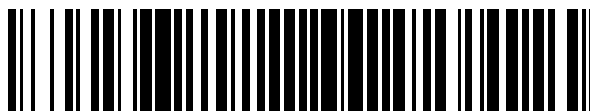


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 895**

51 Int. Cl.:

C12N 15/68 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2004** **E 11156979 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014** **EP 2380985**

54 Título: **Células que expresan vitamina K epóxido reductasa y uso de las mismas**

30 Prioridad:

23.09.2003 US 505527 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL
HILL (100.0%)
308 Bynum Hall Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599, US**

72 Inventor/es:

**STAFFORD, DARREL W. y
LI, TAO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 453 895 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

Células que expresan vitamina K epóxido reductasa y uso de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a células hospedantes que contienen ácidos nucleicos aislados que codifican vitamina K epóxido reductasa (VKOR), y a métodos de uso de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 La función de numerosas proteínas requiere la modificación de múltiples restos de ácido glutámico a γ -carboxi-glutamato. Entre éstas, las proteínas de coagulación dependientes de vitamina K (VKD), FIX (factor Christmas), FVII y protrombina son las mejor conocidas. La observación de que la genosupresión del gen de la proteína Gla de la matriz da como resultado la calcificación de las arterias del ratón (Luo et al. (1997) "Spontaneous calcification of
15 arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA proteína" Nature 386:78-81) enfatiza la importancia del ciclo de la vitamina K para proteínas con funciones distintas de la coagulación. Además, Gas6 y otras proteínas Gla de función desconocida se expresan en el tejido neural, y la exposición a warfarina *in utero* da como resultado retraso mental y anomalías faciales. Esto es consistente con la observación de que la expresión de VKD carboxilasa, la enzima que
20 consigue la modificación de Gla, está regulada temporalmente de una manera específica de tejido con alta expresión en el sistema nervioso durante las etapas embrionarias tempranas. De manera simultánea a la carboxilación, la vitamina K reducida, un cosustrato de la reacción, se convierte en epóxido de vitamina K. Debido a que la cantidad de vitamina K en la dieta humana es limitada, el epóxido de vitamina K debe convertirse de nuevo en vitamina K mediante la vitamina K epóxido reductasa (VKOR) para evitar su agotamiento. La warfarina, el fármaco
25 anticoagulante más ampliamente usado, selecciona como diana la VKOR y evita la regeneración de la vitamina K. La consecuencia es una disminución en la concentración de vitamina K reducida, lo que da como resultado una tasa de carboxilación reducida mediante la γ -glutamyl carboxilasa y la producción de proteínas dependientes de vitamina K infracarboxiladas.

30 En los Estados Unidos de América solo, la warfarina se prescribe a más de un millón de pacientes al año, y en Holanda se ha dado a conocer que aproximadamente el 2% de la población está recibiendo una terapia con warfarina a largo plazo. Debido a que la dosis de warfarina requerida para un nivel terapéutico de anticoagulación varía enormemente entre los pacientes, la utilización de warfarina va acompañada de un riesgo significativo de efectos secundarios. Por ejemplo, se ha dado a conocer que tras el inicio de la terapia con warfarina se producían episodios de hemorragias importantes en 1-2% de los pacientes, y se producía la muerte en 0,1-0,7% de los
35 pacientes. A pesar de los peligros, se ha estimado que el uso de warfarina puede prevenir 20 apoplejías por episodio de hemorragia inducida, y probablemente está utilizándose menos de lo debido por el miedo a la hemorragia inducida.

La presente invención resuelve los defectos previos en la técnica al proporcionar métodos y composiciones para correlacionar polimorfismos de un solo nucleótido en un sujeto con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, permitiendo de ese modo una determinación más exacta y rápida de dosis terapéuticas y de mantenimiento de warfarina con un riesgo reducido para el sujeto.

Sumario de la invención

40 La presente descripción enseña un método para identificar un sujeto humano que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende detectar en el sujeto la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR, en el que el polimorfismo de un solo nucleótido está correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, identificando de ese modo el sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

Adicionalmente se proporciona un método para identificar un sujeto humano que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) correlacionar la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR con una sensibilidad mayor o menor a warfarina; y b) detectar el polimorfismo de un solo nucleótido de la
45 etapa a) en el sujeto, identificando de ese modo un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

En una realización adicional, la descripción enseña un método para identificar un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende:

a) identificar un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina;

b) detectar en el sujeto la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR; y

50 c) correlacionar la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido de la etapa b) con la sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto, identificando de ese modo un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

Además, la presente descripción se refiere a un método para correlacionar un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR de un sujeto con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) identificar un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina; b) determinar la secuencia nucleotídica del gen de VKOR del sujeto de (a); c) comparar la secuencia nucleotídica de la etapa (b) con la secuencia nucleotídica de tipo salvaje del gen de VKOR; d) detectar un polimorfismo de un solo nucleótido en la secuencia nucleotídica de (b); y e) correlacionar el polimorfismo de un solo nucleótido de (d) con una sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto de (a).

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica vitamina K epóxido reductasa (VKOR), particularmente VKOR de mamífero (*por ejemplo*, humana, ovina, bovina, de mono, etc.). Los ejemplos incluyen (a) ácidos nucleicos como se describen aquí, tales como ácidos nucleicos aislados que tienen la secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID NO: 8 o SEC ID NO: 9; (b) ácidos nucleicos que se hibridan a ácidos nucleicos aislados de (a) anteriores o el complemento de los mismos (*por ejemplo*, en condiciones rigurosas), y/o tienen identidad de secuencia sustancial con ácidos nucleicos de (a) anteriores (*por ejemplo*, son 80, 85, 90, 95 ó 99% idénticos a los ácidos nucleicos de (a) anteriores), y codifican una VKOR; y (c) ácidos nucleicos que difieren de los ácidos nucleicos de (a) o (b) anteriores debido a la degeneración del código genético, pero codifican una VKOR codificada por un ácido nucleico de (a) o (b) anterior.

El término "rigurosa", como se usa aquí, se refiere a condiciones de hibridación que son comprendidas habitualmente en la técnica para definir las materias primas del procedimiento de hibridación. Las condiciones de rigurosidad pueden ser bajas, elevadas o medias, como esos términos son conocidos habitualmente en la técnica y son bien reconocidos por el experto normal. Las condiciones de hibridación de rigurosidad elevada que permitirán a secuencias nucleotídicas homólogas hibridarse a una secuencia nucleotídica como se da aquí son bien conocidas en la técnica. Como ejemplo, la hibridación de tales secuencias a las moléculas de ácido nucleico descritas aquí se puede llevar a cabo en 25% de formamida, 5X SSC, 5X de disolución de Denhardt y 5% de sulfato de dextrano a 42°C, con condiciones de lavado de 25% de formamida, 5X SSC y 0,1% de SDS a 42°C, para permitir la hibridación de secuencias de alrededor de 60% de homología. Otro ejemplo incluye condiciones de hibridación de 6X SSC, 0,1% de SDS a alrededor de 45°C, seguido de condiciones de lavado de 0,2X SSC, 0,1% de SDS a 50-65°C. Otro ejemplo de condiciones rigurosas está representado por una rigurosidad de lavado de 0,3 M de NaCl, 0,03M de citrato de sodio, 0,1% de SDS a 60-70°C usando un ensayo de hibridación estándar (véase SAMBROOK et al., EDS., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª ed. (Cold Spring Harbor, NY 1989). En diversas realizaciones, las condiciones rigurosas pueden incluir, por ejemplo, condiciones muy rigurosas (es decir, rigurosidad elevada) (por ejemplo, hibridación a ADN unido al filtro en 0,5 M de NaHPO₄, 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 1 mM de EDTA a 65°C, y un lavado en 0,2xSSC/0,1% de SDS a 68°C), y/o condiciones moderadamente rigurosas (es decir, rigurosidad media) (por ejemplo, lavado en 0,2xSSC/0,1% de SDS a 42°C).

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un ácido nucleico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica vitamina K epóxido reductasa como se describe aquí, asociado operativamente a un promotor heterólogo.

Un aspecto adicional de la presente invención es una célula que contiene y expresa un ácido nucleico recombinante como se define en las reivindicaciones anejas. Las células adecuadas incluyen células vegetales, de animales, de mamíferos, de insectos, de levaduras y bacterianas.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un oligonucleótido que se hibrida a un ácido nucleico aislado que codifica VKOR como se describe aquí.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a VKOR aislada y purificada (*por ejemplo*, VKOR purificada hasta homogeneidad) codificada por un ácido nucleico como se describe aquí. Por ejemplo, la VKOR de esta descripción puede comprender la secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO: 10.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para obtener una proteína dependiente de vitamina K, que comprende cultivar una célula hospedante que expresa un ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de vitamina K como se define en las reivindicaciones anejas en presencia de vitamina K y produce una proteína dependiente de vitamina K, y luego recoger del cultivo la proteína dependiente de vitamina K, conteniendo y expresando la célula hospedante un ácido nucleico heterólogo que codifica carboxilasa dependiente de vitamina K, y conteniendo y expresando además la célula hospedante un ácido nucleico heterólogo que codifica vitamina K epóxido reductasa (VKOR), y producir VKOR tal como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-D. Comparación de dosis de warfarina en sujetos de tipo salvaje, heterocigotos y homocigotos para SNPs vk2581, vk3294 y vk4769, así como comparación de dosis de warfarina en sujetos de tipo salvaje y heterocigotos para P450 2Y9.

Figura 2. Para cada uno de los 13 conjuntos de ARNip, se transfectaron tres frascos T7 que contenían células A549 y se determinó la actividad de VKOR tras 72 h. El ensayo de VKOR usó vitamina K epóxido 25 µM. Un

conjunto de ARNip específico para el gen gi:13124769 redujo la actividad de VKOR en 64%-70% en ocho repeticiones.

Figura 3. Transcurso de tiempo de la inhibición de la actividad de VKOR mediante el conjunto de ARNip específico para gi:13124769 en células A549. La actividad de VKOR disminuyó de manera continua durante este periodo de tiempo, mientras que el nivel de su ARNm disminuyó rápidamente hasta alrededor de 20% del normal. Para este ensayo se usó vitamina K epóxido 25 μ M. El ARNip no afectó a la actividad de VKD carboxilasa o al nivel de ARNm de lamin A/C.

Figura 4. Se detectó actividad de VKOR cuando se expresó mGC_11276 en células de insecto Sf9. Se usaron $\sim 1 \times 10^6$ células en este ensayo. Las reacciones se llevaron a cabo usando KO 32 μ M a 30°C durante 30 minutos en tampón D. Las células Sf9 del blanco sirvieron como control negativo, y las células A549 como referencia.

Figura 5. Inhibición de VKOR mediante warfarina. Se realizaron las reacciones usando 1,6 mg de proteínas microsomales preparadas a partir de células VKOR_Sf9, KO 60 μ M y diversas concentraciones de warfarina a 30°C durante 15 minutos en tampón D.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, “un”, “una” o “el/la” pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, “una” célula puede significar una única célula o una multiplicidad de células.

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación. Esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de todas las diferentes formas en las que la invención puede ponerse en práctica, o todas las características que pueden añadirse a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización pueden incorporarse en otras realizaciones, y las características ilustradas con respecto a una realización particular pueden eliminarse de esa realización. Además, numerosas variaciones y adiciones a las diversas realizaciones sugeridas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción que no se apartan de la presente invención. Por tanto, la siguiente memoria descriptiva está destinada a ilustrar algunas realizaciones particulares de la invención, y no especificar exhaustivamente todas las permutaciones, combinaciones y variaciones de la misma.

El “Listado de Secuencias” adjunto al presente documento forma una parte de la presente memoria descriptiva como si se expusiese completamente en la misma.

La presente invención puede llevarse a cabo basándose en la presente descripción y utilizando además métodos, componentes y características conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en la patente US nº 5.268.275 concedida a Stafford y Wu, y la patente US nº 6.531.298 concedida a Stafford y Chang.

Tal como se usa en el presente documento, “ácidos nucleicos” abarca tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente) y quimeras de ARN y ADN. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser una cadena sentido o una cadena antisentido. El ácido nucleico puede sintetizarse usando análogos o derivados de oligonucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de fosforotioato o inosina). Tales oligonucleótidos pueden usarse, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades de apareamiento de bases alteradas o resistencia aumentada a nucleasas.

Un “ácido nucleico aislado” es un ADN o ARN que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que deriva. De este modo, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas de o todas las secuencias no codificantes en 5' (por ejemplo, promotoras) que son inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. La expresión incluye por tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un virus o plásmido de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción), independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

El término “aislado” puede referirse a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un “fragmento de ácido nucleico aislado” es un fragmento de ácido nucleico que no se produce de manera natural como fragmento y que no se encontraría en estado natural.

El término “oligonucleótido” se refiere a una secuencia de ácido nucleico de al menos alrededor de seis nucleótidos a alrededor de 100 nucleótidos, por ejemplo de alrededor de 15 a 30 nucleótidos, o alrededor de 20 a 25 nucleótidos, que puede usarse, por ejemplo, como un cebador en una amplificación por PCR, o como sonda en un ensayo de hibridación o en una micromatriz. Los oligonucleótidos pueden ser naturales o sintéticos, por ejemplo ADN, ARN, cadenas principales modificadas, etc.

Quando se afirma que una secuencia de nucleótidos particular tiene un porcentaje de identidad específica con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia, el porcentaje de identidad está en relación con la secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que es el 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia que tiene 100 bases de longitud puede tener 50, 75, 85, 90, 95 ó 99 bases que son completamente idénticas a una secuencia de 50, 75, 85, 90, 95 ó 99 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. La secuencia de nucleótidos también puede ser una secuencia de nucleótidos de 100 bases de longitud que es el 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia a lo largo de toda su longitud. Por supuesto, hay otras secuencias de nucleótidos que cumplirán también los mismos criterios.

Una secuencia de ácido nucleico que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia de nucleótidos de VKOR es al menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:8 ó 9. Para fines de comparación de ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será generalmente de al menos 40 nucleótidos, por ejemplo al menos 60 nucleótidos o más nucleótidos. La identidad de secuencia puede medirse usando software de análisis de secuencias (por ejemplo, paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705).

