggggctt gaagagcaca ctgtgggacg  
3540

cacgtgcttc tgattaaagg aatctcagat ctcaattacg cttccagtgt ttgggtatag  
3600

aaatagcttc caccatcat gtctcagcca tgggctgttg gtcagttcat gtggtctctg  
 3660  
 gttctggtgt gtatgttggg ggcggggggc tctccatggt ggtgacctgc agtgatgcc  
 3720  
 ggcagggcca gagccacaca gccaggaaag ggaggccttt ttggccgcac agccagtccc  
 3780  
 ttcagtcgtg actacaggtc ttgttttttc cgtccgatg tgtccttagc cagttcttgg  
 3840  
 ctccggttct gtagggacag gcactgaatc tgcgcgcctc aaaacagcag cttcccttcc  
 3900  
 gggggaggggc atccaccctc tcaggggatc ctgcagggtg cccatttctt gcaggtgaga  
 3960  
 actcggaagg gctgatgtcg tcatcagagg cctaagggca gctgagagtt ggataaaacc  
 4020  
 gtttccaagg aggaggctga gtaaccctgt tcaggacagc caagcgcatt aggcttgatt  
 4080  
 ggggaagggtg gcaggtggag ttgggaggtt gggactctcc atcttttgca ccacggatgc  
 4140  
 ctttctgtcg ctgtctcact ctggggcagg atcaagtctg ctctctggag tggggctgcc  
 4200  
 tgcagtgcag ctctgcacac ctgaacgtgt tctttgtcac ttgtttggaa atgatgtgat  
 4260  
 tgaagatttc agagagggtca ttggaggctt ttctgtgccg gcactgaatg ttcatttgca  
 4320  
 tgaggaagtt gcaaacgact tctgcaggct gagattcaag gcaggtggta ttggggctcc  
 4380  
 tcagcccacc tgggcggtga cctcaagtgt ccactgctga gtgtgagtgg ctttgcaggc

## ES 2 433 012 T3

4440

ctggtggtgg gagagcctca ggctccctcc ttcttcgttc ctgaccatgc cctgggcccc

4500

ttcagtctgc ctgcggctct gtggcatccc tgccctgaca ctgggcacct gtgcccttag

4560

caagcccacc tggcacacga ggagggaggg gtgggtggcc atgtccttc totagccaca

4620

tgccctgctg gccgctccat tctgagcttt gtgcagaacc gggctctgagc tggagatttt

4680

tctctgagaa cctgcagttg tgctgcagcc gcacgcaagg gcccttcagc cgctggctct

4740

ggcttccttg actcctcagg gcgtgttcac cccaggett tctcacctgc acacggttag

4800

gccattttca gtgctcgtgg gcagtcacgg acagcagcag aaactcctca gccctttgt

4860

tacttcagaa cgcctgccca catgcatctt ctgagctcgt gttgtcctca tggccgtggg

4920

gtcttgggtg cgaacaggag atgctgagct gtggtccacc gtccaagggtg ctgcagaaag

4980

cagctaggct cttttaggat gtttctattc tggttgctgc ctctgtggtg taacttttaa

5040

gaacacttac gggaatgtgc tcatagaacc atcacctgtc ctgagaataa aactcctgga

5100

atcatg

5106

<210> 15

<211> 5193

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccgt cggcgggatg tcggcgccgc  
60  
cagcagcgcc ggggcccggc cgagacggcg gcgcccgaca gcgagccgga cacagacccc  
120  
gaggaggagc gcatcgaggc tagcgccggg gtggggggcg gcttgtgcgc gggcccctcg  
180  
ccgcgcggcc cgcgctgctc gctgctggag ctgcgcggcg agctgctggt ggagatcttc  
240  
gcgtcgctgc cgggcacgga cctaccagc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc  
300  
atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa  
360  
aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgcggg acgtctatgc gaagcgtata  
420  
aaccctcgcg tgaagtcggg acgttttgtg aaaattctcc ctgattatga gcacatggcg  
480  
tacagagacg ttacacctg cctgcttcac cgatatagac acattttggg attgtggcag  
540  
ccagatatcg ggccatacgg aggactgctg aacgtggtgg tggacggcct gttcatcate  
600  
gggtggatgt acctgcctcc ccatgacccc cagtcgatg acctatgag attcaagcct  
660  
ctgttcagga tccacctgat ggagaggaag gctgccacag tggagtgcac gtacggccac  
720  
aaagggcccc accacggcca catccagatt gtgaagaagg atgagttctc caccaagtgc  
780  
aaccagacgg accaccacag gatgtccggc gggaggcagg aggagtctcg gacgtggctg

840

agggaggaat gggggcgcac gctggaggac atcttcacg agcacatgca ggagctcatc

900

ctgatgaagt tcattctacac cagtcagtac gacaactgcc tgacctaccg ccgcatctac

960

ctgccgcccga gccgccccga cgacctcatc aagcctggcc tcttcaaagg tacctatggc

1020

agccacggcc tggagattgt gatgctcagc ttccacggcc ggcgtgccag gggcaccaag

1080

atcacgggcg accccaacat ccccgctggg cagcagacag tggagatcga cctgaggcat

1140

cggatccagc tgcccgaacct cgagaaccag cgcaacttca atgagctctc ccgcatcgtc

1200

ctggaggtgc gcgagagggc gcgccaggag cagcaggaag gcgggcacga ggcgggcgag

1260

ggtcgtggcc ggcagggccc ccgggagtc cagccaagcc ctgccagacc cagggcagag

1320

gcgccagca agggcccaga tgggacacct ggtgaggatg gtggcgagcc tggggatgcc

1380

gtagctgcgg ccgagcagcc tgcccagtgt gggcaggggc agccgttcgt gctgcccgctg

1440

ggcgtgagct ccaggaatga ggactacccc cgaacctgca ggatgtgttt ttatggcaca

1500

ggcctcatcg cgggccacgg cttcaccagc cctgaacgca cccccgggt cttcatcctc

1560

ttcgatgagg accgcttcgg gtctgtctgg ctggagctga aatccttcag cctgtacagc

1620

cgggtccagg ccaccttccg gaacgcagat gcgccgtccc cacaggcctt cgatgagatg  
 1680  
 ctcaagaaca ttcagtcctt cacctcctga ccggccacat ccttgccgcc acatcccggg  
 1740  
 tggctctggg gctctgaact ctgacctgtg aatagaagca gcatgcactt tggaaatccg  
 1800  
 gccttttgac cagaacgcac acctcgtcgg ggggccaggt ccagccaccc cccagcactt  
 1860  
 tatgtagaga gtgtgacata gacctgcata ttgtcagtg ccatgatgga agaagctgag  
 1920  
 catgtcttac caaaaacaga gagaacgagc ctgaatacag cagatgtagg ggacagccgt  
 1980  
 gggaccgcgt gagaattgaa gcggtggggg tccgcaccc tgggctgggt ggtggttttc  
 2040  
 tcgggaagca ggacctcctt gactgggtgt cttcctgtga gcggatagag tgatagactg  
 2100  
 ggtcgtgtgt gagacgcatg tgctccaccc cactcctttt gggggaagcc aggcaacagt  
 2160  
 ggcctctggg aggggggtcag gaagaggcga acagctcagg cagcgcaggt gtgatgggca  
 2220  
 cagtacgcag agcaagctcg ggaagtgggt aggatctcag gcttggggcc gggactctgg  
 2280  
 agtgaatccc catttctcta ccggcttgtt tggagtttgg acagaagcat ttcacctctg  
 2340  
 atctcagctt cccacctgtt ggagtgggtt tagtgacctg agtcactagg gaatgtcacc  
 2400  
 tgaatgcaca gccagccca tgcacctgcc ccagccctc cagctttgga gccaaaggcca  
 2460



tegtccagc cacttgactg tctcgcagg cctgttccag acagggcggt tgttttgtcc  
 2520  
 atgccttctt ccttgcagc acacggcgtc aaaaccaagc tgccggccac tgtctccaga  
 2580  
 acgcaaggct ccaggcccggt gtgtctgaag cagtgcgtgg tccacacagg tgccaggagt  
 2640  
 gcccatatga gatgcagagg aaaccccttt gcagggtgagg ggacagcttt ctgaaaaagc  
 2700  
 cacacctgca tctggggaca cactttggaa agtgggaccc tccagcctgg agaccccatg  
 2760  
 gactgatgcc tccactgctg tgtgccccat gttgtgttaa cacctgcgtg tggggacccc  
 2820  
 atctgaggtc ttggctgagg ttggcatctc ctgaagaaca gagagcacgg tgtccagagc  
 2880  
 tggcccttcc cccagcccac agccagctcc gtgcccaggt gggcgteccc agcgagcctt  
 2940  
 ccctctctgc cgcttgtctt tgtgtctggg ctgctccaag tcttgtgct gggcacctg  
 3000  
 gacacgtcct gctggtgagg gacctcgga aggtgacagt ctgtgtgcct tgggtgtggag  
 3060  
 accaacctga ggatgtcctg ggaaatgttt tctgatgaa tttctccttg actggccttt  
 3120  
 aaagaacata agaattccca ttgccagcc tcagtgcatt tggcaaatgc ttactttgct  
 3180  
 tcccagagtc agagaattgg caaaggttc taaatggtaa tctggccggc ctgggagaaa  
 3240  
 gactcacgag aaaagccagt ggagaaagcg cccttccagg ggggcagcag cgggagccac