Tal como se conoce en la técnica, pueden usarse varios programas diferentes para identificar si un ácido nucleico o aminoácido tiene similitud o identidad de secuencia con respecto a una secuencia conocida. La similitud o identidad de secuencia puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48,443 (1970), mediante el método de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984), preferiblemente usando los parámetros por defecto, o mediante inspección.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones por parejas, progresivas. También puede representar gráficamente un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35, 351-360 (1987); el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5, 151-153 (1989).

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787 (1993). Un programa de BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460-480 (1996). WU- BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, que se fijan preferiblemente en los valores por defecto. Los parámetros son valores dinámicos y se establecen mediante el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular en la que está buscándose la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad. Un algoritmo útil adicional es BLAST con saltos, tal como se da a conocer por Altschul et al. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

También puede usarse el programa CLUSTAL para determinar la similitud de secuencia. Este algoritmo se describe por Higgins et al. (1988) Gene 73:237; Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 10881-90; Huang et al. (1992) CABIOS 8: 155-65; y Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24: 307-331.

Además, para secuencias que contienen o bien más o bien menos nucleótidos que los ácidos nucleicos descritos en el presente documento, se entiende que, en una realización, el porcentaje de identidad de secuencia se determinará basándose en el número de nucleótidos idénticos en relación con el número total de bases nucleotídicas. De este modo, por ejemplo, la identidad de secuencia de secuencias más cortas que una secuencia dada a conocer específicamente en el presente documento se determinará usando el número de bases nucleotídicas en la secuencia más corta, en una realización. En cálculos del porcentaje de identidad, no se asigna peso relativo a diversas manifestaciones de la variación de secuencia, tales como, inserciones, supresiones, sustituciones, etc.

Los polipéptidos VKOR de la descripción incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos recombinantes, péptidos sintéticos y polipéptidos naturales. La invención también engloba secuencias de ácido nucleico que codifican formas de polipéptidos VKOR en los que se alteran o suprimen secuencias de aminoácidos que se producen de manera natural. Los ácidos nucleicos preferidos codifican polipéptidos que son solubles en condiciones fisiológicas normales. También están dentro de la descripción ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión en las que toda o una parte de VKOR se fusiona a un polipéptido no relacionado (por ejemplo, un polipéptido marcador o una pareja de fusión) para crear una proteína de fusión. Por ejemplo, el polipéptido puede fusionarse a una etiqueta de hexa-histidina para facilitar la purificación de polipéptidos expresados de manera bacteriana, o a una etiqueta de hemaglutinina para facilitar la purificación de polipéptidos expresados en células eucariotas, o a una etiqueta de HPC4 para facilitar la purificación de polipéptidos mediante cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Se describen también polipéptidos aislados (y los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos) que incluyen una

primera porción y una segunda porción; la primera porción incluye, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido VKOR, y la segunda porción incluye, por ejemplo, un marcador detectable.

La pareja de fusión puede ser, por ejemplo, un polipéptido que facilita la secreción, por ejemplo una secuencia secretora. Un polipéptido fusionado de este tipo se denomina normalmente preproteína. La secuencia secretora puede escindirse por la célula para formar la proteína madura. Se describen también ácidos nucleicos que codifican VKOR fusionados a una secuencia de polipéptido para producir una preproteína inactiva. Las preproteínas pueden convertirse en la forma activa de la proteína mediante la eliminación de la secuencia inactivante.

La descripción también incluye ácidos nucleicos que se hibridan, por ejemplo, en condiciones de hibridación rigurosas (tal como se define en el presente documento) con toda o una porción de la secuencia de nucleótidos de SEC ID NOS: 1-6, 8 ó 9 o sus complementos. En realizaciones particulares, la porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación es normalmente de al menos 15 (por ejemplo, 20, 30 ó 50) nucleótidos de longitud. La porción de hibridación del ácido nucleico de hibridación es al menos 80%, por ejemplo, al menos 95%, al menos 98% o 100% idéntica a la secuencia de una porción o todo un ácido nucleico que codifica un polipéptido VKOR. Los ácidos nucleicos de hibridación del tipo descrito en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, como sonda de clonación, como cebador (por ejemplo, cebador de PCR) o como sonda de diagnóstico. También se incluyen dentro de la descripción ARN inhibidores pequeños (ARNip) y/o ARN antisentido que inhiben la función de VKOR, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo de actividad, tal como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

La invención muestra células, por ejemplo, células transformadas, que contienen un ácido nucleico como se define en las reivindicaciones anejas. Una "célula transformada" es una célula en la que (o en un antecesor de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante, un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido VKOR, y/o un ácido nucleico antisentido o ARNip. Se incluyen células tanto procariotas como eucariotas, por ejemplo, de bacterias, levaduras, insectos, ratones, ratas, seres humanos, plantas y similares.

La descripción también incluye constructos de ácido nucleico (por ejemplo, vectores y plásmidos) que incluyen un ácido nucleico de la invención que está operativamente unido a elementos de control de la transcripción y/o traducción para permitir la expresión, por ejemplo, vectores de expresión. Por "operativamente unido" quiere decirse que un ácido nucleico seleccionado, por ejemplo una molécula de ADN que codifica un polipéptido VKOR, se coloca adyacente a uno o más elementos reguladores, por ejemplo un promotor, que dirige la transcripción y/o traducción de la secuencia, de manera que los elementos reguladores pueden controlar la transcripción y/o traducción del ácido nucleico seleccionado.

La presente descripción se refiere además a fragmentos u oligonucleótidos de los ácidos nucleicos de esta invención, que pueden usarse como cebadores o sondas. De este modo, en algunas realizaciones, un fragmento u oligonucleótido de esta invención es una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 1500, 2000, 2500 ó 3000 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID NO:8 o SEC ID NO:9. Los ejemplos de oligonucleótidos de esta descripción están contenidos en el Listado de Secuencias incluido con el presente documento. Tales fragmentos u oligonucleótidos pueden modificarse o marcarse de manera detectable, por ejemplo, para que incluyan y/o incorporen un sitio de escisión de enzimas de restricción cuando se emplean como cebador en un ensayo de amplificación (por ejemplo, PCR).

La descripción también incluye polipéptidos VKOR purificados o aislados, tales como, por ejemplo, un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en y/o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10, o un péptido o fragmento biológicamente activo de la misma. Tales fragmentos o péptidos tienen normalmente al menos alrededor de diez aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10 (por ejemplo, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 95, 100, 125 ó 150 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10) y pueden ser péptidos o un fragmento de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la proteína VKOR (por ejemplo, tal como se expone en SEC ID NO:10). La actividad biológica de un fragmento o péptido de esta invención puede determinarse según los métodos proporcionados en el presente documento y tal como se conocen en la técnica para identificar la actividad de VKOR. Los fragmentos y péptidos de la proteína VKOR de esta descripción también pueden ser activos como antígenos para la producción de anticuerpos. La identificación de epítomos en un fragmento o péptido de esta descripción se lleva a cabo mediante protocolos bien conocidos, y estaría dentro del conocimiento de un experto habitual en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, tanto "proteína" como "polipéptido" significan cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación, fosforilación o N-miristilación). De este modo, la expresión "polipéptido VKOR" incluye proteínas VKOR de longitud completa que se producen de manera natural, respectivamente, así como polipéptidos producidos de manera recombinante o sintética que corresponden a una proteína VKOR de longitud completa que se produce de manera natural, o a una porción de un polipéptido VKOR que se produce de manera natural o sintético.

Un polipéptido o compuesto "purificado" o "aislado" es una composición que tiene al menos 60% en peso del compuesto de interés, por ejemplo un anticuerpo o polipéptido VKOR que está separado o sustancialmente libre de

al menos algunos de los otros componentes del virus u organismo que se produce de manera natural, por ejemplo los componentes estructurales virales o celulares, u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polipéptido. Tal como se usa en el presente documento, el polipéptido "aislado" es al menos alrededor de 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más puro (p/p). Preferiblemente, la preparación tiene al menos el 75% (por ejemplo, al menos el 90% o 99%) en peso del compuesto de interés. La pureza puede medirse mediante cualquier método convencional apropiado, por ejemplo cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

Los polipéptidos VKOR preferidos incluyen una secuencia sustancialmente idéntica a todo o una parte de un polipéptido VKOR que se produce de manera natural. Los polipéptidos "sustancialmente idénticos" a las secuencias de polipéptido VKOR descritas en el presente documento tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% u 85% (por ejemplo, el 90%, 95% o 99%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos VKOR de SEC ID NO: 10. Para fines de comparación, la longitud de la secuencia de polipéptido VKOR de referencia será generalmente de al menos 16 aminoácidos, por ejemplo al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 ó 100 aminoácidos.

En el caso de secuencias de polipéptido que son menores de 100% idénticas a una secuencia de referencia, las posiciones no idénticas son preferiblemente, pero no necesariamente, sustituciones conservativas para la secuencia de referencia. Las sustituciones conservativas incluyen normalmente, pero no se limitan a, sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Cuando se afirma que un polipéptido particular tiene un porcentaje de identidad específica con respecto a un polipéptido de referencia de una longitud definida, el porcentaje de identidad está en relación con el polipéptido de referencia. De este modo, por ejemplo, un polipéptido que es 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntico a un polipéptido de referencia que tiene 100 aminoácidos de longitud puede ser un polipéptido de 50, 75, 85, 90, 95 ó 99 aminoácidos que es completamente idéntico a una porción de 50, 75, 85, 90, 95 ó 99 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. Puede ser también un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud que es 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntico al polipéptido de referencia a lo largo de toda su longitud. Por supuesto, otros polipéptidos cumplirán también los mismos criterios.

La descripción también incluye anticuerpos purificados o aislados que se unen específicamente a un polipéptido VKOR de esta invención o a un fragmento del mismo. Por "se une específicamente" se quiere decir que un anticuerpo reconoce y se une a un antígeno particular, por ejemplo un polipéptido VKOR, o a un epítipo en un fragmento o péptido de un polipéptido VKOR, pero no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, y en otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. La producción de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, incluyendo anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos, etc., es bien conocida en la técnica.

En otro aspecto, la descripción incluye un método para detectar un polipéptido VKOR en una muestra. Este método comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido VKOR, o a un fragmento del mismo, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre un anticuerpo y VKOR; y detectar la formación de un complejo, si lo hay, como detección de un polipéptido VKOR o un fragmento del mismo en la muestra. Tales inmunoensayos son bien conocidos en la técnica, e incluyen ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunotransferencia, ensayos de inmunomarcaje, ELISA, etc.

La presente descripción también se refiere a un método para detectar un ácido nucleico que codifica un polipéptido VKOR en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un ácido nucleico de esta invención que codifica VKOR o un fragmento de la misma, o un complemento de un ácido nucleico que codifica VKOR o un fragmento de la misma, en condiciones mediante las cuales se puede formar un complejo de hibridación, y detectar la formación de un complejo de hibridación, detectando de ese modo un ácido nucleico que codifica un polipéptido VKOR en una muestra. Tales ensayos de hibridación son bien conocidos en la técnica, e incluyen ensayos de detección de sondas y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos.

También está englobado por la invención un método para obtener un gen relacionado con (es decir, un homólogo funcional de) el gen de VKOR. Tal método supone obtener o producir una sonda marcada de forma detectable que comprende un ácido nucleico aislado que codifica toda o una porción de VKOR, o un homólogo de la misma; identificar una librería de fragmentos de ácidos nucleicos con la sonda marcada, en condiciones que permitan la hibridación de la sonda a los fragmentos de ácidos nucleicos en la librería, formando de ese modo dúplex de ácidos nucleicos; aislar dúplex marcados, si los hay; y preparar una secuencia génica de longitud completa a partir de los fragmentos de ácido nucleico en cualquier dúplex marcado para obtener un gen relacionado con el gen de VKOR.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método de preparación de una proteína dependiente de vitamina K, que comprende cultivar una célula hospedante que expresa un ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de vitamina K, como se define en las reivindicaciones anejas, en presencia de vitamina K y produce una proteína dependiente de vitamina K, y luego recoger del cultivo la proteína dependiente de vitamina K, conteniendo y expresando la célula hospedante un ácido nucleico heterólogo que codifica carboxilasa dependiente de vitamina K, y

conteniendo y expresando además la célula hospedante un ácido nucleico heterólogo que codifica vitamina K epóxido reductasa (VKOR), y producir VKOR tal como se describe en el presente documento. La expresión del ácido nucleico que codifica VKOR y la producción de la VKOR provoca que la célula produzca mayores niveles de la proteína dependiente de vitamina K que los que produciría en ausencia de la VKOR.

5 De este modo, la presente invención proporciona también un método de producción de una proteína dependiente de vitamina K, que comprende:

10 a) introducir en una célula un ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de vitamina K como se define en las reivindicaciones anejas, en condiciones por las que se expresa el ácido nucleico y la proteína dependiente de vitamina K se produce en presencia de vitamina K, en el que la célula comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica carboxilasa dependiente de vitamina K y comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica vitamina K epóxido reductasa; y

15 b) recoger opcionalmente de la célula la proteína dependiente de vitamina K. La proteína dependiente de vitamina K que puede producirse puede ser cualquier proteína dependiente de vitamina K conocida ahora o identificada más adelante como tal, incluyendo, pero sin limitarse a, Factor VII, Factor IX, Factor X, Proteína C, Proteína S y protrombina, en cualquier combinación. Puede usarse cualquier célula hospedante que pueda transformarse con los ácidos nucleicos descritos tal como se describe en el presente documento, aunque en algunas realizaciones pueden usarse células hospedantes no humanas o incluso no de mamífero. Los ácidos nucleicos que codifican carboxilasa dependiente de vitamina K, y los ácidos nucleicos que codifican proteínas dependientes de vitamina K, tal como se describen en el presente documento, se conocen bien en la técnica, y su introducción en células para su expresión se llevaría a cabo según protocolos de rutina.

20 Ciertas realizaciones de esta descripción se basan en el descubrimiento de los inventores de que una dosis terapéutica de warfarina de los sujetos para terapia anticoagulación se puede correlacionar con la presencia de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido en el gen de VKOR del sujeto. De este modo, la presente descripción también se refiere a un método para identificar un sujeto humano que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende detectar en el sujeto la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen de VKOR, en el que el polimorfismo de un solo nucleótido está correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, identificando de ese modo al sujeto por tener sensibilidad mayor o menor a warfarina.

25 Un ejemplo de un SNP correlacionado con una mayor sensibilidad a warfarina es una alteración G → C en el nucleótido 2581 (SEC ID NO: 12) (en el intrón 2 del gen de VKOR; número de acceso de GenBank refSNP ID: rs8050894) de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11, que es una secuencia de referencia que engloba la secuencia genómica de SEC ID NO: 8 y aproximadamente 1000 nucleótidos precedentes y siguientes a esta secuencia. Esta secuencia se puede situar por tener la posición genómica "cromosoma humano 16p11.2" o en el mapa físico en la base de datos de NCBI como cromosoma humano 16: 31009700-31013800.

30 Los ejemplos de SNPs correlacionados con una menor sensibilidad a warfarina son la alteración T → C en el nucleótido 3294 (SEC ID NO: 13) (en el intrón 2 del gen VKOR; número de acceso de GenBank refSNP ID: rs2359612) de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11, y una alteración G → A en el nucleótido 4769 (SEC ID NO: 14) (en la 3'UTR del gen de VKOR; número de acceso de GenBank refSNP ID: rs7294) de la secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 11.

35 Como se usa aquí, un sujeto que tiene una "mayor sensibilidad a warfarina" es un sujeto para el que una dosis terapéutica o de mantenimiento adecuada de warfarina es menor que la dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina que sería adecuada para un sujeto normal, es decir, un sujeto que no poseyó un SNP en el gen de VKOR que imparte un fenotipo de mayor sensibilidad a warfarina. Por el contrario, como se usa aquí, un sujeto que tiene una "menor sensibilidad a warfarina" es un sujeto para el que una dosis terapéutica o de mantenimiento adecuada de warfarina es mayor que la dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina que sería adecuada para un sujeto normal, es decir, un sujeto que no poseyó un SNP en el gen de VKOR que imparte un fenotipo de mayor sensibilidad a warfarina. Un ejemplo de una dosis terapéutica típica de warfarina para un sujeto normal es 35 mg por semana, aunque esta cantidad puede variar (por ejemplo, en Aithal et al. (1999) Lancet 353:717-719 se describe un intervalo de dosis de 3,5 a 420 mg por semana). Una dosis terapéutica de warfarina se puede determinar para un grupo de estudio dado según los métodos descritos aquí, que se pueden usar para identificar sujetos con dosis terapéuticas de warfarina por encima o por debajo de esta dosis, identificando de ese modo sujetos que tienen sensibilidad menor o mayor a warfarina.

40 Se describe adicionalmente aquí un método para identificar un sujeto humano que tiene sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) correlacionar la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR con una sensibilidad mayor o menor a warfarina; y b) detectar el polimorfismo de un solo nucleótido de la etapa (a) en el sujeto, identificando de ese modo un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

45 Además, la presente descripción se refiere a un método para identificar un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) identificar un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina; b) detectar en el sujeto la presencia de un polimorfismo

de un solo nucleótido en el gen de VKOR; y c) correlacionar la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido de la etapa (b) con la sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto, identificando de ese modo un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR correlacionado con una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

También se describe aquí un método para correlacionar un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de VKOR de un sujeto con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) identificar un sujeto que tiene sensibilidad mayor o menor a warfarina; b) determinar la secuencia nucleotídica del gen de VKOR del sujeto de (a); c) comparar la secuencia nucleotídica de la etapa (b) con la secuencia nucleotídica de tipo salvaje del gen de VKOR; d) detectar un polimorfismo de un solo nucleótido en la secuencia nucleotídica de (b); y e) correlacionar el polimorfismo de un solo nucleótido de (d) con una sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto de (a).

Un sujeto se identifica por tener una sensibilidad mayor o menor a warfarina estableciendo una dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina para terapia anticoagulación según protocolos bien conocidos, y comparando la dosis terapéutica o de mantenimiento para ese sujeto con la dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina para terapia anticoagulación de una población de sujetos normales (por ejemplo, sujetos que carecen de cualesquiera SNPs en el gen de VKOR correlacionados con una sensibilidad mayor o menor a warfarina), a partir de lo cual se calcula una dosis terapéutica o de mantenimiento promedio o media de warfarina. Un sujeto que tiene una dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina que está por debajo de la dosis terapéutica o de mantenimiento promedio de warfarina (por ejemplo, la dosis de warfarina que es terapéutica o que proporciona un nivel de mantenimiento para un sujeto que tiene un gen de VKOR de tipo salvaje, es decir, que carece de cualesquiera polimorfismos de un solo nucleótido asociados con sensibilidad a warfarina) es un sujeto identificado por tener una mayor sensibilidad a warfarina. Un sujeto que tiene una dosis terapéutica o de mantenimiento de warfarina que está por encima de la dosis terapéutica o de mantenimiento promedio de warfarina es un sujeto identificado por tener una menor sensibilidad a warfarina. La dosis terapéutica o de mantenimiento promedio de warfarina para un sujeto con un gen de VKOR de tipo salvaje se podría determinar fácilmente por un experto en la técnica.

La secuencia nucleotídica del gen de VKOR de un sujeto se determina según métodos estándar en la técnica, y como se describe en los Ejemplos proporcionados aquí. Por ejemplo, se extrae ADN genómico de células de un sujeto, y se localiza el gen de VKOR y se secuencia según protocolos conocidos. Los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen de VKOR se identifican mediante una comparación de una secuencia del sujeto con la secuencia de tipo salvaje como se conoce en la técnica (por ejemplo, la secuencia de referencia como se muestra aquí como SEC ID NO: 11).

Un SNP en el gen de VKOR se correlaciona con una sensibilidad mayor o menor a warfarina identificando la presencia de un SNP o múltiples SNPs en el gen de VKOR de un sujeto también identificado por tener sensibilidad mayor o menor a warfarina, es decir, que tiene una dosis de mantenimiento terapéutica de warfarina que está por encima o por debajo de la dosis promedio, y llevando a cabo un análisis estadístico de la asociación del SNP o SNPs con la sensibilidad mayor o menor a warfarina, según métodos bien conocidos de análisis estadístico. Un análisis que identifica una asociación estadística (por ejemplo, una asociación significativa) entre el SNP o SNPs (genotipo) y una sensibilidad mayor o menor a warfarina (fenotipo) establece una correlación entre la presencia del SNP o SNPs en un sujeto y una sensibilidad mayor o menor a warfarina en ese sujeto.

Se contempla que una combinación de factores, incluyendo la presencia de uno o más SNPs en el gen de VKOR de un sujeto, se puede correlacionar con una sensibilidad mayor o menor a warfarina en ese sujeto. Tales factores pueden incluir, pero no se limitan a, polimorfismos del citocromo p450 2C9, raza, edad, género, historial de tabaquismo y hepatopatía.

De este modo, la presente descripción también se refiere a un método para identificar un sujeto humano que tiene sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende identificar en el sujeto la presencia de una combinación de factores correlacionada con una sensibilidad mayor o menor a warfarina seleccionados del grupo que consiste en uno o más polimorfismos de un solo nucleótido del gen de VKOR, uno o más polimorfismos del citocromo p450 2C9, raza, edad, género, historial de tabaquismo, hepatopatía, y cualquier combinación de dos o más de estos factores, en el que la combinación de factores está correlacionada con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, identificando de ese modo al sujeto por tener una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

Se describe adicionalmente aquí un método para identificar un sujeto humano que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) correlacionar la presencia de una combinación de factores con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, en el que los factores se seleccionan del grupo que consiste en uno o más polimorfismos de un solo nucleótido del gen de VKOR, uno o más polimorfismos del citocromo p450 2C9, raza, edad, género, historial de tabaquismo, hepatopatía, y cualquier combinación de dos o más de estos factores; y b) detectar la combinación de factores de la etapa (a) en el sujeto, identificando de ese modo un sujeto que tiene sensibilidad mayor o menor a warfarina.

Además, la presente descripción se refiere a un método para identificar una combinación de factores correlacionados con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, en el que los factores se seleccionan del grupo que consiste en uno o más polimorfismos de un solo nucleótido del gen de VKOR, uno o más polimorfismos del citocromo p450 2C9, raza, edad, género, historial de tabaquismo, hepatopatía, y cualquier combinación de dos o

más de estos factores, que comprende: a) identificar un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina; b) detectar en el sujeto la presencia de una combinación de los factores; y c) correlacionar la presencia de la combinación de factores de la etapa (b) con la sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto, identificando de ese modo una combinación de factores correlacionados con una sensibilidad mayor o menor a warfarina.

- 5 También se describe aquí un método para correlacionar una combinación de factores, en el que los factores se seleccionan del grupo que consiste en uno o más polimorfismos de un solo nucleótido del gen de VKOR, uno o más polimorfismos del citocromo p450 2C9, raza, edad, género, historial de tabaquismo, hepatopatía, y cualquier combinación de dos o más de estos factores, con una sensibilidad mayor o menor a warfarina, que comprende: a) identificar un sujeto que tiene una sensibilidad mayor o menor a warfarina; b) identificar la presencia de una combinación de los factores en el sujeto; y c) correlacionar la combinación de los factores de (b) con una sensibilidad mayor o menor a warfarina en el sujeto de (a).

- 10 Una combinación de factores como se describen aquí se correlaciona con una sensibilidad mayor o menor a warfarina identificando la presencia de la combinación de factores en un sujeto también identificado por tener una sensibilidad mayor o menor a warfarina, y llevando a cabo un análisis estadístico de la asociación de la combinación de factores con la sensibilidad mayor o menor a warfarina, según métodos bien conocidos de análisis estadístico. Un análisis que identifica una asociación estadística (por ejemplo, una asociación significativa) entre la combinación de factores y el fenotipo de sensibilidad a warfarina (mayor o menor) establece una correlación entre la presencia de la combinación de factores en un sujeto y una sensibilidad mayor o menor a warfarina en ese sujeto.

- 15 Se proporcionan adicionalmente aquí ácidos nucleicos que codifican VKOR y que comprenden uno o más SNPs como se describen aquí. De este modo, la presente descripción se refiere además a ácidos nucleicos que comprenden, que consisten esencialmente en, y/o que consisten en la secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID Nos: 12, 13, 14, 15 y 16. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en un vector, y el vector puede estar presente en una célula. Se incluyen además proteínas codificadas por un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID Nos: 12, 13, 14, 15 y 16, así como anticuerpos que se unen específicamente a proteína codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica como se expone en SEC ID Nos: 12, 13, 14, 15 y 16.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 CORRELACIÓN ENTRE SNPS EN EL GEN DE VKOR Y SENSIBILIDAD MAYOR O MENOR A WARFARINA

- 30 La isoforma más prevalente del gen de VKOR tiene alrededor de 4 kb de longitud, tiene tres exones, y codifica una enzima de 163 aminoácidos con una masa de 18,4 kDa. En el presente estudio, se examinaron tres mutaciones vk2581 (G>C), vk3294(T>C) y vk4769 (G>A), identificadas como SNPs (relaciones de heterocigocidad de 46,9%, 46,8% y 46,3%, respectivamente), en busca de una correlación entre su presencia en un sujeto y la dosis de mantenimiento de warfarina requerida para lograr una respuesta terapéuticamente eficaz.

- 35 1. Selección de sujetos

- Los sujetos se obtuvieron de la UNC Coagulation Clinic en el Centro de Salud Ambulatorio. Se obtuvo la autorización escrita mediante un consejero genético entrenado. Los sujetos que no dominaban el inglés se excluyeron debido a la falta de traductores y a la necesidad de la autorización. Para que fuesen idóneos para el estudio, los sujetos recibieron warfarina durante al menos seis meses, fueron mayores de 18 años, y se monitorizaron mediante la UNC Coagulation Clinic en la Clínica de Cuidado Ambulatorio.

2. Extracción de ADN genómico de sangre completa

Se extrajeron ADN genómicos a partir de la sangre completa de sujetos usando QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN cat#51104). La concentración de ADN se ajustó a 10 ng/μl.

3. Secuenciación de las muestras de ADN genómico

- 45 Se usaron aproximadamente 10 ng de ADN para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores usados para amplificar el gen de VKOR fueron: Exón 1-5' CCAATCGCCGAGTCAGAGG (SEC ID NO:29) y Exón 1-3' CCCAGTCCCCAGCACTGTCT (SEC ID NO:30) para la 5'-UTR y la región del Exón 1; Exón 2-5' AGGGGAGGATAGGGTCAGTG (SEC ID NO:31) y Exón 2-3' CCTGTTAGTTACCTCCCCACA (SEC ID NO:32) para la región del Exón 2; y el Exón 3-5' ATACGTGCGTAAGCCACCAC (SEC ID NO:33) y el Exón 3-3' ACCCAGATATGCCCCCTTAG (SEC ID NO:34) para la región del Exón 3 y 3'-UTR. Para detectar SNPs en el gen de VKOR, se usó secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar de alto rendimiento automatizada.

4. Detección de SNPs conocidas usando PCR en tiempo real

Los reactivos de ensayo para el genotipado de SNP procedieron del servicio Assay-by-Design™ (Applied Biosystems, cat#4332072). Los cebadores y sondas (marcados con los colorantes FAM™ y VIC™) se diseñaron

usando el software Primer Express, y se sintetizaron en un sintetizador de Applied Biosystems. Los pares de cebadores para cada SNP se localizaron en la posición en dirección 5'/en dirección 3' del sitio de SNP, y pueden generar menos de 100 pb de longitud de un fragmento de ADN en la reacción de PCR. Las sondas marcadas con los colorantes FAM™ y VIC™ se diseñaron para cubrir los sitios de SNP con una longitud de 15-16 nt. Las secuencias de los cebadores y de las sondas para cada SNP de VKOR se muestran en la Tabla 2.