3300

gcagaccccg aggcgcacct gctggctctt gtgtgtggcc ccagtttcta gcggcttttg

3360

cagcattagc ctacaagctt tgtcactccc tgccctctgt ggtggtcact gtttttctct

3420

cttgccaaat gaggcagtct ctgagtgcgc gtgactgtgg ccttgaagcc tggaggactg

3480

ttgggcatgt agactggcac cttgaagatt caccattgtt taaataaaat caagcaaag

3540

cttttttacc aagagcccg gctcgcctt aagggaagca gtcctagagg cgtgcccttt

3600

ggggcttgaa gagcacactg tgggacgcac gtgcttctga ttaaaggaat ctcatctc

3660

aattacgctt ccagtgtttg ggtatagaaa tagcttcac ccatcatgtc tcagccatgg

3720

gctgttggtc agttcatgtg gctcctgggt ctggtgtgta tgttgggggc gggggtctct

3780

ccatggtggt gacctgcagt gatgccaggc agggccagag ccacacagcc aggaaaggga

3840

ggcctttttg gccgcacagc cagtcccttc agtcgtgact acaggtcttg ttttttcgc

3900

tccgatgtgt ccttagccag ttcttggctc cggttctgta gggacaggca ctgaatctgc

3960

gcgcctcaaa acagcagctt cccttcggg ggagggcatc caccctctca ggggatcctg

4020

caggtggccc atttctgca ggtgagaact cggaagggt gatgtcgtca tcagaggcct

4080

aagggcagct gagagttgga taaaaccgtt tccaaggagg aggctgagta acccagttca

4140

ggacagccaa gcgcattagg cttgattggg gaaggtggca ggtggagttg ggagggttggg

4200

actctccatc ttttgaccca cggatgcctt tctgtcgtg tctcaactctg gggcaggatc

4260

aagtctgctc tctggagtgg ggctgcctgc agtgcagctc tgcacacctg aacgtgttct

4320

ttgtcacttg tttggaaatg atgtgattga agatttcaga gaggtcattg gaggcctttc

4380

tgtgccggca ctgaatgttc atttgcattga ggaagttgca aacgaattct gcaggctgag

4440

attcaaggca ggtggtattg gggtccttca gccacactgg gccgtgacct caagtgtcca

4500

ctgctgagtg tgagtggctt tgcaggcctg gtggtgggag agcctcaggc tccctccttc

4560

ttegttcttg accatgccct gggccccctc agtctgcctg cggctctgtg gcatccctgc

4620

cctgacactg ggcacctgtg cccctagcaa gccacactgg cacacgagga gggaggggtg

4680

ggtggccatg tccctcctct agccacatgc cctgctggcc gctccattct gagctttgtg

4740

cagaaccggg tetgagctgg agatttttct ctgagaacct gcagttgtgc tgcagccgca

4800

cgcaagggcc cttcagccgc tggctctggc ttccctgact cctcagggcg tgttcacccc

4860

caggctttct cacctgcaca cggttaggcc attttcagtg ctggtgggca gtcacggaca

4920

## ES 2 433 012 T3

gcagcagaaa ctctcagcc cctttgttac ttcagaacgc ctgccacat gcattctctg

4980

agctcgtgtt gtctcatgg ccgtggggtc ttgggtgcga acaggagatg ctgagctgtg

5040

gtccaccgtc caaggtgctg cagaaagcag ctaggctctt ttaggatgtt tctattctgg

5100

ttgctgcctt cgtggtgtaa cttttaagaa cacttacggg aatgtgctca tagaaccatc

5160

acctgtctg agaataaaac tcctggaatc atg

5193

<210> 16

<211> 5924

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccgt cgcgcggatg tcggcgccgc

60

cagcagcgc gccggcccgc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc

120

gaggaggagc gcacgagggc tagcgccggg gtcggggggc gcttgtgcgc gggcccctcg

180

ccgccgcccc cgcgctgctc gctgctggag ctgccgcccg agctgctggg ggagatcttc

240

gcgtcgctgc cgggcacgga cctaccacgc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc

300

atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa

360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagctgctt

420

caccgatata gacacatttt gggattgtgg cagccagata tcggggccata cggaggactg  
 480  
 ctgaacgtgg tggatggacgg cctgttcac atcgggtgga tgtacctgcc tccccatgac  
 540  
 cccacgtcg atgaccctat gagattcaag cctctgttca ggatccacct gatggagagg  
 600  
 aaggctgcca cagtggagtg catgtacggc cacaagggc cccaccacgg ccacatccag  
 660  
 attgtgaaga aggatgagtt ctccaccaag tgcaaccaga cggaccacca caggatgtcc  
 720  
 ggcgaggagg aggaggagtt tcggacgtgg ctgaggagg aatgggggag cagctggag  
 780  
 gacatcttcc acgagcacat gcaggagctc atcctgatga agttcatcta caccagtcag  
 840  
 tacgacaact gcctgaccta ccgcccacac tacctgccgc ccagccgccc cgacgacctc  
 900  
 atcaagcctg gcctcttcaa aggtacctat ggcagccacg gcctggagat tgtgatgctc  
 960  
 agcttccacg gccggcgtgc caggggcacc aagatcacgg ggcaccccaa catccccgct  
 1020  
 gggcagcaga cagtggagat cgacctgagg catcggatcc agctgcccga cctcgagaac  
 1080  
 cagcgcaact tcaatgagct ctcccgcac gtccctggagg tgcgcgagag ggtgcgccag  
 1140  
 gagcagcagg aaggcgggca cgaggcgggc gagggtcgtg gccggcaggg cccccgggag  
 1200  
 tcccagccaa gccctgccc gccagggca gaggcgcca gcaaggccc agatgggaca  
 1260

cctgggtgagg atgggtggcga gcctggggat gccgtagctg cggccgagca gcctgccag  
1320

tgtgggcagg ggcagccgtt cgtgctgcc gtgggcgtga gctccaggaa tgaggactac  
1380

ccccgaacct gcaggatgtg ttttatggc acaggcctca tcgcgggcca cggcttcacc  
1440

agccctgaac gcacccccgg ggtcttcac cttctcgatg aggaccgctt cgggttcgtc  
1500

tggctggagc tgaaatcctt cagcctgtac agccgggtcc aggccacctt ccggaacgca  
1560

gatgcgccgt cccacaggc cttcgatgag atgctcaaga acattcagtc cctcacctcc  
1620

tgaccggcca catccttgcc gccacatccc ggggtggctct ggggctctga actctgacct  
1680

gtgaatagaa gcagcatgca ctttggaat cgggcctttt gaccagaacg cacacctcgt  
1740

cggggggccc agtccagcca cccccagca ctttatgtag agagtgtgac atagacctgc  
1800

atatttgtca gtgccatgat ggaagaagct gagcatgtct taccaaaaaac agagagaacg  
1860

agcctgaata cagcagatgt aggggacagc cgtgggaccg cgtgagaatt gaagcgggtg  
1920

ggttccccga ccctgggctg gctgggtggtt ttctcgggaa gcaggacct cctgactggt  
1980

gctcttctcg tgagcggata gagtgataga ctgggtcgtg tgtgagacgc atgtgctcca  
2040

ccccactcct tttgggggaa gccaggcaac agtggcctct gggaggggggt caggaagagg

2100

cgaacagctc aggcagcgca ggtgtgatgg gcacagtacg cagagcaagc tcgggaagtt

2160

ggtaggatct caggcttggg gccgggactc tggagtgaat ccccatctct ctaccggctt

2220

gcttggagtt tggacagaag catttcacct ctgattctcag cttccccacc tgtggagtgg

2280

gttttagtgac ctgagtcact agggaatgtc acctgaatgc acagcccagc ccatgcacct

2340

gccccagccc ctccagcttt ggagccaagg ccatcgcttc agccacttga ctgtcctcga

2400

cggcctgttc cagacagggc gtttgttttg tccatgcctt cctccctgca cgcacacggc

2460

gtcaaaacca agctgccggc cactgtctcc agaacgcaag gctccaggcc cgtgtgtctg

2520

aagcagtgag tggccacac aggtgccagg agtgeccata tgagatgacg aggaaacccc

2580

tttgacagtg aggggacagc tttctagaaa agccacacct gcattctgggg acacactttg

2640

gaaagtggga cctccagcc tggagacccc atggactgat gcctccactg ctgtgtgccc

2700

catgttgtgt taacacctgc gtgtggggac cccattctgag gtcttggtg aggttggcat

2760

ctctgaaga acagagagca cgggtgtccag agctggccct tccccagcc cacagccagc

2820

tccgtgcccg agtgggcgtc cccagcgagc ctccctctc tgccgcttgt ccttgtgtct

2880

gggctgctcc aagtccttgt gctgggcacc ctggacacgt cctgctggtg agggacctcg

2940

ggaagggtgac agtctgtgtg ccttggtgtg gagaccaacc tgaggatgtc ctgggaaatg

3000

ttttcctgat gaattttctc ttgactggcc tttaaagaac ataagaattc ccattgcca

3060

gcctcagtgc atttgcaaaa tgcttacttt gtttcccaga gtcagagaat tggcaaagg

3120

tcctaaatgg taatctggcc ggcttgggag aaagactcac gagaaaagcc agtggagaaa

3180

gcgcccttcc agggcggcag cagcgggagc cacgcagacc ccgaggcgca cctgctggct

3240

cttgtgtgtg gccccagttt cttagcggtt ttgcagcatt agcctacaag ctttgtcact

3300

ccctgccctc tgtggtggtc actgtttttc tctcttgcca aatgaggcag tctctgagt

3360

acggtgactg tggccttgaa gcctggagga ctgttgggca tgtagactgg caccttgaag

3420

attcaccatt gtttaaataa aatcaagcaa atgctttttt accaagagcc cgagcctcgc

3480

tctaagggac gcagtcctag aggcgtgcc tttggggctt gaagagcaca ctgtgggacg

3540

cacgtgcttc tgattaaagg aatctcagat ctcaattacg cttccagtgt ttgggtatag

3600

aaatagcttc caccatcat gtctcagcca tgggctgttg gtcagttcat gtggctcctg

3660

gttctgggtg gtatgttggg ggcggggggc tctccatggt ggtgacctgc agtgatgcca

3720



ggcagggcca gagccacaca gccaggaaag ggaggccttt ttggccgcac agccagtccc .