En las reacciones de PCR se usó la 2X TaqMan™ Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, cat#4324018). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en tiempo real en una máquina Opticon II (MJ Research). Hubo un precalentamiento a 95°C durante 10 minutos, seguido de 92°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, y después una lectura de placa. Los resultados se leyeron según el valor de señal de los colorantes FAM y VIC.

5. Análisis estadístico

La diferencia de dosis promedio entre diferentes genotipos se comparó mediante análisis de varianza (ANOVA) usando SAS versión 8.0 (SAS, Inc., Cary, NC). Un valor p de dos colas menor que 0,05 se consideró significativo. El examen de la distribución y residuos para la dosis promedio de tratamiento entre los grupos de SNP indicó que fue necesaria una transformación logarítmica para satisfacer la suposición de homogeneidad de varianza.

6. Correlación de SNPs con la dosis de warfarina

Mediante secuenciación directa de ADN genómico y detección de SNP mediante PCR en tiempo real, se identificaron cinco SNPs en el gen de VKOR: uno en la 5'-UTR, dos en el intrón II, uno en la región codificante y uno en la 3'-UTR (Tabla 1).

Entre estos SNPs, el alelo de SNPs vk563 y vk4501 fue portado solamente por uno de los 58 sujetos del estudio (un heterocigoto triple, que también porta el alelo de SNP 3'-UTR), mientras que los otros SNPs se identificaron en 17-25 pacientes heterocigotos.

Cada marcador se analizó en primer lugar de forma independiente. La Figura 1A muestra que la dosis promedio de warfarina para pacientes con el alelo de tipo salvaje vk2581 fue $50,19 \pm 3,20$ mg por semana ($n = 26$), mientras que aquellos heterocigotos y homocigotos para este polimorfismo fueron $35,19 \pm 3,73$ ($n = 17$) y $31,14 \pm 6,2$ mg por semana ($n = 15$), respectivamente. La Figura 1B muestra que la dosis promedio de warfarina para pacientes con el alelo vk3294 de tipo salvaje fue $25,29 \pm 3,05$ mg por semana ($n = 11$), mientras que los pacientes que poseen los alelos heterocigotos y homocigotos fueron $41,68 \pm 4,92$ ($n = 25$) y $47,73 \pm 2,75$ mg por semana ($n = 22$), respectivamente. La Figura 1C muestra que la dosis promedio de warfarina para pacientes con el alelo de tipo salvaje de SNP vk4769 fue $35,35 \pm 4,01$ mg por semana ($n = 27$), mientras que los pacientes con los alelos heterocigotos y homocigotos requirieron $44,48 \pm 4,80$ ($n = 19$) y $47,56 \pm 3,86$ mg por semana ($n = 12$), respectivamente. También se observó que P450 2C9*3 tiene un efecto significativo sobre la dosis de warfarina (Figura 1D), como se da a conocer previamente (Joffe et al. (2004) "Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphism" *Thromb Haemost* 91:1123-1128). La dosis promedio de warfarina para pacientes con P450 2C9*1 (tipo salvaje) fue $43,82 \pm 2,75$ mg por semana ($n = 50$), mientras que los pacientes heterocigotos para este alelo requirieron $22,4 \pm 4,34$ mg por semana ($n = 8$).

7. Análisis estadístico

La asociación del Loge (dosis promedio de warfarina)(LnDosis) con los SNPs en el gen de VKOR se examinó mediante análisis de varianza (ANOVA). Se usó en primer lugar SAS para realizar un procedimiento repetido en el que se examinó una serie de factores (raza, género, historial de tabaquismo, hepatopatías, SNPs en el gen del citocromo P450 2Y9, etc.) para identificar factores, excluyendo SNPs de VKOR, que pueden afectar a la dosis. P450 2C9*3 estaba significativamente asociado con la dosis promedio de warfarina. De este modo, se incluyó como una covariante para el análisis posterior. El análisis indicó que los tres SNPs de VKOR todavía estaban significativamente asociados débilmente con la dosis de warfarina (vk2581, $P < 0,0001$; vk3294, $P < 0,0001$; y vk4769, $P = 0,0044$), cuando se incluye la covarianza.

Para ensayar específicamente si los tres SNPs de VKOR estaban asociados de forma independiente con la dosis de warfarina, se repitió el análisis en el que dos SNPs en el gen de VKOR se incluyeron como covariables para el otro SNP. Los tres SNPs de VKOR están situados en una distancia de dos kb entre sí, y se espera que estén estrechamente enlazados. Estaba claro a partir de la inspección que, al menos para caucásicos, un haplotipo (en el que A = vk2581 guanina y a = vk2581 citosina; B = vk3294 timina y b = vk3294 citosina; C = vk4769 guanina y c = vk4769 adenina) fue AAbbcc y el otro aaBBCC. Se encontró que la distribución de SNPs individuales en pacientes estaba significativamente correlacionada con los otros ($R = 0,63-0,87$, $p < 0,001$). De hecho, los sujetos con el haplotipo AAbbcc ($n = 7$) necesitaron una dosis significativamente mayor de warfarina (dosis de warfarina = $48,98 \pm 3,93$) en comparación con aquellos pacientes con el haplotipo aaBBCC ($25,29 \pm 3,05$; $p < 0,001$).

EJEMPLO 2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE ARNip

Se seleccionaron ARNip usando una versión avanzada de un algoritmo de diseño racional (Reynolds et al. (2004) "Rational ARNip design for RNA interference" *Nature Biotechnology* 22:326-330). Para cada uno de los 13 genes, se seleccionaron cuatro dúplex de ARNip con las puntuaciones más altas, y se realizó una búsqueda BLAST usando la base de datos Human EST. Para minimizar el potencial de efectos de silenciamiento fuera de diana, sólo se seleccionaron aquellas dianas de secuencia con más de tres apareamientos erróneos frente a secuencias no relacionadas (Jackson et al. (2003) "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi" *Nat Biotechnol* 21:635-7). Se sintetizaron todos los dúplex en Dharmacon (Lafayette, CO) como 21-meros con proyecciones UU usando un método modificado de química de 2'-ACE (Scaringe (2000) "Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis" *Methods Enzymol* 317:3-18) y se fosforiló químicamente la hebra AS para garantizar una actividad máxima (Martinez et al. (2002) "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage en RNAi" *Cell* 110:563-74).

EJEMPLO 3 Transfección con ARNip

La transfección fue esencialmente como se describió anteriormente (Harborth et al. (2001) "Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs" *J Cell Sci* 114:4557-65) con modificaciones menores.

EJEMPLO 4 Ensayo de actividad VKOR

Se tripsinizaron células A549 transfectadas con ARNip y se lavaron dos veces con PBS fría. Se tomaron $1,5 \times 10^7$ células para cada ensayo de VKOR. Se añadieron 200 μ l de tampón D (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 250 mM, KCl 500 mM, glicerol al 20% y CHAPS al 0,75%, pH 7,4) al sedimento celular, seguido del tratamiento con ultrasonidos del lisado celular. Para ensayos de microsomas solubilizados, se prepararon microsomas a partir de 2×10^9 células tal como se describe (Lin et al. (2002) "The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site" *J Biol Chem* 277:28584-91); se usaron de 10 a 50 μ l de microsomas solubilizados para cada ensayo. Se añadió vitamina K epóxido a la concentración indicada en las leyendas de las figuras, y se añadió DTT hasta 4 mM para iniciar la reacción. La mezcla de reacción se incubó en luz amarilla a 30°C durante 30 minutos, y se detuvo añadiendo 500 μ l de AgNO_3 0,05 M:isopropanol (5:9). Se añadieron 500 μ l de hexano y la mezcla se agitó vigorosamente con vórtice durante 1 minuto para extraer la vitamina K y el KO. Tras una centrifugación de 5 minutos, la fase orgánica superior se transfirió a un vial marrón de 5 ml y se secó con N_2 . Se añadieron 150 μ l de tampón de HPLC, acetonitrilo:isopropanol:agua (100:7:2), para disolver la vitamina K y el KO, y la muestra se analizó mediante HPLC en una columna A C-18 (Vydac, nº de cat. 218TP54).

Ejemplo 5 RT-qPCR (PCR cuantitativa con transcriptasa inversa)

Se lavaron 1×10^6 células con PBS dos veces y se aisló el ARN total con reactivo Trizol según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se digirió 1 μ g de ARN mediante RQ1 DNaseI (Promega) y se inactivó con calor. El ADNc de primera cadena se obtuvo con transcriptasa inversa de M-MLV (Invitrogen). Los ADNc se mezclaron con la premezcla DyNAmo SYBR Green qPCR (Finnzymes) y se realizó la PCR en tiempo real con un termociclador de PCR Opticon II (MJ Research). Se usaron los siguientes cebadores:

13124769-5' (F): (TCCAACAGCATATTCGGTTGC, SEC ID NO: 1);

13124769-3 (R)': (TTCTTGACCTTCCGGAACT, SEC ID NO: 2);

GAPDH-F: (GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, SEC ID NO: 3);

GAPDH-R: (GAAGATGGTGATGGGATTTC, SEC ID NO: 4);

Lamina-RT-F: (CTAGGTGAGGCCAAGAAGCAA, SEC ID NO: 5) y

Lamina-RT-R: (CTGTTCTCTCAGCAGACTGC, SEC ID NO: 6).

Ejemplo 6 Sobreexpresión de VKOR en la estirpe celular de insecto Sf9

El ADNc para la región codificante de mGC11276 se clonó en pVL1392 (Pharmingen), con la etiqueta de HPC4 (EDQVDPRLIDGK, SEC ID NO: 7) en su término amino y se expresó en células Sf9 como se describió (Li et al. (2000) "Identification of a Drosophila vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase" *J Biol Chem* 275:18291-6).

Ejemplo 7 Selección génica

La búsqueda del gen de VKOR se centró en el cromosoma dieciséis humano entre los marcadores D16S3131 y D16S419. Esta región corresponde al cromosoma 16 a 50 cM-65 cM en el mapa genético y 26-46,3 Mb en el mapa físico. Se analizaron 190 secuencias codificantes pronosticadas en esta región, mediante una búsqueda BLASTX de la base de datos de proteínas no redundante del NCBI. Se eliminaron aquellos genes humanos y ortólogos de especies relacionadas con función conocida. Debido a que VKOR parece ser una proteína transmembránica (Carlisle y Suttie (1980) "Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes

involved in vitamin K metabolism in rat liver" *Biochemistry* 19:1161-7), los genes restantes se tradujeron según las secuencias de ADNc en la base de datos del NCBI y se analizaron con los programas TMHMM y TMAP (Biology WorkBench, San Diego Supercomputer System) para pronosticar aquéllas con dominios transmembránicos. Se eligieron para análisis adicional trece genes que se pronosticó que codificaban proteínas integrales de la membrana.

5 Ejemplo 8 Examen en líneas celulares para determinar la actividad VKOR

La estrategia era identificar una estirpe celular que expresara cantidades relativamente altas de actividad de VKOR, y usar ARNip para desactivar sistemáticamente los trece genes candidatos. Se ha demostrado que el ARNip, ARN bicatenario de 21-23 nucleótidos, provoca degradación de ARN específico en cultivo celular (Hara et al. (2002) "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action" *Cell* 110:177-89; Krichevsky y Kosik (2002) "RNAi functions in cultured mammalian neurons" *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11926-9; Burns et al. (2003) "Silencing of the Novel p53 Target Gene Snk/Plk2 Leads to Mitotic Catastrophe in Paclitaxel (Taxol)-Exposed Cells" *Mol Cell Biol* 23:5556-71). Sin embargo, la aplicación de ARNip para el cribado a gran escala en células de mamífero no se ha notificado anteriormente debido a la dificultad de identificar una diana funcional para un ARN de células de mamífero específico (Holen et al. (2003) "Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway" *Nucleic Acids Res* 31:2401-7). El desarrollo de un algoritmo de selección racional (Reynolds et al.) para el diseño de ARNip aumenta la probabilidad de que pueda desarrollarse un ARNip específico; además, la probabilidad de éxito puede aumentarse agrupando cuatro ARNip seleccionados de manera racional. El uso de ARNip para la búsqueda de genes no identificados previamente tiene la ventaja de que, aunque la actividad de VKOR requiera el producto de más de un gen para determinar la actividad, el examen debe ser todavía eficaz debido a que el ensayo determina la pérdida de actividad enzimática.

Se cribaron quince estirpes celulares y se identificó que una estirpe de carcinoma de pulmón humano, A549, mostraba una actividad de VKOR sensible a warfarina suficiente para conseguir una medición fácil. Se usó como referencia una segunda estirpe celular de adenocarcinoma colorrectal humano, HT29, que expresaba muy poca actividad de VKOR.

25 Ejemplo 9 Inhibición mediante ARNip de la actividad de VKOR en células A549

Cada uno de los trece conjuntos de ARNip se transfectó por triplicado en células A549 y se sometió a ensayo para determinar la actividad de VKOR tras 72 horas. Un conjunto de ARNip específico para el gen gi:13124769 redujo la actividad de VKOR en 64%-70% en ocho ensayos separados (Fig. 2).

Un posible motivo de que la actividad de VKOR se inhibiese en sólo ~35% de su actividad inicial tras 72 horas es que la semivida de las proteínas de mamíferos varía enormemente (desde minutos hasta días) (Zhang et al. (1996) "The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells" *J Biol Chem* 271:18825-30; Bohley (1996) "Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins" *Biol Chem* 377:425-35; Dice y Goldberg (1975) "Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins" *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3893-7), y que está inhibiéndose la traducción de ARNm, no la actividad enzimática. Por tanto, las células se mantuvieron durante once días y se siguió su actividad de VKOR. La Figura 3 muestra que el nivel de ARNm para el ARNm de gi:13124769 disminuyó rápidamente hasta alrededor de 20% del normal, mientras que la actividad de VKOR disminuyó de manera continua durante este periodo de tiempo. Esta reducción de la actividad no es un efecto general del ARNip ni el resultado de la muerte celular porque el nivel de actividad de VKD carboxilasa y el ARNm de lamina A/C permanecieron constantes. Además, el nivel de ARNm de gi:132124769 es cuatro veces inferior en células HT-29, que tienen actividad de VKOR baja, que en células A549, que muestran actividad de VKOR alta. Estos datos indican que gi:13124769 corresponde al gen de VKOR.

Ejemplo 10 Identificación del gen que codifica VKOR

El gen, IMAGE 3455200 (gi:13124769, SEC ID NO: 8), que se identifica en el presente documento que codifica VKOR, se mapea en el cromosoma humano 16p11.2, el cromosoma de ratón 7F3 y el cromosoma de rata 1:180.8 Mb. Hay 338 clones de ADNc en la base de datos del NCBI que representan siete patrones de corte y empalme diferentes (programa AceView del NCBI). Éstos están compuestos por todos o parte de dos a cuatro exones. Entre estos, la isoforma más prevalente, mGC11276, tiene tres exones y se expresa a altos niveles en células de hígado y pulmón. Este transcrito de tres exones (SEC ID NO: 9) codifica una proteína pronosticada de 163 aminoácidos con una masa de 18,2 kDa (SEC ID NO: 10). Es una supuesta proteína del retículo endoplasmático N-miristilada con uno a tres dominios transmembránicos, dependiendo del programa usado para el pronóstico. Tiene siete restos de cisteína, lo que concuerda con las observaciones de que la actividad enzimática depende de reactivos de tior (Thijssen et al. (1994) "Microsomal lipoamide reductase provides vitamin K epoxide reductase with reducing equivalents" *Biochem J* 297: 277-80). Cinco de las siete cisteínas se conservan entre seres humanos, ratones, ratas, pez cebra, *Xenopus* y *Anopheles*.

Para confirmar que se había identificado el gen de VKOR, se expresó la forma más prevalente de la enzima (tres exones) en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf9 no presentan actividad de VKOR medible pero muestran actividad sensible a warfarina cuando se transfectan con ADNc de mGC11276 (Figura 4). Se observó

actividad de VKOR a partir de constructos con una etiqueta de epítipo en su término amino o carboxilo. Esta etiqueta debe ayudar en la purificación de VKOR.

VKOR debe mostrar sensibilidad a warfarina, por tanto se prepararon microsomas a partir de células Sf9 que expresaban VKOR y se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad a warfarina. La actividad de VKOR es sensible a warfarina (Figura 5).

En resumen, la presente invención proporciona el primer ejemplo de uso de ARNip en células de mamífero para identificar un gen desconocido. Se confirmó la identidad del gen de VKOR mediante su expresión en células de insecto. El gen de VKOR codifica varias isoformas. Será importante caracterizar la actividad y el patrón de expresión de cada isoforma. Millones de personas en todo el mundo utilizan warfarina para inhibir la coagulación; por tanto, es importante caracterizar adicionalmente VKOR, ya que puede conducir a una dosificación o un diseño más precisos de anticoagulantes más seguros, más eficaces.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como limitativo de la misma. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, incluyéndose en la misma equivalentes de las reivindicaciones.

Tabla 1. Cinco SNPs examinados en el gen de VKOR

SNPs	posición	Cambio de AA	Relación heterocigota
vk563 G>A (SEC ID NO:15)	5'-UTR	N/A	1/58
vk2581 G>C (SEC ID NO:12)	Intrón2	N/A	17/58
vk3294 T>C (SEC ID NO:13)	Intrón2	N/A	25/58
vk4501 C>T (SEC ID NO:16)	Exón3	Leu120Leu	1/58
vk4769 G>A (SEC ID NO:14)	3'-UTR	N/A	19/58

Tabla 2.

SNPs	Secuencia de la sonda VIC	Secuencia de la sonda FAM	Cebador directo	Cebador inverso
vk2681 G>C	TCATCACGGAGCGTC (SEC ID NO:17)	TCATCACCGAGCGTC (SEC ID NO:18)	GGTGATCCACACAGCT GACA (SEC ID NO:19)	CCTGTTAGTTACCTCCC CACATC (SEC ID NO:20)
vk3294 T>C	CCAGGACCATGGTGC (SEC ID NO:21)	CCAGGACCGTGGTGC (SEC ID NO:22)	GCTCCAGAGAAGGCAT CACT (SEC ID NO:23)	GCCAAGTCTGAACCAT GTGTCA (SEC ID NO:24)
vk4769 G>A	ATACCCGCACATGAC (SEC ID NO:25)	CATACCCACACATGAC (SEC ID NO:26)	GTCCCTAGAAGGCCCT AGATGT (SEC ID NO:27)	GTGTGGCACATTTGGT CCATT (SEC ID NO:28)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of North Carolina-Chapel Hill

<120> Métodos y composiciones para la correlación de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen de vitamina K epóxido reductasa y la dosis de warfarina

<130> S3097 EP/3 S3

<150> US 60/505,527

<151> 23-09-2003

<160> 34

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 1
 tccaacagca tattcggttg c 21
 <210> 2
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético
 <400> 2
 10 ttcttgacc ttccggaac t 21
 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético
 <400> 3
 gaaggtgaag gtcggagtc 19
 <210> 4
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético
 25 <400> 4
 gaagatggtg atgggatttc 20
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético
 <400> 5
 ctaggtgagg ccaagaagca a 21
 35 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 6

5 ctgttcctct cagcagactg c 21

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de etiqueta de HPC4

<400> 7

Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu.Ile Asp Gly Lys

1 5 10

<210> 8

15 <211> 3915

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

gggttttctcc gcggggcgcc cggggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctggggggagc 60

cctgggctggg tgcgggctcgc tctttgcctg acgggcttag tgctctcgcct ctacgcgctg 120

cacgtgaagg cggcgcgcgc ccggggaccgg gattaccgcg cgctctgcga cgtgggcacc 180

gccatcagct gttegcgcgt cttctcctcc aggtgtgcac gggagtggga ggcgtggggc 240

ctcggagcag ggcggccagg atgccagatg attattctgg agtctgggat cgggtgtgccc 300

ggggaacgga cacggggctg gactgctcgc ggggtcgttg cacaggggct gagctaccca 360

gcgatactgg tgttcgaaat aagagtgcga ggcaaggac cagacagtgc tggggactgg 420

gattattccg gggactcgca cgtgaattgg atgccaaagga ataacgggtga ccaggaaagg	480
cggggaggca ggatggcggg agagattgac gatggtctca aggacggcgc gcagggtgaag	540
gggggtgttg gcgatggctg cgcccaggaa caagggtggcc cggctctggct gtgcgtgatg	600
gccaggcggt agcataatga cggaatacag aggaggcgag tgagtggcca gggagctgga	660
gattctgggg tccagggcaa agataatctg cccccgactc ccagtctctg atgcaaaacc	720
gagtgaaccg ttataaccagc cttgccattt taagaattac ttaagggccg ggcgcgggtg	780
cccactcctg taatcccagc actttgggag gccgaggcgg atggatcact tgaagtcagg	840
agttgaccag cctggccaac atgggtgaaag cctgtctcta ccaaaaatag aaaaattaat	900
cgggcgctat ggcgggtgcc ttaatcccag ctactcgggg gggctaaggc aggagaatcg	960
cttgaacccg ggaggcggag gtttcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg	1020
ggccagagtg agactccgtc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacttactt	1080
aaggtctaag atgaaaagca gggcctacgg agtagccacg tccgggcctg gtctggggag	1140
aggggaggat agggtcagtg acatggaatc ctgacgtggc caaagggtgc cggtgccagg	1200
agatcatcga cccttggaact aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggc	1260
tcttggaat cacctttctc gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctg	1320
ttccacccca cccacccct ctgccagggt gggcaggggt ttcgggctgg tggagcatgt	1380
gctgggacag gacagcatcc tcaatcaatc caacagcata ttcggttgca tcttctacac	1440
actacagcta ttgttaggtg agtggctccg cccctccct gcccgccccg ccccgccct	1500
catccccctt ggtcagctca gcccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca	1560
gccagctagc tgctcatcac ggagcgtcct gcgggtgggg atgtggggag gtaactaaca	1620
ggagtctttt aattggttta agtactgtta gaggtgaag ggcccttaa gacatcctag	1680
gtccccagggt tttttgtttg ttgttgttt gagacagggt ctggctctgt tgcccaaagt	1740
gaggtctagg atgcccttag tgtgcactgg cgtgatctca gttcatggca acctctgcct	1800
ccctgcccaa gggatcctcc caccttagcc tccaagcag ctggaatcac aggcgtgcac	1860
cactatgccc agctaatttt tgtttttgtt tttttttgtt agagatgggt tctcgccatg	1920
ttgcccaggc tggctcctaa caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt	1980
acaggcgtga gctaccatgc cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt	2040
cctttttaag gagaagctga gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa	2100
aatttgtatc tagtccata agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg	2160
ccccaggcct tgctgatgcc atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag	2220

ES 2 453 895 T3

```

caggctoccca cgctcccttt gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tcaactgaggg 2280
aggcccagca ccatggtcct ggctgacaca tgggtcagac ttggccgatt tatttaagaa 2340
attttattgc tcagaacttt ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc 2400
ttggagggga cctgttgaag ctttcttttt tttttttttt aagaaataat cttgctctgt 2460
tgcccaggct ggagtgcagt ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc 2520
tcctgagtag ctaggactat aggcattgtca ctgcaccag ctaatttttt tttttttttt 2580
tttttttttt ttgcgacata gtctcgctct gtcaccaggc tggagtgcag tggcacgac 2640
ttggctcact gcaacctctg cctcccggtt tcaagcaatt ttcttgctc agcctcctga 2700
gtagctggga ctacaggcgc gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt tttagtggag 2760
acagggtttc accatgttgg ctaggatggt ctcaatctct tgacctggtg atccatccgc 2820
cttggcctcc caaagtgtca ggattacagg cgtgagtcaa cctcacggg catttttttt 2880
ttgagacgaa gtcttgctct tgctgcccc gctggaatgt ggtggcatga tctcggtcca 2940
ctgcaacctc cacctcctag gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg 3000
attacagggtg cccatcaaca caccggcta atttttgtat ttttattaga gatgggggtt 3060
tgccatgttg gccaggctgc tctcgaaact ctaacctcag gtgatccacc cccattggcc 3120
tccaaaata ctgggattac aggcattgag caccgtgccc agctgaattt ctaaattttt 3180
gatagagatc ggtcttttct atgttgcccc agctggtctt gaactcctag cctaaagcag 3240
tcttcccacc tcggcctccc agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc 3300
tggagcctct tgttttagag acccttcccc gcagctcctg gcatctaggt agtgcagtga 3360
catcatggag tgttcgggag gtggccagt cctgaagccc acaccggacc ctcttctgcc 3420
ttgcagggtg cctgcggaca cgctgggcct ctgtcctgat gctgctgagc tccctggtgt 3480
ctctcgctgg ttctgtctac ctggcctgga tcctgttctt cgtgctctat gatttctgca 3540
ttgtttgtat caccacctat gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg 3600
tccaagaacc ccagggcaag gctaagaggc actgagccct caaccaagc caggctgacc 3660
tcatctgctt tgctttggca tgtgagcctt gcctaagggg gcatatctgg gtccctagaa 3720
ggccctagat gtggggcttc tagattaccc cctcctcctg ccataccgcg acatgacaat 3780
ggaccaaata tgccacacgc tcgctctttt ttacaccag tgcctctgac tctgtcccca 3840
tgggctggtc tccaaagctc ttccattgc ccaggaggg aaggttctga gcaataaagt 3900
ttcttagatc aatca 3915

```

<210> 9

<211> 806

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (48) .. (536)

<400> 9

```

ggcacgaggg ttttctccgc gggcgccctcg ggcggaacct ggagata atg ggc agc      56
                                   Met Gly Ser
                                   1

acc tgg ggg agc cct ggc tgg gtg cgg ctc gct ctt tgc ctg acg ggc      104
Thr Trp Gly Ser Pro Gly Trp Val Arg Leu Ala Leu Cys Leu Thr Gly
5                               10                               15

tta gtg ctc tcg ctc tac gcg ctg cac gtg aag gcg gcg cgc gcc cgg      152
Leu Val Leu Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala Ala Arg Ala Arg
20                               25                               30                               35

gac cgg gat tac cgc gcg ctc tgc gac gtg ggc acc gcc atc agc tgt      200
Asp Arg Asp Tyr Arg Ala Leu Cys Asp Val Gly Thr Ala Ile Ser Cys
                               40                               45                               50

tcg cgc gtc ttc tcc tcc agg tgg ggc agg ggt ttc ggg ctg gtg gag      248
Ser Arg Val Phe Ser Ser Arg Trp Gly Arg Gly Phe Gly Leu Val Glu
55                               60                               65

cat gtg ctg gga cag gac agc atc ctc aat caa tcc aac agc ata ttc      296
His Val Leu Gly Gln Asp Ser Ile Leu Asn Gln Ser Asn Ser Ile Phe
70                               75                               80

ggg tgc atc ttc tac aca cta cag cta ttg tta ggt tgc ctg cgg aca      344
Gly Cys Ile Phe Tyr Thr Leu Gln Leu Leu Gly Cys Leu Arg Thr
85                               90                               95

cgc tgg gcc tct gtc ctg atg ctg ctg agc tcc ctg gtg tct ctc gct      392
Arg Trp Ala Ser Val Leu Met Leu Leu Ser Ser Leu Val Ser Leu Ala
100                               105                               110                               115

ggg tct gtc tac ctg gcc tgg atc ctg ttc ttc gtg ctc tat gat ttc      440
Gly Ser Val Tyr Leu Ala Trp Ile Leu Phe Phe Val Leu Tyr Asp Phe
120                               125                               130

tgc att gtt tgt atc acc acc tat gct atc aac gtg agc ctg atg tgg      488
Cys Ile Val Cys Ile Thr Thr Tyr Ala Ile Asn Val Ser Leu Met Trp
135                               140                               145

ctc agt ttc cgg aag gtc caa gaa ccc cag ggc aag gct aag agg cac      536
Leu Ser Phe Arg Lys Val Gln Glu Pro Gln Gly Lys Ala Lys Arg His
150                               155                               160

tgagccctca acccaagcca ggctgacctc atctgctttg ctttggcatg tgagccttgc      596

ctaagggggc atatctgggt ccctagaagg ccctagatgt ggggcttcta gattaccccc      656

tcctcctgcc ataccgcac atgacaatgg accaaatgtg ccacacgctc gctctttttt      716

acaccagtg cctctgactc tgtccccatg ggctgggtctc caaagctctt tccattgccc      776

agggaggggaa ggttctgagc aataaagttt      806