3780

ttcagtcgtg actacaggtc ttgttttttc cgctccgatg tgccttagc cagttcttgg

3840

ctccggttct gtagggacag gcactgaatc tgcgcgcctc aaaacagcag cttcccttcc

3900

gggggagggc atccaccctc tcaggggatc ctgcagggtg cccatttctc gcaggtgaga

3960

actcggaagg gctgatgtcg tcatcagagg cctaagggca gctgagagtt ggataaaacc

4020

gtttccaagg aggaggtga gtaaccagc tcaggacagc caagcgcatt aggcttgatt

4080

ggggaaggtg gcagggtggag ttgggaggtt gggactctcc atcttttgca ccacggatgc

4140

ctttctgtcg ctgtctcact ctggggcagg atcaagtctg ctctctggag tggggctgcc

4200

tgcagtgcag ctctgcacac ctgaacgtgt tctttgtcac ttgtttggaa atgatgtgat

4260

tgaagatttc agagaggtca ttggaggctt ttctgtgccg gcactgaatg ttcatttgca

4320

tgaggaagtt gcaaacgact tctgcaggct gagattcaag gcaggtggtg ttggggctcc

4380

tcagcccacc tgggccgtga cctcaagtgt ccaactgctga gtgtgagtgg ctttgcaggc

4440

ctggtggtgg gagagcctca ggctccctcc ttcttcgttc ctgaccatgc cctgggcccc

4500

ttcagtcctgc ctgcggctct gtggcatccc tgcctgaca ctgggcacct gtgcccctag

4560

caagcccacc tggcacacga ggagggaggg gtgggtggcc atgtccttcc tctagccaca  
4620

tgccttgcctg gccgcctccat tctgagcttt gtgcagaacc gggctctgagc tggagatttt  
4680

tctctgagaa cctgcagttg tgctgcagcc gcacgcaagg gcccttcagc cgctggctct  
4740

ggcttccttg actcctcagg gcgtgttcac cccaggett tctcacctgc acacggttag  
4800

gccattttca gtgctcgtgg gcagtcacgg acagcagcag aaactcctca gcccctttgt  
4860

tacttcagaa cgctgccca catgcatctt ctgagctcgt gttgtcctca tggccgtggg  
4920

gtcttgggtg cgaacaggag atgctgagct gtggctcacc gtccaagggtg ctgcagaaag  
4980

cagctaggct cttttaggat gtttctattc tggttgctgc cttcgtgggtg taacttttaa  
5040

gaacacttac gggaatgtgc tcatagaacc atcacctgtc ctgagaataa aactcctgga  
5100

atcatgatca agtccagtgt taacgtggcc caacctgtct gtactttctgg ggagagacca  
5160

ggaacatcac tggactcctc atccccgtaa ttatttagag aagatgcaag cagcagatag  
5220

tctccatgcg gctgggtactt tttttgttgt tttttgagac agggctcttg cctgtcacct  
5280

gggctggagt gcagagcggc gatcatggct cctgaggcc tcaacctact aggtcaagc  
5340

tgtctgcccg ccttagcctc ccaagtagct gggaccacag gcacccacca ccacatgct

5400

tggctaactt gttttttag agatggagtt ttgccatggt gctcagggtg gtctcgaact

5460

ccgatctca ggtgatccac ccgctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgag

5520

ccctgcgcc ccagccttgg ggctgtctt tgaatgggaa tgagactgtg caaacctgg

5580

actacctgt gtcaccaca gtcagtggc ctgcctgccg gccctcaggg gctgctgacc

5640

gggagaccag ccagagcacg agggggtcag ggctgtgtgg gttttggcct gattctgcat

5700

ttggttgttt ctgggggcca ttagcctgc ctgcattagg aaagcgtgt gccatctgat

5760

catgagcacc tctgcacccc ctggtaaggt gaccttgcag caggagctgt gccctgcctg

5820

ggtaggcacc cactaggttag gaccggagca atcctggcag ccgccacctg caccctgca

5880

cttgtttctc ctcacagttt caagtaaata cgtttttgaa ggt

5924

<210> 17

<211> 6011

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtggggccgt cgcgcggatg tcggcgccgc

60

cagcagcgcc gggggccggc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc

120

gaggaggagc gcacgaggc tagcgccggg gtcggggggc gcttgtgcgc gggcccctcg

180

ccgcgcgcgc cgcgcgtgctc gctgctggag ctgcgcgcgc agctgctggt ggagatcttc

240

gcgtcgtgctc cgggcacgga cctaccacgc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc

300

atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa

360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagcgtata

420

aaccctcgcg tgaagtcggg acgttttgtg aaaattctcc ctgattatga gcacatggcg

480

tacagagacg ttacacctg cctgcttcac cgatatagac acattttggg attgtggcag

540

ccagatatcg ggccatacgg aggactgctg aacgtggtgg tggacggcct gttcatcctc

600

gggtggatgt acctgcctcc ccatgacccc cacgtcgatg acctatgag attcaagcct

660

ctgttcagga tccacctgat ggagaggaag gctgccacag tggagtgcac gtacggccac

720

aaagggcccc accacggcca catccagatt gtgaagaagg atgagttctc caccaagtgc

780

aaccagacgg accaccacag gatgtccggc gggaggcagg aggagtttcg gacgtggctg

840

agggaggaat gggggcgcac gctggaggac atcttccacg agcacatgca ggagctcctc

900

ctgatgaagt tcctctacac cagtcagtac gacaactgcc tgacctaccg ccgcatctac

960

ctgcgcgcca gccgccccga cgacctcctc aagcctggcc tcttcaaagg tacctatggc

1020

agccacggcc tggagattgt gatgctcagc ttccacggcc ggcgtgccag gggcaccaag

1080

atcacgggcg accccaadat ccccgctggg cagcagacag tggagatcga cctgaggcat

1140

cggatccage tgcccgacct cgagaaccag cgcaacttca atgagctctc ccgcatcgtc

1200

ctggaggtgc gcgagagggc gcgccaggag cagcaggaag gcgggcacga ggcgggcgag

1260

ggtcgtggcc ggcagggccc ccgggagtcc cagccaagcc ctgcccagcc cagggcagag

1320

gcgcccagca agggcccaga tgggacacct ggtgaggatg gtggcgagcc tggggatgcc

1380

gtagctgcgg ccgagcagcc tgcccagtgt gggcaggggc agccgttcgt gctgcccgtg

1440

ggcgtgagct ccaggaatga ggactacccc cgaacctgca ggatgtgttt ttatggcaca

1500

ggcctcatcg cgggccacgg cttcaccagc cctgaacgca cccccggggt cttcatcctc

1560

ttcgatgagg accgcttcgg gttcgtctgg ctggagctga aatccttcag cctgtacagc

1620

cgggtccagg ccaccttcgg gaacgcagat gcgccgtccc cacaggcctt cgatgagatg

1680

ctcaagaaca ttcagtcctt cactcctga ccggccacat ccttgccgcc acatcccggg

1740

tggctctggg gctctgaact ctgacctgtg aatagaagca gcatgcactt tggaaatccg

1800

gccttttgac cagaacgcac acctcgtcgg ggggcccagt ccagccaccc ccagacactt  
1860

tatgtagaga gtgtgacata gacctgcata tttgtcagt ccatgatgga agaagctgag  
1920

catgtcttac caaaaacaga gagaacgagc ctgaatacag cagatgtagg ggacagccgt  
1980

gggaccgcgt gagaattgaa gcggtggggg tcccgccacc tgggctggct ggtggttttc  
2040

tcgggaagca ggacctcct gactgggtgt cttcctgtga gcggatagag tgatagactg  
2100

ggtcgtgtgt gagacgcctg tgctccacc cactcctttt gggggaagcc aggcaacagt  
2160

ggcctctggg aggggggtcag gaagaggcga acagctcagg cagcgcaggt gtgatgggca  
2220

cagtacgcag agcaagctcg ggaagtgggt aggatctcag gcttggggcc gggactctgg  
2280

agtgaatccc catttctcta ccggcttgct tggagtttgg acagaagcat ttcacctctg  
2340

atctcagctt cccacacctg ggagtgggtt tagtgacctg agtcactagg gaatgtcacc  
2400

tgaatgcaca gccagccca tgcacctgcc ccagcccctc cagctttgga gccaaaggcca  
2460

tcgttccagc cacttgactg tcctcgacgg cctgttccag acagggcggt tgttttgtcc  
2520

atgccttcct ccctgcacgc acacggcgtc aaaaccaagc tgccggccac tgtctccaga  
2580

acgcaaggct ccaggcccgt gtgtctgaag cagtgagtgg tccacacagg tgccaggagt  
2640

gcccatatga gatgacgagg aaaccccttt gcaggtagagg ggacagcttt ctagaaaagc  
 2700  
 cacacctgca tctggggaca cactttggaa ,agtgggaccc tccagcctgg agaccccatg  
 2760  
 gactgatgcc tccactgctg tgtgccccat gttgtgttaa cacctgcgtg tggggacccc  
 2820  
 atctgaggtc ttggctgagg ttggcatctc ctgaagaaca gagagcacgg tgtccagagc  
 2880  
 tggcccttcc cccagcccac agccagctcc gtgcccagat gggcgcccc agcgagcctt  
 2940  
 cctctctgc cgcttgctct tgtgtctggg ctgctccaag tcttgtgtg gggcacccctg  
 3000  
 gacacgtcct gctggtgagg gacctcggga aggtgacagt ctgtgtgcct tgggtgtggag  
 3060  
 accaacctga ggatgtcctg ggaaatgttt tctgatgaa tttctccttg actggccttt  
 3120  
 aaagaacata agaattccca ttgcccagcc tcagtgcatt tggcaaatgc ttactttgct  
 3180  
 tcccagagtc agagaattgg caaaggttcc taaatggtaa tctggccggc ctgggagaaa  
 3240  
 gactcacgag aaaagccagt ggagaaagcg cccttccagg gcggcagcag cgggagccac  
 3300  
 gcagaccccg aggcgcacct gctggctctt gtgtgtggcc ccagtttcta gcggcttttg  
 3360  
 cagcattagc ctacaagctt tgtcactccc tgccctctgt ggtggtcact gtttttctct  
 3420  
 cttgccaaat gaggcagtct ctgagtgacg gtgactgtgg ccttgaagcc tggaggactg

3480

ttgggcatgt agactggcac cttgaagatt caccattggt taaataaaat caagcaaagt

3540

cttttttacc aagagcccga gctcgcctct aaggagcga gtcctagagg cgtgcctttt

3600

ggggcttgaa gagcacactg tgggacgcac gtgcttctga ttaaaggaat ctcagatctc

3660

aattacgctt ccagtgtttg ggtatagaaa tagcttcac ccatcatgtc tcagccatgg

3720

gctgttggtc agttcatgtg gctcctggtt ctgggtgtga tgttgggggc gggggtctct

3780

ccatggtggt gacctgcagt gatgccaggc agggccagag ccacacagcc aggaaaggga

3840

ggcctttttg gccgcacagc cagtcccttc agtcgtgact acaggctctg tttttccgc

3900

tccgatgtgt ccttagccag ttcttggtc cggttctgta gggacaggca ctgaatctgc

3960

gcgctcaaa acagcagctt cccttcggg ggagggcacc caccctctca ggggatcctg

4020

caggtggccc atttcctgca ggtgagaact cggaagggt gatgtcgtca tcagaggcct

4080

aagggcagct gagagttgga taaaaccgtt tccaaggagg aggctgagta acccagttca

4140

ggacagccaa gcgcattagg cttgattggg gaagggtgga ggtggagttg ggaggttggg

4200

actctccatc ttttgcacca cggatgcctt tctgtcgtg tctcactctg gggcaggatc

4260

aagtctgctc tctggagtgg ggctgcctgc agtgcagctc tgcacacctg aacgtgttct



4320

ttgtcacttg tttggaaatg atgtgattga agatttcaga gaggtcattg gaggcctttc

4380

tgtgccggca ctgaatgttc atttgcata ggaagttgca aacgacttct gcaggctgag

4440

attcaaggca ggtggtattg gggtcctca gccacctgg gccgtgacct caagtgtcca

4500

ctgctgagtg tgagtggctt tgcaggcctg gtggtgggag agcctcagge tccctccttc

4560

ttcgttcttg accatgccct gggcccttc agtctgctg cggctctgtg gcacccctgc

4620

cctgacactg ggcacctgtg cccctagcaa gccacctgg cacacgagga gggagggggtg

4680

ggtggccatg tccctcctct agccacatgc cctgctggcc gctccattct gagctttgtg

4740

cagaaccggg tctgagctgg agatttttct ctgagaacct gcagttgtgc tgcagccgca

4800

cgcaagggcc cttcagccgc tggctctggc tccctgact cctcagggcg tgttcacccc

4860

caggctttct cacctgcaca cggtaggccc attttcagtg ctgctgggca gtcacggaca

4920

gcagcagaaa ctctcagcc cctttgttac ttcagaacgc ctgccacat gcattctctg

4980

agctcgtgtt gtcctcatgg ccgtggggtc ttgggtgcga acaggagatg ctgagctgtg

5040

gtccaccgtc caaggtgctg cagaaagcag ctaggctctt ttaggatgtt tctattctgg

5100

ttgctgcctt cgtgggtgtaa cttttaagaa cacttacggg aatgtgctca tagaaccatc  
5160  
acctgtcctg agaataaaac tccctggaatc atgatcaagt ccagtgttaa cgtggcccaa  
5220  
cctgtctgta cttctgggga gagaccagga acatcactgg actcctcacc cccgtaatta  
5280  
tttagagaag atgcaagcag cagatagtct ccattgggct ggtacttttt ttgttgtttt  
5340  
ttgagacagg gtcttctctt gtcacctggg ctggagtgtc gagcggcgat catggctccc  
5400  
tgaggcctca acctactagg ctcaagctgt ctgccgcct tagcctccca agtagctggg  
5460  
accacaggca cccaccacca ccatgtcttg ctaacttggt ttgttagaga tggagttttg  
5520  
ccatgttgct caggttggtc tcgaactccc gatctcaggt gatccaccg cctcggcctc  
5580  
ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagccc ctgcgcccga gccttggggc ctgtctttga  
5640  
atgggaatga gactgtgcaa accgtggact accctgtgtc accacagct cagtggcctg  
5700  
cctgccggcc ctgaggggct gctgaccggg agaccagcca gagcacgagg gggtcagggc  
5760  
tgtgtgggtt ttggcctgat tctgcatttg gttgtttctg ggggccatgt agcctgcctg  
5820  
cattaggaaa gcgtgtgtcc atctgatcat gagcacctct gcacccctg gtaaggtgac  
5880  
cttgacgag gagctgtgtc ctgcctgggt aggcacccac taggtaggac cggagcaatc  
5940  
ctggcagcgg ccacctgcac ccgtgcactt gtttctcttc acagtttcaa gtaaattcgt  
6000  
ttttgaaggc t

6011

<210> 18

<211> 7521

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

5

## ES 2 433 012 T3

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccgt cgcgcggatg tcggcgccgc  
60  
cagcagcgcc ggggcccggc cgagacggcg gcggccgaca gcgagccgga cacagacccc  
120  
gaggaggagc gcatcgaggc tagcgccggg gtcgggggcg gcttgtgcgc gggccctcg  
180  
ccgcgcgcc cgcgtgctc gctgctggag ctgccgccg agctgctggt ggagatcttc  
240  
gcgtcgtgc cgggcacgga cctaccagc ttggcccagg tctgcacgaa gtccggcgc  
300  
atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa  
360  
aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagctgctt  
420  
caccgatata gacacatttt gggattgtgg cagccagata tcgggccata cggaggactg  
480  
ctgaacgtgg tggaggacgg cctgttcac atcgggtgga tgtacctgcc tccccatgac  
540  
ccccacgtcg atgacctat gagattcaag cctctgttca ggatccacct gatggagagg  
600