```

<210> 10

<211> 163

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 453 895 T3

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

<210> 11

<211> 5915

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaaagga 60

gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcgggcgcc atgatagtag	120
agaggtttagg atactgtcaa ggggtgtgtgt ggccaaagga gtggttctgt gaatgtatgg	180
gagaaaggga gaccgaccac caggaagcac tggtagaggca ggacccggga ggatgggagg	240
ctgcagcccg aatgggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttggttcc cgaatcggat	300
cgccgtattc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccggatgc tgcaattctt	360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac acactttttt	420
ttttcttttt tttttttgag acagagtctc actctgtcgg cctggctgga gtgcagtggc	480
acgatctcgg ctcaactgcaa cctccggctc cccggctcaa gcaattctcc tgcctcagcc	540
tcccagtagt ctgggattac aggcattgtgc caccacgccc ggctaatttt tgtattttta	600
gttgagatgg ggtttcacca tgttggcgag gctggctctg aactcctgac ctgagtaaat	660
ccgccagcct cgccctccca aagtgtctgg attacaagcg tgagccaccg tgcccggcca	720
acagttttta aatctgtgga gacttcattt cccttgatgc cttgcagccg cgccgactac	780
aactcccatc atgcctggca gccgctgggg ccgcgattcc gcacgtccct taaccgcttc	840
actagtcccg gcattcttcg ctgttttctt aactcgcccg cttgactagc gccctggaac	900
agccatttgg gtcgtggagt gcgagcacgg ccggccaatc gccgagtcag agggccagga	960
ggggcgcggc cattcgccg ccggccctcg ctccgtggct ggttttctcc gcgggcgcct	1020
cgggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctgggggagc cctggctggg tgcggctcgc	1080
tctttgcctg acgggcttag tgctctcgct ctacgcgctg cacgtgaagg cggcgcgcgc	1140
ccgggaccgg gattaccgcg cgctctcgca cgtgggcacc gccatcagct gtctcgcgct	1200
cttctcctcc aggtgtgcac gggagtggga ggcgtggggc ctccgagcag ggcggccagg	1260
atgccagatg attattctgg agtctgggat cgggtgtgcc ggggaacgga cacgggctg	1320
gactgctcgc ggggtcgttg cacaggggct gagctacca gcgatactgg tgttcgaaat	1380
aagagtgcga ggcaaggac cagacagtgc tggggactgg gattattccg gggactcgca	1440
cgtgaattgg atgccaagga ataacggtga ccaggaaagg cggggaggca ggatggcgg	1500
agagattgac gatggtctca aggacggcgc gcagggtgaag gggggtgttg gcgatggctg	1560
cgcccaggaa caaggtggcc cggctctggct gtgcgtgatg gccaggcggt agcataatga	1620
cggaatacag aggaggcgag tgagtggcca gggagctgga gattctgggg tccagggcaa	1680
agataatctg ccccgactc ccagtctctg atgcaaaacc gagtgaaccg ttataccagc	1740
cttgccattt taagaattac ttaagggccg ggcgcggtgg ccactcctg taatcccagc	1800
actttgggag gccgaggcgg atggatcact tgaagtcagg agttgaccag cctggccaac	1860

atggtgaaag cctgtctcta ccaaaaatag aaaaattaat cgggcgctat ggcgggtgcc 1920
 ttaatcccag ctactcgggg gggctaaggc aggagaatcg cttgaacccg ggaggcggag 1980
 gtttcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg ggccagagtg agactccgtc 2040
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacttactt aaggtctaag atgaaaagca 2100
 gggcctacgg agtagccacg tccgggcctg gtctggggag aggggaggat agggtcagtg 2160
 acatggaatc ctgacgtggc caaagggtgcc cggtgccagg agatcatcga cccttggact 2220
 aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggt tcttggaat cacccttctc 2280
 gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctgg tccacccca cccacccct 2340
 ctgccagggtg gggcaggggt ttcgggctgg tggagcatgt gctgggacag gacagcatcc 2400
 tcaatcaatc caacagcata ttcggttgca tcttctacac actacagcta ttgttaggtg 2460
 agtggctccg cccctccct gcccgcccg ccccgccct catccccctt ggtcagctca 2520
 gcccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca gccagctagc tgcctcatcac 2580
 ggagcgtcct gcggtgggg atgtggggag gtaactaaca ggagtctttt aattggttta 2640
 agtactgtta gaggtgaag ggcccttaa gacatcctag gtccccaggt tttttgtttg 2700
 ttgttgttt gagacagggt ctggctctgt tgcccaaagt gaggtctagg atgcccttag 2760
 tgtgactgg cgtgatctca gttcatggca acctctgcct ccctgcccga gggatcctcc 2820
 caccctagcc tcccgaagcag ctggaatcac aggcgtgcac cactatgccc agctaatttt 2880
 tgtttttgt tttttttgt agagatggtg tctcgccatg ttgccaggc tgggtctcaag 2940
 caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt acaggcgtga gctaccatgc 3000
 cccaccaaca cccagtttt ttggaaaaga tgccgaaatt cctttttaag gagaagctga 3060
 gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgatc tagtcccata 3120
 agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg cccaggcct tgctgatgcc 3180
 atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag caggctccca cgctcccttt 3240
 gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tcaactgagg aggccagca ccatggtcct 3300
 ggctgacaca tgggtcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt 3360
 ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag 3420
 ccttcttttt ttttttttt aagaaataat ctgtctctgt tgcccaggct ggagtgcagt 3480
 ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tctgagtag ctaggactat 3540
 aggcagtca ctgcaccag ctaatttttt ttttttttt ttttttttt ttgcgacata 3600
 gtctcgctct gtcaccaggc tggagtgcag tggcacgac ttggctcact gcaacctctg 3660
 cctcccggt tcaagcaatt tctctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc 3720

gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt tttagtggag acagggtttc accatgttgg 3780
ctaggatggg ctcaatctct tgacctgggtg atccatccgc cttggcctcc caaagtgcta 3840
ggattacagg cgtgagtcac cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgctct 3900
tgctgcccaa gctggaatgt ggtggcatga tctcggctca ctgcaacctc cacctcctag 3960
gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg attacagggtg cccatcaaca 4020
caccgggcta atttttgtat ttttattaga gatgggggtt tgccatgttg gccaggctgc 4080
tctcgaactc ctaacctcag gtgatccacc cccattggcc tcccaaaata ctgggattac 4140
aggcatgagc caccgtgccc agctgaattt cttaaatttt gatagagatc gggctcttct 4200
atgttgccca agctgggtct gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tcggcctccc 4260
agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag 4320
acccttccca gcagctcctg gcatctaggt agtgagtgat catcatggag tgttcgggag 4380
gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctctctgccc ttgcagggtg cctgcggaca 4440
cgctgggcct ctgtcctgat gctgctgagc tccctgggtg ctctcgctgg ttctgtctac 4500
ctggcctgga tcctgttctt cgtgctctat gatctctgca ttgtttgtat caccacctat 4560
gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggaag 4620
gctaagaggc actgagccct caaccaagc caggctgacc tcctctgctt tgctttggca 4680
tgtgagcctt gcctaagggg gcatactctg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc 4740
tagattacc cctcctcctg ccataccgc acatgacaat ggaccaaagtg tgccacacgc 4800
tcgctctttt ttacaccag tgcctctgac tctgtccca tgggctggtc tccaaagctc 4860
tttccattgc ccaggggagg aaggttctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa 4920
gtctgaacca tgtgtctgac atggactgtg gtgctgggccc tccctcggtg ttgccttctc 4980
tggagctggg aagggtgagt cagagggaga gtggagggcc tgctgggaag ggtgggtatg 5040
ggtagtctca tctccagtgt gtggagtcag caaggcctgg ggcaccattg gccccaccc 5100
ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgccacagg agccaggcct cctctcctgg 5160
gaaggctgag cacacacctg gaagggcagg ctgcccttct ggttctgtaa atgcttgctg 5220
ggaagtctt ccttgagttt aactttaacc cctccagttg ccttatcgac cattccaagc 5280
cagtattggt agccttggag ggtcagggcc aggttgtgaa ggtttttgtt ttgcctatta 5340
tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttggtgtg gcagggtgca 5400
gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc 5460
caggagtcc agaccagcct gggcaaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa 5520
aaaaaaaaa ttagccaggc atggtgggtg atgtacctat agtcccaact aatcggaag 5580
ctggcgggaa gactgctga gccagaagg ttgaggctgc agtgagccat gatcactgca 5640
ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaaaa 5700
ttgtgttaac gtgttaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggt ggtactatta 5760
ttatccctat cttgatgata gggacagagt ggctaattag tatgcctgag atcacacagc 5820
tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctgggtcca tctgggtcca gcatctatat 5880
gctttttttt ttgttggttt gtttttgaga cggac 5915

ES 2 453 895 T3

<210> 12

<211> 5915

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 12

```

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaagga      60
gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcgggcgcc atgatagtag      120
agaggttagg atactgtcaa ggggtgtgtgt ggccaaagga gtggttctgt gaatgtatgg      180
gagaaaggga gaccgaccac caggaagcac tggtgaggca ggacccggga ggatgggagg      240
ctgcagcccg aatgggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttggttcc cgaatcggat      300
cgccgtattc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccggatgc tgcaattctt      360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac acactttttt      420
ttttcttttt tttttttgag acagagtctc actctgtcgg cctggctgga gtgcagtggc      480
acgatctcgg ctcaactgcaa cctccggtc cccggctcaa gcaattctcc tgccctcagc      540
tcccagtag ctgggattac aggcattgtc caccacgccc ggctaatttt tgtattttta      600
gttgagatgg ggtttcacca tgttggcgag gctggctctg aactcctgac ctcaggtaat      660
ccgccagcct cggcctccca aagtgtctgg attacaagcg tgagccaccg tgcccgcca      720
acagttttta aatctgtgga gacttcattt cccttgatgc cttgcagccg cgccgactac      780
aactcccatc atgcctggca gccgctgggg ccgcgattcc gcacgtccct taccgcttc      840
actagtcccg gcattcttcg ctgttttcct aactcgcccg cttgactagc gccctggaac      900
agccatttgg gtcgtggagt gcgagcacgg ccggccaatc gccgagtcag agggccagga      960
ggggcgcggc cattcgccgc ccggcccctg ctccgtggct ggttttctcc gcgggcgcct     1020
cgggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctgggggagc cctggctggg tgcggtcgc      1080
tctttgcctg acgggcttag tgctctcgt ctacgcgctg cacgtgaagg cggcgcgcg      1140
ccgggaccgg gattaccgcg cgctctgcca cgtgggcacc gccatcagct gttcgcgcgt     1200

```

ES 2 453 895 T3

cttctcctcc aggtgtgcac gggagtggga ggcgtggggc ctccggagcag ggcggccagg 1260
 atgccagatg attattctgg agtctgggat cgggtgtccc ggggaacgga cacggggctg 1320
 gactgctcgc ggggtcgttg cacaggggct gagctaccca gcgatactgg tgttcgaaat 1380
 aagagtgcga ggcaaggac cagacagtgc tggggactgg gattattccg gggactcgca 1440
 cgtgaattgg atgccaagga ataacggtga ccaggaaagg cggggaggca ggatggcggt 1500
 agagattgac gatggtctca aggacggcgc gcagggaag ggggtgttg gcgatggctg 1560
 cgcccaggaa caagggtggc cgggtctggc gtgcgtgatg gccaggcgtt agcataatga 1620
 cggaatacag aggaggcgag tgagtggcca gggagctgga gattctgggg tccagggcaa 1680
 agataatctg ccccgactc ccagtctctg atgcaaaacc gagtgaaccg ttataccagc 1740
 cttgccattt taagaattac ttaagggcgc ggcgcggtgg cccactcctg taatccagc 1800
 actttgggag gccgaggcgg atggatcact tgaagtcagg agttgaccag cctggccaac 1860
 atggtgaaag cctgtctcta ccaaaaatag aaaaattaat cgggcgctat ggcgggtgcc 1920
 ttaatcccag ctactcgggg gggctaaggc aggagaatcg cttgaaccgc ggaggcggag 1980
 gtttcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg ggccagagtg agactccgtc 2040
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacttactt aaggtctaag atgaaaagca 2100
 gggcctacgg agtagccacg tccgggcctg gtctggggag aggggaggat agggtcagtg 2160
 acatggaatc ctgacgtggc caaagggtgc cgggtgccagg agatcatcga cccttgact 2220
 aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggt tcttggaat cacctttctc 2280
 gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctgg tccacccca cccacccct 2340
 ctgccaggtg gggcaggggt ttcgggctgg tggagcatgt gctgggacag gacagcatcc 2400
 tcaatcaatc caacagcata ttcggttgca tcttctacac actacagcta ttgttaggtg 2460
 agtggctccg cccctccct gcccgccccg ccccgccct catccccctt ggtcagctca 2520
 gccccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca gccagctagc tgctcatcac 2580
 cgagcgtcct gcggtgggg atgtggggag gtaactaaca ggagtctttt aattggttta 2640
 agtactgtta gaggtgaag ggccttaaa gacatcctag gtccccagg tttttgttg 2700
 ttgttgtttt gagacagggt ctggctctgt tgcccaaagt gaggtctagg atgcccttag 2760
 tgtgcactgg cgtgatctca gtcatggca acctctgcct cctgcccga gggatcctcc 2820
 caccttagcc tccaagcag ctggaatcac aggcgtgcac cactatgcc agctaatttt 2880
 tgtttttgtt tttttttgt agagatggtg tctcgccatg ttgccaggc tggctcaag 2940
 caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt acaggcgtga gctaccatgc 3000
 cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt cctttttaag gagaagctga 3060

gcatgageta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgtatc tagtcccata 3120
 agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg ccccaggcct tgctgatgcc 3180
 atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag caggctccca cgctcccttt 3240
 gagtccacct tcccagctcc agagaaggca tcaactgaggg agggccagca ccatggctct 3300
 ggctgacaca tggttcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt 3360
 ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag 3420
 ccttcttttt tttttttttt aagaaataat ctgtctctgt tgcccaggct ggagtgcagt 3480
 ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tcctgagtag ctaggactat 3540
 aggcattgtca ctgcacccag ctaatttttt tttttttttt tttttttttt ttgcgacata 3600
 gtctcgctct gtcaccaggc tggagtgcag tggcacgac ttggctcact gcaacctctg 3660
 cctcccggtg tcaagcaatt ttctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc 3720
 gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt tttagtggag acagggtttc accatgttgg 3780
 ctaggatggt ctcaatctct tgacctggtg atccatccgc cttggcctcc caaagtgtca 3840
 ggattacagg cgtgagtcaa cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgcctc 3900
 tgctgccccaa gctggaatgt ggtggcatga tctcggctca ctgcaacctc cacctcctag 3960
 gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg attacagggt gccatcaaca 4020
 caccgggcta atttttgtat ttttattaga gatggggttt tgccatgttg gccaggctgc 4080
 tctcgaactc ctaacctcag gtgatccacc ccatctggcc tcccaaaata ctgggattac 4140
 aggcattgag caccgtgccc agctgaattt ctaaattttt gatagagatc gggctcttct 4200
 atgttgecca agctggctct gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tcggcctccc 4260
 agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag 4320
 acccttccca gcagctcctg gcatctaggt agtgcagtga catcatggag tgttcgggag 4380
 gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctcttctgcc ttgcagggtg cctgcggaca 4440
 cgctgggcct ctgtcctgat gctgctgagc tccctgggtg ctctcgctgg ttctgtctac 4500
 ctggcctgga tcctgttctt cgtgctctat gatttctgca ttgtttgtat caccacctat 4560
 gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggaag 4620
 gctaagaggc actgagccct caaccaagc caggctgacc tcactctgct tgccttggca 4680
 tgtgagcctt gcctaagggg gcatatctgg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc 4740
 tagattaccc cctcctcctg ccatacccg ccatgacaat ggaccaaag tgccacacgc 4800
 tcgctctttt ttacaccag tgctctgac tctgtccca tgggctgggc tccaaagctc 4860

ES 2 453 895 T3

```

tttccattgc ccagggaggg aaggttctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa 4920
gtctgaacca tgtgtctgcc atggactgtg gtgctgggcc tccctcgggtg ttgccttctc 4980
tggagctggg aagggtgagt cagagggaga gtggagggcc tgctgggaag ggtgggttatg 5040
ggtagtctca tctccagtgt gtggagtcag caaggcctgg ggcaccattg gccccaccc 5100
ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgccacagg agccaggcct cctctcctgg 5160
gaaggctgag cacacacctg gaagggcagg ctgcccttct ggttctgtaa atgcttgctg 5220
ggaagtctct ccttgagttt aactttaacc cctccagttg ccttatcgac cattccaagc 5280
cagtattggt agccttgagg ggtcagggcc aggttgtgaa ggtttttgtt ttgcctatta 5340
tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttggtgtg gcagggtgca 5400
gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc 5460
caggagtcc agaccagcct gggcaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa 5520
aaaaaaaaaa ttagccaggc atgggtggtg atgtacctat agtcccaact aatcggaag 5580
ctggcgggaa gactgcttga gccagaagg ttgaggctgc agtgagccat gatcactgca 5640
ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaac 5700
ttgtgttaac gtgttaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggtg ggtactatta 5760
ttatccctat cttgatgata gggacagagt ggctaattag tatgcctgag atcacacagc 5820
tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctgggtcca tctggctcca gcatctatat 5880
gctttttttt ttgttggttt gtttttgaga cggac 5915