## ES 2 433 012 T3

aaggctgcca cagtggagtg catgtacggc cacaaagggc cccaccacgg ccacatccag  
660

attgtgaaga aggatgagtt ctccaccaag tgcaaccaga cggaccacca caggatgtcc  
720

ggcgggagggc aggaggagtt tcggacgtgg ctgagggagg aatggggggc cacgctggag  
780

gacatcttcc acgagcacat gcaggagctc atcctgatga agttcatcta caccagtcag  
840

tacgacaact gcctgaccta ccgccgcac tacctgccgc ccagccgccc cgacgacctc  
900

atcaagcctg gcctcttcaa aggtacctat ggcagccacg gcctggagat tgtgatgctc  
960

agcttccacg gccggcgtgc caggggcacc aagatcacgg gcgaccccaa catccccgt  
1020

gggcagcaga cagtggagat cgacctgagg catcggtacc agctgcccga cctcgagaac  
1080

cagcgcaact tcaatgagct ctcccgcatc gtcctggagg tgcgcgagag ggtgcgccag  
1140

gagcagcagg aaggcgggca cgaggcgggc gagggtcgtg gccggcaggg cccccgggag  
1200

tcccagccaa gccctgccc a gccagggca gaggcgccc gcaagggccc agatgggaca  
1260

cctggtgagg atggtggcga gcctggggat gccgtagctg cggccgagca gcctgcccag  
1320

tgtgggcagg ggcagccgtt cgtgctgccc gtgggcgtga gctccaggaa tgaggactac  
1380

ccccgaacct gcaggatgtg tttttatggc acaggcctca tcgcggggca cggcttcacc

1440

agccctgaac gcacccccgg ggtcttcac ccttcgatg aggaccgctt cgggttcgtc

1500

tggttgagc tgaaatcctt cagcctgtac agccgggtcc aggccacett ccggaacgca

1560

gatgcgcgt cccacaggc cttcgatgag atgctcaaga acattcagtc cctcacctcc

1620

tgaccggcca catccttgcc gccacatccc ggggtggctct ggggctctga actctgaact

1680

gtgaatagaa gcagcatgca ctttggaat ccggcctttt gaccagaacg cacacctcgt

1740

cgggggggccc agtcacagcca cccccagca ctttatgtag agagtgtgac atagacctgc

1800

atatttgtca gtgccatgat ggaagaagct gagcatgtct taccaaaaac agagagaacg

1860

agcctgaata cagcagatgt aggggacagc cgtgggaccg cgtgagaatt gaagcggtag

1920

ggttcccgca cctgggctg gctgggtggt ttctcgggaa gcaggacct cctgactggt

1980

gctcttcctg tgagcggata gagtgataga ctgggtcgtg tgtgagacgc atgtgctcca

2040

cccactcct tttgggggaa gccaggcaac agtggcctct gggagggggt caggaagagg

2100

cgaacagctc aggcagcgca ggtgtgatgg gcacagtacg cagagcaagc tcgggaagtt

2160

ggtaggatct caggcttggg gccgggactc tggagtgaat cccatttct ctaccggctt

2220

gcttgaggtt tggacagaag catttcacct ctgatctcag ctccccacc tgtggagtgg

2280

gttttagtgac ctgagtcact agggaaatgtc acctgaatgc acagcccagc ccatgcacct

2340

gccccagccc ctccagcttt ggagccaagg ccatcggttc agccacttga ctgtcctcga

2400

cgccctgttc cagacagggc gtttgttttg tccatgcctt cctccctgca cgcacacggc

2460

gtcaaaacca agctgccggc cactgtctcc agaacgcaag gctccaggcc cgtgtgtctg

2520

aagcagtgag tgggtccacac aggtgccagg agtgcccata tgagatgacg aggaaacccc

2580

tttgacagtg aggggacagc tttctagaaa agccacacct gcatctgggg acacactttg

2640

gaaagtggga cctccagcc tggagacccc atggactgat gctccactg ctgtgtgcc

2700

catgttgtgt taacacctgc gtgtggggac cccatctgag gtcttggtg aggttggcat

2760

ctcctgaaga acagagagca cgggtgtccag agctggccct tccccagcc cacagccagc

2820

tccgtgcccg agtgggcgtc cccagcgagc ctccctctc tgccgcttgt ccttgtgtct

2880

gggctgctcc aagtccctgt gctgggcacc ctggacacgt cctgctgggt agggacctcg

2940

ggaaggtgac agtctgtgtg ccttgggtgt gagaccaacc tgaggatgtc ctgggaaatg

3000

ttttcttgat gaatttctcc ttgactggcc tttaaagaac ataagaattc ccattgcca

3060

gcctcagtgc atttggcaaa tgcttacttt gcttcccaga gtcagagaat tggcaaaggt  
3120

tcctaaatgg taatctggcc ggcctgggag aaagactcac gagaaaagcc agtggagaaa  
3180

gcgcccttcc agggcggcag cagcgggagc cacgcagacc ccgaggcgca cctgctggct  
3240

cttgtgtgtg gccccagttt ctageggctt ttgcagcatt agcctacaag ctttgtcact  
3300

cctgccttc tgtggtggtc actgtttttc tctcttgcca aatgaggcag tctctgagtg  
3360

acggtgactg tggccttgaa gcctggagga ctgttgggca tgtagactgg caccttgaag  
3420

attcaccatt gtttaaataa aatcaagcaa atgctttttt accaagagcc cgagcctcgc  
3480

tctaagggaac gcagtcctag aggcgtgccc tttggggctt gaagagcaca ctgtgggacg  
3540

cacgtgcttc tgattaaagg aatctcagat ctcaattacg cttccagtgt ttgggtatag  
3600

aatagcttc caccatcat gtctcagcca tgggctgttg gtcagttcat gtggctcctg  
3660

gttctgggtg gtatgttggg ggcggggggtc tctccatggt ggtgacctgc agtgatgcca  
3720

ggcagggcca gagccacaca gccaggaaag ggaggccttt ttggccgcac agccagtccc  
3780

ttcagtcgtg actacaggtc ttgttttttc cgctccgatg tgtccttagc cagttcttgg  
3840

ctccggttct gtagggacag gcactgaate tgcgcgcctc aaaacagcag ctcccttcc  
3900

gggggagggc atccaccctc tcaggggatc ctgcagggtg cccatttcct gcaggtgaga  
3960

actcggaagg gctgatgtcg tcatcagagg cctaagggca gctgagagtt ggataaaacc  
4020

gtttccaagg aggaggctga gtaaccocagt tcaggacagc caagcgcatt aggettgatt  
4080

ggggaagggtg gcagggtggag ttgggaggtt gggactctcc atcttttgca ccacggatgc  
4140

ctttctgtcg ctgtctcact ctggggcagg atcaagtctg ctctctggag tggggctgcc  
4200

tgcagtgcag ctctgcacac ctgaacgtgt tctttgtcac ttgtttggaa atgatgtgat  
4260

tgaagatttc agagaggtca ttggaggctt ttctgtgccg gcactgaatg ttcatttgca  
4320

tgaggaagtt gcaaacgact tctgcaggct gagattcaag gcaggtggtta ttggggctcc  
4380

tcagcccacc tgggccgtga cctcaagtgt ccactgctga gtgtgagtgg ctttgcaggc  
4440

ctggtggtgg gagagcctca ggctccctcc ttcttcgttc ctgaccatgc cctgggcccc  
4500

ttcagtctgc ctgcccgtct gtggcatccc tgccctgaca ctgggcacct gtgcccctag  
4560

caagcccacc tggcacacga ggagggaggg gtgggtggcc atgtccttcc tctagccaca  
4620

tgccttgctg gccgtccat tctgagcttt gtgcagaacc gggcttgagc tggagatttt  
4680

tctctgagaa cctgcagttg tgctgcagcc gcacgcaagg gcccttcagc cgctggctct



4740

ggcttccttg actcctcagg gcgtgttcac cccagggctt tctcacctgc acacgggttag

4800

gccattttca gtgctcgtgg gcagtcacgg acagcagcag aaactcctca gcccctttgt

4860

tacttcagaa cgctgcca catgcattct ctgagctcgt gttgtcctca tggccgtggg

4920

gtcttggttg cgaacaggag atgctgagct gtgggtccacc gtccaagggtg ctgcagaaag

4980

cagctaggct cttttaggat gtttctatct tgggtgctgc cttcgtgggtg taacttttaa

5040

gaacacttac gggaatgtgc tcatagaacc atcacctgtc ctgagaataa aactcctgga

5100

atcatgatca agtccagtgt taacgtggcc caacctgtct gtacttctgg ggagagacca

5160

ggaacatcac tggactcctc atccccgtaa ttatttagag aagatgcaag cagcagatag

5220

tctccatgog gctgggtactt tttttgttgt tttttgagac agggctctgc tctgtcacct

5280

gggctggagt gcagagcggc gatcatggct cctgaggcc tcaacctact aggetcaagc

5340

tgtctgcccg ccttagcctc ccaagtagct gggaccacag gcaccacca ccacatgct

5400

tggctaactt gttttttag agatggagtt ttgccatgtt gctcaggttg gtctcgaact

5460

cccgatctca ggtgatccac ccgctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgag

5520

ccctgcgcc ccagccttgg ggctgtctt tgaatgggaa tgagactgtg caaacctgg

5580

actaccctgt gtcacccaca gctcagtggc ctgcctgcgc gccctcaggg gctgctgacc

5640

gggagaccag ccagagcaag aggggggtcag ggctgtgtgg gttttggcct gattctgcat

5700

ttggttgttt ctggggggcca tgtagcctgc ctgcattagg aaagcgctgt gccatctgat

5760

catgagcacc tctgcacccc ctggtaaggt gaacctgcag caggagctgt gccctgcctg

5820

ggtaggcacc cactaggttag gaccggagca atcctggcag ccgccacctg caccctgca

5880

cttgtttctc ctcacagttt caagtaaata cgtttttgaa ggcttgttgt gtgttttgtg

5940

atttctttgg gaatatgagt tggacggagg cgagagcctt aagccatgcg agctgtcggc

6000

ctgggaaccc agacttccca gcttcttgag gaagtgtcag atttcccgcg ttgacagaag

6060

ggagcattga agggatgcct tggagcccag acagtgggtg tccctgtgtc cttccctttg

6120

acctggcata agaggtgtct cgagtccta ccagggacc cagaggagtt cgggccccag

6180

tagattttct tagatttaag ccaaagttag ttgcattatc tgcaacgagg acagatatgg

6240

gagggaatgt gctgagagcc aggcagatga actgaggatc tcattgatct ttcttttgtg

6300

tttactaaac tcatatgttc ttgtaaacag ttcttttagca tagacagtga aagtaccccc

6360

tgtttctcatc ccagcctccc cgtgagtcac tgetgetaat taatgetggt agcttggaa  
6420

tgtagaaaca ggatgttttc catggtaatg cactcaaagt acaccctcga ttggcagaaa  
6480

ttggcaagtg tgattttcca agtggtggca gtgatgcagg ggaacaggaa cgcaggtggg  
6540

gcagctgttt tggggacagc tgggtactagc tcatggcact aaggacacgg gccaggggac  
6600

tggcatctgc atcctgaggt gtccaccctc gggcaacgcg agagcccagg catggggccac  
6660

gcagggatgt tcattgtac actgtgacaa ctgtcacagg ccggaaggag gcaggtggac  
6720

tacggtggag ccacccatgc tgtcacctgg cagacgggca cacagccttg ttccgttgca  
6780

aaacaagtga gagatggtat tgggtgaaca tgtaaaaatg caaatactta atttttatca  
6840

attcatgtgt ggggaaaagc tgaagatacg cgtgggaatg gtgtgggtcac ttctaggggt  
6900

gtcggagggt agaacttcaa ctgttttgct ttaaaaagta aggatcgcat ggcagaacta  
6960

gcactgttcc acctgttgat cctgataccg tggattacga gacccccct cttttctgtg  
7020

tggttcagaa acaagccct cagacaggac acagtgccca ggggcagtga cctgcaggcc  
7080

caccactgc catctccgt ggtctcgggg ttgccacata gctgccagc tgcggctgct  
7140

tcctgggtgc cctccaggga gagcagggga tcgtgggtcc ccggcggtgg gtgtttcctt  
7200

ctccggggag agcaggggat cgtgggtccc cgggtggtggg tgtttccttc tctaaggttt  
7260

gctgctgttt ccaggccttt ctgtggggcc tgggtcctgt cctggggcca agccacgggg  
7320

tcatactcag ctgcactggg cgtgccaacc acaaacgagt cacttgctac aagcagcacc  
7380

atgcagcctc ctgtctggac gagacctgc cccccacaga ctggagacgc accccgattt  
7440

cccaggtcac aggggggaagt gtggatctga taagggacta aatgtggcgt ctttcatatg  
7500

tttctcttac atattttatt t

7521

<210> 19

<211> 7608

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

ggcatggcgg tgtgtgctcg cctttgcggc gtgggcccgt cgcgcggatg tcggcgccgc  
60

cagcagcgcc gggggcccggc cgagacggcg ggggccgaca gcgagccgga cacagacccc  
120

gaggaggagc gcatcgaggc tagcgccggg gtcggggggcg gcttgtgcgc gggcccctcg  
180

ccgcgcggcc cgcgctgctc gctgctggag ctgccggccg agctgctggt ggagatcttc  
240

gcgtcgctgc cgggcacgga cctaccacgc ttggcccagg tctgcacgaa gttccggcgc  
300

atcctccaca ccgacaccat ctggaggagg cgttgccgtg aggagtatgg tgtttgcgaa  
360

aacttgcgga agctggagat cacaggcgtg tcttgtcggg acgtctatgc gaagcgtata  
420

aaccctcgcg tgaagtcggg acgttttgtg aaaattctcc ctgattatga gcacatggcg  
480

tacagagacg tttacacctg cctgcttcac cgatatagac acattttggg attgtggcag  
540

ccagatatcg ggccatacgg aggactgctg aacgtggtgg tggacggcct gttcatcatc  
600

gggtggatgt acctgectcc ccatgacccc cacgtcgatg acctatgag attcaagcct  
660

ctgttcagga tccacctgat ggagaggaag gctgccacag tggagtgcac gtacggccac  
720

aaagggcccc accacggcca catccagatt gtgaagaagg atgagttctc caccaagtgc  
780

aaccagacgg accaccacag gatgtccggc gggaggcagg aggagtctcg gacgtggctg  
840

agggaggaat gggggcgcac gctggaggac atcttcacg agcacatgca ggagctcatc  
900

ctgatgaagt tcatctacac cagtcagtac gacaactgcc tgacctaccg ccgcatctac  
960

ctgccgcccc gccgccccga cgacctcatc aagcctggcc tcttcaaagg tacctatggc  
1020

agccacggcc tggagattgt gatgctcagc ttccacggcc ggcgtgccag gggcaccaag  
1080

atcacgggcg accccaacat ccccgctggg cagcagacag tggagatcga cctgaggcat  
1140

cggatccage tgcccgaacct cgagaaccag cgcaacttca atgagctctc ccgcatcgtc

1200

ctggaggtgc gcgagaggggt ggcgaggag cagcaggaag gcgggcacga ggcgggcgag

1260

ggtegtggcc ggcagggccc ccgggagtcc cagccaagcc ctgcccagcc cagggcagag

1320

gcgcccagca agggcccaga tgggacacct ggtgaggatg gtggcgagcc tggggatgcc

1380

gtagctgcgg ccgagcagcc tgcccagtgt gggcaggggc agccgttcgt gctgcccgtg

1440

ggcgtgagct ccaggaatga ggactacccc cgaacctgca ggatgtgttt ttatggcaca

1500

ggcctcatcg cggggccacgg cttcaccagc cctgaacgca cccccgggt cttcatcctc

1560

ttcgatgagg accgcttcgg gttcgtctgg ctggagctga aatccttcag cctgtacagc

1620

cgggtccagg ccaccttcgg gaacgcagat gcgccgtccc cacaggcctt cgatgagatg

1680

ctcaagaaca ttcagtcctt cactcctga ccggccacat ccttgccgcc acatcccggg

1740

tggctctggg gctctgaact ctgacctgtg aatagaagca gcatgcactt tggaaatccg

1800

gccttttgac cagaacgcac acctcgtcgg ggggcccagt ccagccaccc ccagcactt

1860

tatgtagaga gtgtgacata gacctgcata tttgtcagtg ccatgatgga agaagctgag

1920

catgtcttac caaaaacaga gagaacgagc ctgaatacag cagatgtagg ggacagccgt

1980

gggaccgcgt gagaattgaa gcggtgggggt tcccgcaccc tgggctggct ggtggttttc

2040

tcggaagca ggacctcct gactggtgct ctctctgtga gggatagag tgatagactg

2100

ggtcgtgtgt gagaagcatg tgctccacc cactcctttt gggggaagcc aggcaacagt

2160

ggcctctggg aggggggtcag gaagaggcga acagctcagg cagcgcaggt gtgatgggca

2220

cagtacgcag agcaagctcg ggaagtgtgt aggatctcag gcttggggcc gggactctgg

2280

agtgaatccc catttctcta ccggcttgct tggagtttgg acagaagcat ttcacctctg

2340

atctcagctt cccacctgt ggagtgggtt tagtgacctg agtcactagg gaatgtcacc

2400

tgaatgcaca gccagccca tgcacctgcc ccagccctc cagctttgga gccaggcca

2460

tgtttccagc cacttgactg tcttcgacgg cctgttccag acagggcggt tgttttgtcc

2520

atgccttctt cctgcacgc acacggcgtc aaaaccaagc tgccggccac tgtctccaga

2580

acgcaaggct ccaggcccggt gtgtctgaag cagtgagtgg tccacacagg tgccaggagt

2640

gcccatatga gatgacgagg aaacctctt gcaggtgagg ggacagcttt ctagaaaagc

2700

cacacctgca tctggggaca cactttggaa agtgggaccc tccagcctgg agaccccatg

2760

gactgatgcc tccactgctg tgtgccccat gttgtgttaa cactgcgtg tggggacccc

2820

atctgaggtc ttggetgagg ttggcatctc ctgaagaaca gagagcacgg tgtccagagc  
2880

tggcccttcc cccagccccc agccagctcc gtgcccagat gggcgcccc agcgagcctt  
2940

ccctctctgc cgtttgtcct tgtgtctggg ctgctccaag tccttgtgct gggcacccctg  
3000

gacacgtcct gctggtgagg gacctcgga aggtgacagt ctgtgtgcct tgggtgtggag  
3060

accaacctga ggatgtcctg ggaaatgttt tcctgatgaa tttctccttg actggccttt  
3120

aaagaacata agaattccca ttgcccagcc tcagtgcatt tggcaaagtc ttactttgct  
3180

tcccagagtc agagaattgg caaaggctcc taaatggtaa tctggccggc ctgggagaaa  
3240

gactcacgag aaaagccagt ggagaaaagcg cccttccagg gcggcagcag cgggagccac  
3300

gcagaccccg aggcgcacct gctggctctt gtgtgtggcc ccagtttcta gcggcttttg  
3360

cagcattagc ctacaagctt tgtcactccc tgccctctgt ggtggtcact gtttttctct  
3420

cttgccaaat gaggcagtct ctgagtgcg gtgactgtgg ccttgaagcc tggaggactg  
3480

ttgggcatgt agactggcac cttgaagatt caccattgtt taaataaaat caagcaaag  
3540

cttttttacc aagagcccga gcctcgctct aagggacgca gtccatagagg cgtgcccttt  
3600

ggggcttgaa gagcacactg tgggacgcac gtgcttctga ttaaaggaat ctcagatctc  
3660



aattacgctt ccagtgtttg ggtatagaaa tagcttccac ccatcatgtc tcagccatgg  
3720

gctgttggtc agttcatgtg gctcctgggt ctggtgtgta tgttgggggc gggggtctct  
3780

ccatggtggt gacctgcagt gatgccaggc agggccagag ccacacagcc aggaaaggga  
3840

ggcctttttg gccgcacagc cagtcccttc agtcgtgact acaggtcttg ttttttccgc  
3900

tccgatgtgt ccttagccag ttcttggtc cggttctgta gggacaggca ctgaatctgc  
3960

gcgcctcaaa acagcagctt cccttccggg ggagggcacc caccctctca ggggatcctg  
4020

caggtggccc atttctgca ggtgagaact cggaagggt gatgtctca tcagaggcct  
4080

aagggcagct gagagttgga taaaaccgtt tccaaggagg aggtgagta acccagttca  
4140

ggacagccaa gcgcattagg cttgattggg gaaggtggca ggtggagtgt ggaggttggg  
4200

actctccacc ttttgcacca cggatgcctt tctgtcgtg tctcactctg gggcaggacc  
4260

aagtctgtc tctggagtgg ggctgcctgc agtcagctc tgcacacctg aacgtgttct  
4320

ttgtcacttg tttggaaatg atgtgattga agatttcaga gaggtcattg gaggcttttc  
4380

tgtgccggca ctgaatgttc atttgcata ggaagttgca aacgacttct gcaggctgag  
4440

attcaaggca ggtggtattg ggttccctca gccacctgg gccgtgacct caagtgtcca

4500

ctgctgagtg tgagtggctt tgcaggcctg gtgggtgggag agcctcagge tccttccttc

4560

ttcgttcctg accatgccct gggccccttc agtctgcctg cggctctgtg gcctccctgc

4620

cctgacactg ggcacctgtg cccctagcaa gccacactgg cacacgagga gggaggggtg

4680

ggtggccatg tccttcctct agccacatgc cctgctggcc gctccattct gagctttgtg

4740

cagaaccggg tctgagctgg agatTTTTTct ctgagaacct gcagttgtgc tgcagccgca

4800

cgcaagggcc cttcagccgc tggctctggc ttccctgaact cctcagggcg tgttcacccc

4860

caggctttct cacctgcaca cggttagggc attttcagtg ctctgtgggca gtcacggaca

4920

gcagcagaaa ctctcagcc cttttgttac ttcagaacgc ctgcccacat gcctcttctg

4980

agctcgtgtt gtctcatgg ccgtggggtc ttgggtgcga acaggagatg ctgagctgtg

5040

gtccaccgtc caaggtgctg cagaaagcag ctaggctctt ttaggatgtt tctattctgg

5100

ttgctgcctt cgtgggtgtg cttttaagaa cacttacggg aatgtgctca tagaaccatc

5160

acctgtcctg agaataaaac tcctggaatc atgatcaagt ccagtgttaa cgtggcccaa

5220

cctgtctgta cttctgggga gagaccagga acatcactgg actcctcatc cccgtaatta

5280

tttagagaag atgcaagcag cagatagtct ccatgccggc ggtacttttt ttgttgtttt

5340

ttgagacagg gtcttgctct gtcacctggg ctggagtga gagcgcgat catggctccc

5400

tgaggcctca acctactagg ctcaagctgt ctgcccgct tagcctccca agtagctggg

5460

accacaggca cccaccacca ccatgcttgg ctaacttggt tttgtagaga tggagttttg

5520

ccatgttgct caggttggtc tcgaactccc gatctcaggt gatccaccgg cctcggcctc

5580

ccaaagtgt gggattacag gcgtgagccc ctgcgcccc gccttggggc ctgtctttga

5640

atgggaatga gactgtgcaa accgtggact accctgtgtc acccacagct cagtggcctg

5700

cctgccggcc ctccaggggt gctgaccggg agaccagcca gagcacgagg gggtcagggc

5760

tgtgtgggtt ttggcctgat tctgcatttg gttgtttctg ggggccatgt agcctgcctg

5820

cattaggaaa gcgtgtgcc atctgatcat gagcacctct gcacccccctg gtaaggtgac

5880

cttgacgac gagctgtgcc ctgcctgggt aggcacccac taggtaggac cggagcaatc

5940

ctggcagcgg ccacctgcac ccgtgcaatt gtttctctct acagtttcaa gtaaattcgt

6000

ttttgaaggc ttgttgtgtg ttttgtgatt tctttgggaa tatgagttgg acggaggcga

6060

gagccttaag ccatgcgagc tgcggcctg ggaaccaga cttcccagct tcttgaggaa

6120

gtgtcagatt tcccgcgttg acagaaggga gcattgaagg gatgccttgg agcccagaca  
6180

gtggttgtcc ctgtgtcctt ccctttgacc tggcatcaga ggtgtctcga gtccctaccc  
6240

agggacccag aggagttcgg gccccagtag attttcttag atttaagcca aagtgagttg  
6300

cattatctgc aacgaggaca gatatgggag ggaatgtgct gagagccagg cagatgaact  
6360

gaggatctca ttgatctttc ttttgtgttt actaaactca tatgttcttg taaacagttc  
6420

tttagcatag acagtgaaag taccacctgt tctcatccca gcctccccgt gagtcactgc  
6480

tgctaattaa tgctgttagc ttggaattgt agaaacagga tgttttccat ggtaatgcac  
6540

tcaaagtaca cctcgtattg gcagaaattg gcaagtgtga ttttccaagt gttggcagtg  
6600

atgcagggga acaggaacgc aggtggggca gctgttttgg ggacagctgg tactagctca  
6660

tggcactaag gacacggggc cagggactgg catctgcac ctaggtgtc caccctcggg  
6720

caacgcgaga gcccaggcat gggccacgca gggatgttca ttgctacact gtgacaactg  
6780

tcacagggcg gaaggaggca ggtggactac ggtggagcca cccatgctgt cacctggcag  
6840

acgggcacac agccttgttc cgttgcaaaa caagtgagag atggatttgg tgtaacatgt  
6900

aaaaatgcaa atacttaatt tttatcaatt catgtgtggg gaaaagctga agatacgcgt  
6960

gggaatggtg tggtcacttc taggggtgtc ggagggtaga acttcaactg ttttgcttta  
7020

aaaagtaagg atcgcatggc agaactagca tctgttcacc tgttgatcct gataccgtgg  
7080

attacgagac cccccctctt ttctgtgtgg ttcagaaaca agccccctcag acaggacaca  
7140

gtgccaggg gcagtgaact gcagggccac ccactgccat ctccgctggc ctccgggttg  
7200

ccacatagcc tgccagctgc ggcctgcttc tgggtgccct ccagggagag caggggatcg  
7260

tgggtccccg gcggtgggtg tttccttctc cggggagagc aggggatcgt ggggtccccg  
7320

tggtgggtgt ttccttctct aaggtttgc getgtttcca ggcctttctg tggggcctgg  
7380

gtcctgtcct ggggccaagc caccgggtca tctcagctg cactgggcgt gccaaaccaca  
7440

aacgagtcac ttgctacaag cagcaccatg cagcctcctg tctggacgag accctgcccc  
7500

ccacagactg gagacgcacc ccgatttccc aggtcacagg ggggaagtgtg gatctgataa  
7560

gggactaaat gtggcgtctt tcatatgttt ctcttacata ttttattt  
7608

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 20

gtgaagaagg atgagttctc c

21

<210> 21

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

agctgagcat cacaatctcc

20

<210> 22

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

ggagcttccc caactcataa atgcc  
 25  
 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 gcatgatgtc tgatgtgggc agtaa  
 25  
 <210> 24  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 tgccaagctg cttcacccgat  
 20  
 <210> 25  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 ggccgtacat gcactccact g  
 21  
 20 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 gagaacctgc agttgtgctg  
 25 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 27  
 atggtgctgc ttgtagcaag  
 20  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 28  
 tgcccatatg agatgacgag g  
 21  
 <210> 29  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29

acactcagca gtggacactt g

21

<210> 30  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 30  
 ggcaaagtct ggacccaaca caaa

24

<210> 31  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 31  
 ctaggcatgg gaggggaaca ggaa

24

<210> 32  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 32  
 gactgggctg cgtgctcatc c

21

<210> 33  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 33  
 aggcctgtg gtcactcata ctgc

25 24

<210> 34  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 34  
 aggggctaac aatggacacc

20

<210> 35  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens

<400> 35  
 ccgaagataa gggggaacta ct

22

<210> 36  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 36

ccggcgggag gcaggaggag t  
 21  
 <210> 37  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 37  
 gcggcggtag gtcaggcagt tgtc  
 24  
 <210> 38  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38  
 tgccaagctg cttcacccgat  
 20  
 <210> 39  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39  
 ggccgtacat gcactccact g  
 21  
 20 <210> 40  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40  
 gtgaagtcgg gacgttttgt ga  
 25 22  
 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 41  
 ccgtggtggg gccctttgtg g  
 21



## REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que se cartografía en el cromosoma humano 16q24.3 y que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3.
- 5 2. Una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3, que codifica un polipéptido capaz de formar parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en el direccionamiento de proteínas mediante ubiquitinación para una degradación en el proteasoma.
- 10 3. Una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que es al menos 95% idéntica a una molécula de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3 y que codifica un polipéptido capaz de formar parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en el direccionamiento de proteínas mediante ubiquitinación para una degradación en el proteasoma.
4. Una molécula aislada de ácido nucleico de BNO1 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Números: 1 o 3.
- 15 6. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, ligado funcionalmente a elementos de control adecuados.
7. Una célula aislada transformada con el vector de expresión según la reivindicación 6.
8. Una célula según la reivindicación 7, en la que la expresión de BNO1 recombinante se puede interrumpir.
9. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que es una célula eucariota.
- 20 10. Un método de preparación de un polipéptido codificado por cualquiera de los ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de:
  - (1) cultivar una célula tal como se define en la reivindicación 7 o 9 en condiciones eficaces para la producción del polipéptido; y
  - (2) recoger el polipéptido.
- 25 11. Un polipéptido aislado de BNO1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.
12. Un polipéptido aislado de BNO1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4, que es capaz de formar parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en la degradación de proteínas a través de la ubiquitinación.
- 30 13. Un polipéptido aislado de BNO1 capaz de formar parte de un complejo de ubiquitina-ligasa implicado en la degradación de proteínas a través de la ubiquitinación que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.
14. Un polipéptido aislado de BNO1 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Números: 2 o 4.
- 35 15. Un anticuerpo para la detección de BNO1 que es inmunológicamente reactivo con un polipéptido tal y como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, preferentemente un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo que incluye un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos de dominio único.
- 40 16. El uso de una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con una disminución de la expresión o de la actividad de BNO1.
17. El uso según la reivindicación 16, en el que la molécula de ácido nucleico es una parte de un vector de expresión que también incluye elementos de control adecuados.
- 45 18. El uso de un antagonista de BNO1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con el aumento de la expresión o la actividad de BNO1, en donde dicho antagonista es un anticuerpo según la reivindicación 15.
19. El uso de una molécula de ácido nucleico aislada que es el complemento de una molécula de ácido nucleico tal y como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, cuyo producto de transcripción es un ARNm que se hibrida con el ARNm codificado por BNO1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno

asociado con el aumento de la actividad o de la expresión de BNO1.

20. Un método para escrutar un compuesto capaz de modular la actividad de BNO1 que comprende combinar un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, y un compuesto candidato, y determinar la unión de dicho compuesto candidato con dicho péptido.
- 5 21. Un método para escrutar candidatos a fármacos que comprende las etapas de:
  - (1) proporcionar una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9;
  - (2) añadir un candidato a fármaco a dicha célula; y
  - (3) determinar el efecto de dicho candidato a fármaco sobre la expresión de BNO1 en dicha célula.
- 10 22. El uso de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para escrutar candidatos a fármacos.
23. El uso *in vitro* de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el diagnóstico o el pronóstico de trastornos asociados con una disfunción de BNO1 o una predisposición a tales trastornos.
24. El uso *in vitro* de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, para el diagnóstico o el pronóstico de trastornos asociados con una disfunción de BNO1 o una predisposición a tales trastornos.
- 15 25. El uso *in vitro* de un anticuerpo según se ha definido en la reivindicación 15, para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno asociado con BNO1 o una predisposición a tales trastornos.
26. Un método *in vitro* para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno asociado con mutaciones en BNO1, o una predisposición a tales trastornos en un paciente, que comprende las etapas de:
  - 20 comparar BNO1 o un ácido nucleico que codifica BNO1 procedente de una muestra que se debe obtener a partir de un paciente con BNO1 de tipo silvestre o un ácido nucleico que lo codifica con el fin de establecer si la persona expresa un BNO1 mutante.
27. Un método según la reivindicación 26, en el que se compara la secuencia de nucleótidos del ADN del paciente con la secuencia de ADN que codifica BNO1 de tipo silvestre.
28. Un método *in vitro* para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno asociado con una expresión o una actividad anormal de BNO1, o una predisposición a tales trastornos, que comprende las etapas de:
  - 25 (1) establecer un perfil para la expresión normal de BNO1 en sujetos no afectados;
  - (2) medir el nivel de expresión de BNO1 en una persona sospechosa de tener una expresión o actividad anormal de BNO1; y
  - (3) comparar el nivel de expresión medido con el perfil de expresión normal.
- 30 29. Un método según la reivindicación 28, en el que se emplea una transcriptasa inversa-PCR para medir los niveles de expresión.
30. Un método según la reivindicación 28, en el que un ensayo de hibridación que utiliza una sonda obtenida a partir de BNO1, o un fragmento del mismo, se emplea para medir los niveles de expresión.
- 35 31. Un método según la reivindicación 30, en el que la sonda tiene al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica que codifica BNO1, o un fragmento del mismo.
32. Un método *in vitro* para el diagnóstico o el pronóstico de un trastorno asociado con BNO1, o una predisposición a tales trastornos, que comprende las etapas de:
  - (1) establecer una propiedad física de BNO1 de tipo silvestre;
  - 40 (2) medir la propiedad de un BNO1 expresado por una persona que es sospechosa de tener una anomalía de BNO1; y
  - (3) compararla con la propiedad establecida para BNO1 de tipo silvestre con el fin de establecer si la persona expresa un BNO1 mutante.
33. Un método según la reivindicación 32, en el que la propiedad es la movilidad electroforética.
34. Un método según la reivindicación 32, en el que la propiedad es el patrón de escisión proteolítica.
- 45 35. Un animal no humano modificado genéticamente seleccionado entre el grupo que consiste en ratas, ratones,

hámsteres, cobayas, conejos, perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos y primates no humanos tales como monos y chimpancés, transformado con una molécula de ácido nucleico aislada tal y como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

- 5 36. Un animal no humano modificado genéticamente seleccionado entre el grupo que consiste en ratas, ratones, hámsteres, cobayas, conejos, perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos y primates no humanos tales como monos y chimpancés, en el que el gen BNO1 homólogo y la función génica se han desactivado.
37. El uso de un animal no humano modificado genéticamente tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36, en el escrutinio en busca de compuestos farmacéuticos candidatos.
- 10 38. Una micromatriz para detectar BNO1 que comprende un ácido nucleico que codifica o bien una isoforma de BNO1, o un fragmento de la misma, o ácidos nucleicos que codifican ambas isoformas de BNO1, o fragmentos de las mismas.

Analizado en: serie 1: 189 casos totales

serie 2: 123 casos totales

1	2	3	marcador	loc.	589	819	912	465	376	549	916	787	204	369	353	387	580	666	753	230	355	476	921	97	240	443	75	9	330	468	531	405	84	211	489	531	96	202	410	237	592
x	x	x	D16S771	q12.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S27	q21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S320	q13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S533	q21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S265	q21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S10	q21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
x	x	x	D16S186	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S398	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S545	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S301	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S318	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	E-act	q22.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S260	q22.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S752	q22.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S2924	q22.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	HPTAT	q22.3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S450	q23.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S395	q23.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S315	q23.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S266	q23.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S516	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S504	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S289	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S507	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S511	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S402	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S449	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
x	x	x	D16S393	q24.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R																								

no realizado/no interpretable	no informativo	retención	pérdida
ENI	R	L	

Figura 2

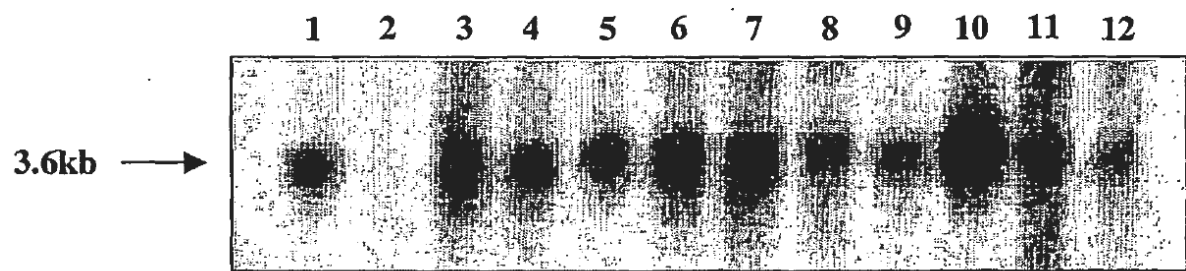


Figura 3

BNO1 - R C S L L E L P P E L L V E I F A S L P G T D L P S L A Q V C T K F R R I L H T D T I W R R R - -  
 k P F P L L R L P e E I L L r K I L e k L D P i D L L r L R K V S K K W R s L V D s l n i w f k f I e  
 s s s I s d m l K l i k e V f k h M p f k E R f n F S l t C R R F K r i i k k k f k i r k L l  
 r f n i d v a n i r r s l i k k v s t n l q l r d l f k d r  
 s y e I q

Figura 4