```

<210> 13

<211> 5915

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaagga 60
gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcggggcgc atgatatgag 120
agaggttagg atactgtcaa ggggtgtgtg ggccaaagga gtggttctgt gaatgtatgg 180
gagaaagggg gaccgaccac caggaagcac tggtagaggc ggaccggga ggatgggagg 240
ctgcagcccg aatgggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttggttcc cgaatcggat 300
cgccgtattc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccgatgc tgcaattctt 360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac acactttttt 420
ttttcttttt tttttttgag acagagtctc actctgtcgg cctggctgga gtgcagtggc 480
acgatctcgg ctcactgcaa cctccggctc cccggctcaa gcaattctcc tgctcagcc 540

```

tccccgagtag ctgggattac aggcattgtgc caccacgccc ggctaatttt tgtattttta	600
gttgagatgg gggtttacca tgttggcgag gctgggtcttg aactcctgac ctcaggtaat	660
ccgccagcct cggcctccca aagtgtctggg attacaagcg tgagccaccg tgccccgcca	720
acagttttta aatctgtgga gacttcattt cccttgatgc cttgcagccg cgccgactac	780
aactcccate atgcctggca gccgctgggg ccgcgattcc gcacgtccct taccgcttc	840
actagtcctc gcattcttcg ctgttttctt aactcgcccg cttgactagc gccctggaac	900
agccatttgg gtcgtggagt gcgagcacgg ccggccaatc gccgagtcag agggccagga	960
ggggcgcggc cattcgccgc ccggccccctg ctccgtggct gggtttcttc gcgggcgcct	1020
cgggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctgggggagc cctggctggg tgcggctcgc	1080
tctttgcctg acgggcttag tgctctcgct ctacgcgtg cacgtgaagg cggcgcgcg	1140
ccgggacccg gattaccgcg cgctctgcga cgtgggcacc gccatcagct gtccgcgcgt	1200
cttctcctcc aggtgtgcac gggagtggga ggcgtggggc ctccgagcag ggcggccagg	1260
atgccagatg attattctgg agtctgggat cgggtgtgcc ggggaacgga cacggggctg	1320
gactgctcgc ggggtcgttg cacaggggct gagctacca gcgatactgg tgttcgaaat	1380
aagagtgcga ggcaaggac cagacagtgc tggggactgg gattattccg gggactcgca	1440
cgtgaattgg atgccaagga ataacggtga ccaggaaagg cggggaggca ggatggcgg	1500
agagattgac gatggtctca aggacggcgc gcagggtgaag gggggtgttg gcgatggctg	1560
cgcccaggaa caaggtggcc cggctctggct gtgcgtgatg gccaggcggt agcataatga	1620
cgggaatacag aggaggcgag tgagtggcca gggagctgga gattctgggg tccagggcaa	1680
agataatctg cccccgactc ccagtctctg atgcaaaacc gagtgaaccg ttataccagc	1740
cttgccattt taagaattac ttaagggccg ggcgcggtgg ccactcctg taatccagc	1800
actttgggag gccgaggcgg atggatcact tgaagtcagg agttgaccag cctggccaac	1860
atggtgaaag cctgtctcta caaaaaatag aaaaattaat cgggcgctat ggcgggtgcc	1920
ttaatccag ctactcgggg gggctaaggc aggagaatcg cttgaaccg ggaggcggag	1980
gtttcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg ggccagagt agactccgtc	2040
tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacttactt aaggtctaag atgaaaagca	2100
gggcctacgg agtagccacg tccgggcctg gtctggggag aggggaggat agggtcagt	2160
acatggaatc ctgacgtggc caaagggtgcc cgggtgccagg agatcatcga cccttggaact	2220
aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggct tcttggaat cacctttctc	2280
gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctgg ttccacccca cccacccct	2340
ctgccagggt gggcagggtt ttcgggctgg tggagcatgt gctgggacag gacagcatcc	2400

ES 2 453 895 T3

tcaatcaatc caacagcata ttcggttgca ttttctacac actacagcta ttgttaggtg	2460
agtggctccg cccctccct gcccgccccg ccccgccct catccccctt ggtcagctca	2520
gccccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca gccagctagc tgctcatcac	2580
ggagcgtcct gcgggtgggg atgtggggag gtaactaaca ggagtcctttt aattggttta	2640
agtactgtta gaggtgaag ggccttaaa gacatcctag gtccccaggt tttttgtttg	2700
ttgttgtttt gagacaggt ctggtctgt tgcctaaagt gaggtctagg atgcccttag	2760
tgtgcaactgg cgtgatctca gttcatggca acctctgcct ccctgccccaa gggatccctcc	2820
caccttagcc tcccaagcag ctggaatcac aggcgtgcac cactatgccc agctaatttt	2880
tgtttttgtt ttttttgtt agagatgggt tctcgccatg ttgcccaggc tggctcaag	2940
caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt acaggcgtga gctaccatgc	3000
cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt cctttttaag gagaagctga	3060
gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgtatc tagtccata	3120
agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg cccaggcct tgctgatgcc	3180
atatgccgga gatgagacta tccattacca ccctccag caggctccca cgctcccttt	3240
gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tcaactgagg aggccagca ccacggtcct	3300
ggctgacaca tggttcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt	3360
ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag	3420
cctctctttt tttttttttt aagaaataat cttgctctgt tgcccaggct ggagtgcagt	3480
ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tctgagtag ctaggactat	3540
aggcatgtca ctgcaccag ctaatttttt tttttttttt tttttttttt ttgcgacata	3600
gtctcgctct gtcaccaggc tggagtgcag tggcacgac ttggctcact gcaacctctg	3660
cctccgggt tcaagcaatt ttctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc	3720
gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt tttagtggag acagggtttc accatgttgg	3780
ctaggatggt ctcaatctct tgacctggtg atccatccgc cttggcctcc caaagtgcta	3840
ggattacagg cgtgagctaa cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgctct	3900
tgctgccccaa gctggaatgt ggtggcatga tctcggtca ctgcaacctc cacctcctag	3960
gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg attacagtg cccatcaaca	4020
cacccggtta atttttgtat ttttattaga gatggggttt tgccatgttg gccaggctgc	4080
tctcgaactc ctaacctcag gtgatccacc ccattggcc tcccaaaata ctgggattac	4140
aggcatgagc caccgtgccc agctgaattt ctaaattttt gatagagatc gggctcttct	4200

atgttgccca agctggctct gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tgggcctccc 4260
 agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag 4320
 acccttccca gcagctcctg gcatctaggt agtgacgtga catcatggag tgttcgggag 4380
 gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctcttctgcc ttgcaggttg cctgcggaca 4440
 cgctgggcct ctgtcctgat gctgctgagc tccctgggtg ctctcgttg ttctgtctac 4500
 ctggcctgga tctgttctt cgtgctctat gatttctgca ttgtttgtat caccacctat 4560
 gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggcaag 4620
 gctaagaggc actgagccct caacccaagc caggetgacc tcatctgctt tgccttgcca 4680
 tgtgagcctt gcctaagggg gcatatctgg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc 4740
 tagattaccc cctcctcctg ccataccgc acatgacaat ggaccaaag tgccacacgc 4800
 tcgctctttt ttacaccagc tgcctctgac tctgtcccca tgggctgggc tccaaagctc 4860
 ttccattgc ccagggaggg aaggctctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa 4920
 gtctgaacca tgtgtctgcc atggactgtg gtgctgggcc tccctcgggtg ttgccttctc 4980
 tggagctggg aagggtgagt cagagggaga gtggagggcc tgctgggaag ggtggttatg 5040
 ggtagtctca tctccagtgt gtggagtcag caaggcctgg ggcaccattg gccccaccc 5100
 ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgccacagc agccaggcct cctctcctgg 5160
 gaaggctgag cacacacctg gaaggcagg ctgcccttct ggttctgtaa atgettgtg 5220
 ggaagtctt ccttgagttt aactttaacc cctccagttg ccttatcgac cattccaagc 5280
 cagtattggt agccttgag ggtcagggcc aggttgtgaa ggtttttgtt ttgcctatta 5340
 tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttgtgttg gcagggtgca 5400
 gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc 5460
 caggagttcc agaccagcct gggcaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa 5520
 aaaaaaaaaa ttagccaggc atggtggtgt atgtacctat agtcccaact aatcggaag 5580
 ctggcgggaa gactgcttga gccagaagg ttgaggtgc agtgagccat gatcactgca 5640
 ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaac 5700
 ttgtgttaac gtgttaaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggt ggtactatta 5760
 ttatccctat cttgatgata gggacagagt ggctaattag tatgctgag atcacacagc 5820
 tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctgggtcca tctgggtcca gcatctatat 5880
 gctttttttt ttgttggttt gtttttgaga cggac 5915

<210> 14

<211> 5915

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaagga	60
gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcgggcgcc atgatagtag	120
agaggttagg atactgtcaa ggggtgtgtgt ggccaaagga gtggttctgt gaatgtatgg	180
gagaaagggg gaccgaccac caggaagcac tgggtaggca ggaccggga ggatgggagg	240
ctgcagcccg aatggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttggttcc cgaatcggat	300
cgccgtatcc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccggatgc tgcaattctt	360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac acactttttt	420
ttttcttttt tttttttgag acagagtctc actctgtcgg cctggctgga gtgcagtggc	480
acgatctcgg ctcaactgcaa cctccggctc ccgggtcaa gcaattctcc tgccctcagcc	540
tcccagtag ctgggattac aggcattgtc caccacgccc ggctaatttt tgtattttta	600
gttgagatgg ggtttcacca tgttggcgag gctggctctg aactcctgac ctccaggaat	660
ccgccagcct cggcctccca aagtgtctgg attacaagcg tgagccaccg tgcccggcca	720
acagttttta aatctgtgga gacttcattt cccttgatgc cttgcagccg cgccgactac	780
aactcccatc atgcctggca gccgtgagg ccggcatcc gcacgtccct taccgcttc	840
actagtccecg gcattcttcg ctgttttcc aactcgcccg cttgactagc gccctggaac	900
agccatttgg gtcgtggagt gcgagcacgg ccggccaatc gccgagtcag agggccagga	960
ggggcgcggc cattcgccgc ccggcccctg ctccgtggct ggttttctcc gggggcgcc	1020
cgggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctgggggagc cctggctggg tgccgctcgc	1080
tctttgcctg acgggcttag tgctctcgct ctacgcgctg cacgtgaagg cggcgcgcg	1140
ccgggaccgg gattaccgcg cgctctcgca cgtgggcacc gccatcagct gttcgcgct	1200
cttctcctcc aggtgtgcac gggagtggga ggcgtggggc ctccggagcag ggcggccagg	1260
atgccagatg attattctgg agtctgggat cgggtgtgcc ggggaacgga cacggggctg	1320
gactgctcgc ggggtcgttg cacaggggct gagctaccca gcgatactgg tgttcgaaat	1380
aagagtgcga ggcaaggga cagacagtgc tggggactgg gattattccg gggactcgca	1440
cgtgaattgg atgccaagga ataacggtga ccaggaaagg cggggaggca ggatggcggt	1500
agagattgac gatggtctca aggacggcgc gcaggtgaag gggggtgttg gcgatggctg	1560
cggccaggaa caaggtggcc cggctctggct gtgcgtgatg gccaggcggt agcataatga	1620
cggataacag aggaggcgag tgagtggcca gggagctgga gattctgggg tccagggcaa	1680
agataatctg ccccgactc ccagttcttg atgcaaaacc gagtgaaccg ttataccagc	1740

ES 2 453 895 T3

cttgccattt taagaattac ttaagggccg ggcgcggtgg cccactcctg taatcccagc	1800
actttgggag gccgaggcgg atggatcact tgaagtcagg agttgaccag cctggccaac	1860
atggtgaaag cctgtctcta ccaaaaatag aaaaattaat cgggcgctat ggcgggtgcc	1920
ttaatcccag ctactcgggg gggctaaggc aggagaatcg cttgaacccg ggaggcggag	1980
gtttcagtga gccgagatcg cgccactgca ctccagcctg ggccagagtg agactccgtc	2040
tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacttactt aaggtctaag atgaaaagca	2100
gggcctacgg agtagccacg tccgggcctg gtctggggag aggggaggat agggtcagtg	2160
acatggaatc ctgacgtggc caaagggtgcc cggtgccagg agatcatcga cccttggact	2220
aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggc tcttggaat cacctttctc	2280
gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctgg tccacccca cccacccct	2340
ctgccagggtg ggcagggggt ttcgggctgg tggagcatgt gctgggacag gacagcatcc	2400
tcaatcaatc caacagcata ttcggttgca tcttctacac actacagcta ttgttaggtg	2460
agtggctccg cccctccctt gcccgcccg ccccgccct catccccctt ggtcagctca	2520
gccccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca gccagctagc tgctcatcac	2580
ggagcgtcct gcgggtgggg atgtggggag gtaactaaca ggagtctttt aattggttta	2640
agtactgtta gaggtgaag ggcccttaa gacatcctag gtccccaggt tttttgttg	2700
ttgttgtttt gagacagggt ctggctctgt tgcccaaagt gaggtctagg atgcccttag	2760
tgtgcactgg cgtgatctca gttcatggca acctctgcct ccctgcccaa gggatcctcc	2820
caccttagcc tccaagcag ctggaatcac aggcgtgca cactatgcc agctaatttt	2880
tgtttttgtt ttttttgtt agagatgggt tctcgccatg ttgcccaggc tggctctcaag	2940
caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt acaggcgtga gctaccatgc	3000
cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt cctttttaag gagaagctga	3060
gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgatc tagtcccata	3120
agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg cccaggcct tgctgatgcc	3180
atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag caggctccca cgctcccttt	3240
gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tcaactgagg agggccagca ccatggctct	3300
ggctgacaca tggttcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt	3360
ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag	3420
ccttcttttt tttttttttt aagaaataat cttgctctgt tgcccaggct ggagtgcagt	3480
ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tcctgagtag ctaggactat	3540

aggcattgtca ctgcacccag ctaatttttt tttttttttt tttttttttt ttgcgacata 3600
 gtctcgctct gtcaccaggg tggagtgcag tggcacgac ttggctcact gcaacctctg 3660
 cctcccgggt tcaagcaatt ttctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc 3720
 gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt ttttagtgag acaggggttc accatgttgg 3780
 ctaggatggg ctcaatctct tgacctgtg atccatccgc ctggcctcc caaagtgtca 3840
 ggattacagg cgtgagtcaa cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgctct 3900
 tgctgcccga gctggaatgt ggtggcatga tctcggtca ctgcaacctc cacctcctag 3960
 gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg attacagtg cccatcaaca 4020
 caccgggcta atttttgtat ttttattaga gatgggggtt tgccatgttg gccaggctgc 4080
 tctcgaactc ctaacctcag gtgateccac cccattggcc tcccaaaata ctgggattac 4140
 aggcattgag caccgtgccc agctgaattt ctaaattttt gatagagac gggctcttct 4200
 atgttgccca agctggctct gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tggcctccc 4260
 agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag 4320
 acccttccca gcagctcctg gcatctaggt agtgcagtga catcatggag tgttcgggag 4380
 gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctcttctgcc ttgcaggttg cctgcggaca 4440
 cgctgggcct ctgtcctgat gctgctgagc tccctggtgt ctctcgctgg ttctgtctac 4500
 ctggcctgga tctgttctt cgtgctctat gatttctgca ttgtttgtat caccacctat 4560
 gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggcaag 4620
 gctaagaggc actgagccct caacccaagc caggtcgacc tcatctgctt tgctttggca 4680
 tgtgagcctt gcctaagggg gcatatctgg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc 4740
 tagattaccc cctcctcctg ccataccac acatgacaat ggaccaaagtg tgccacacgc 4800
 tcgctctttt ttacaccag tgctctgac tctgtccca tgggctgggt tccaaagctc 4860
 tttccattgc ccagggaggg aagggtctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa 4920
 gtctgaacca tgtgtctgcc atggactgtg gtgctgggccc tccctcggtg ttgccttctc 4980
 tggagctggg aagggtagt cagagggaga gtggagggcc tgctgggaag ggtggttatg 5040
 ggtagtctca tctccagtgt gtggagtcat caaggcctgg ggcaccattg gccccaccc 5100
 ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgccacagg agccaggcct cctctcctgg 5160
 gaaggctgag cacacacctg gaagggcagg ctgccttct ggttctgtaa atgcttgctg 5220
 ggaagttctt ccttgagttt aactttaacc cctccagttg ccttatcgac cattccaagc 5280
 cagtattggg agccttggag ggtcagggcc aggttgtgaa ggtttttgtt ttgcctatta 5340
 tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttggtgtg gcaggggtgca 5400

gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc 5460
caggagtccc agaccagcct gggcaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa 5520
aaaaaaaaa ttagccaggc atggtggtgt atgtacctat agtcccaact aatcggaag 5580
ctggcgggaa gactgcttga gcccagaagg ttgaggctgc agtgagccat gatcactgca 5640
ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaaaac 5700
ttgtgttaac gtgttaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggtg ggtactatta 5760
ttatccctat cttgatgata gggacagagt ggctaattag tatgcctgag atcacacagc 5820
tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctgggtcca tctgggtcca gcatctatat 5880
gctttttttt ttgttggttt gtttttgaga cggac 5915

<210> 15

<211> 5915

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaagga 60
gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcgggcgcc atgatatag 120
agaggttagg atactgtcaa ggggtgtgtgt ggccaaagga gtggttctgt gaatgtatgg 180
gagaaaggga gaccgaccac caggaagcac tggtagagca ggacccggga ggatgggagg 240
ctgcagcccg aatgggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttggttcc cgaatcggat 300
cgccgtattc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccggatgc tgcaattctt 360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac aactttttt 420
ttttcttttt tttttttgag acagagtctc actctgtcgg cctggctgga gtgcagtggc 480
acgatctcgg ctcaactgcaa cctccggctc ccgggtcaa gcaattctcc tgcctcagcc 540
tcccagtag ctgggattac agacatgtgc caccacgccc ggctaatttt tgtattttta 600
gttgagatgg ggtttcacca tgttggcgag gctgggtctg aactcctgac ctcaggtaat 660
ccgccagcct cggcctccca aagtgtggg attacaagcg tgagccaccg tgcccggcca 720
acagttttta aatctgtgga gacttcattt cccttgatgc cttgcagccg cgccgactac 780
aactccatc atgcctggca gccgctgggg ccgcatctcc gcacgtccct taccgcttc 840
actagtcccg gcattcttcg ctgttttctt aactcgcccg cttgactagc gccctggaac 900
agccatttgg gtcgtggagt gcgagcacgg ccggccaatc gccgagtcag agggccagga 960
ggggcgcggc cattcgccgc ccggcccctg ctccgtgget ggttttctcc gcgggcgcc 1020
cgggcggaac ctggagataa tgggcagcac ctgggggagc cctggctggg tgcggctcgc 1080

tctttgcttg	acgggcttag	tgctctcgt	ctacgcgctg	cacgtgaagg	cggcgcgcgc	1140
ccgggaccgg	gattaccgcg	cgctctgcga	cgtgggcacc	gccatcagct	gttcgcgcgt	1200
cttctcctcc	aggtgtgcac	gggagtggga	ggcgtggggc	ctcggagcag	ggcggccagg	1260
atgccagatg	attattcttg	agtctgggat	cgggtgtgcc	ggggaacgga	cacggggctg	1320
gactgctcgc	ggggctcgtg	cacaggggct	gagctacca	gcgatactgg	tggtcgaaat	1380
aagagtgcga	ggcaagggac	cagacagtgc	tggggactgg	gattattccg	gggactcgca	1440
cgtgaattgg	atgccaaagg	ataacggtga	ccaggaaagg	cggggaggca	ggatggcggt	1500
agagattgac	gatgggtctca	aggacggcgc	gcagggtgaag	gggggtgttg	gcgatggctg	1560
cgcccaggaa	caagggtggc	cggctctggc	gtgcgtgatg	gccaggcggt	agcataatga	1620
cggaatacag	aggaggcgag	tgagtggcca	gggagctgga	gattctgggg	tccagggcaa	1680
agataatctg	ccccgactc	ccagtctctg	atgcaaaacc	gagtgaaccg	ttataccagc	1740
cttgccattt	taagaattac	ttaagggccg	ggcgcgggtg	cccactcctg	taatcccagc	1800
actttgggag	gccgaggcgg	atggatcact	tgaagtcagg	agttgaccag	cctggccaac	1860
atggtgaaag	cctgtctcta	ccaaaaatag	aaaaattaat	cgggcgctat	ggcgggtgcc	1920
ttaatcccag	ctactcgggg	gggctaaggc	aggagaatcg	cttgaaccgg	ggaggcggag	1980
gtttcagtga	gccgagatcg	cgccactgca	ctccagcctg	ggccagagtg	agactccgtc	2040
tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	agacttactt	aagggtctaag	atgaaaagca	2100
gggcctacgg	agtagccacg	tccgggcctg	gtctggggag	aggggaggat	agggtcagtg	2160
acatggaatc	ctgacgtggc	caaagggtgcc	cgggtgccagg	agatcatcga	cccttggaact	2220
aggatgggag	gtcgggggaa	agaggatagc	ccagggtggc	tcttggaat	cacctttctc	2280
gggcagggtc	caaggcactg	ggttgacagt	cctaacctgg	ttccacccca	ccccacccct	2340
ctgccagggt	gggcaggggg	ttcgggctgg	tggagcatgt	gctgggacag	gacagcatcc	2400
tcaatcaatc	caacagcata	ttcggttgca	tcttctacac	actacagcta	ttgttaggtg	2460
agtggctccg	ccccctccct	ggccgccccg	ccccgccctt	catccccctt	ggtcagctca	2520
gccccactcc	atgcaatctt	ggtgatccac	acagctgaca	gccagctage	tgctcatcac	2580
ggagcgtcct	gcgggtgggg	atgtggggag	gtaactaaca	ggagtctttt	aattggttta	2640
agtactgtta	gaggctgaag	ggcccttaaa	gacatcctag	gtccccagg	ttttgtttg	2700
ttgttgtttt	gagacagggt	ctggctctgt	tgcccaaagt	gaggtctagg	atgcccttag	2760
tgtgcactgg	cgtgatctca	gttcatggca	acctctgcct	ccctgcccaa	gggatccctc	2820
caccttagcc	tccaagcag	ctggaatcac	aggcgtgcac	cactatgccc	agctaatttt	2880

tgtttttgtt tttttttggt agagatgggtg tctcgccatg ttgccagggc tgggtctcaag	2940
caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tgggggggatt acaggcgtga gctaccatgc	3000
cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt cttttttaag gagaagctga	3060
gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgtatc tagtcccata	3120
agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg cccagggcct tgctgatgcc	3180
atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag caggctccca cgctcccttt	3240
gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tcactgaggg agggccagca ccatggctct	3300
ggctgacaca tgggttcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt	3360
ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag	3420
ccttcttttt tttttttttt aagaaataat cttgctctgt tgcccaggct ggagtgcagt	3480
ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tcctgagtag ctaggactat	3540
aggcatgtca ctgcaccag ctaatttttt tttttttttt tttttttttt ttgcgacata	3600
gtctcgctct gtcaccagggc tggagtgcag tggcacgac tcggctcact gcaacctctg	3660
cctcccgggt tcaagcaatt ttctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc	3720
gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt ttttagtggag acagggtttc accatgttgg	3780
ctaggatgggt ctcaatctct tgacctgggt atccatccgc cttggcctcc caaagtgcta	3840
ggattacagg cgtgagctaa cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgctct	3900
tgctgcccaa gctggaatgt ggtggcatga tctcggtcca ctgcaacctc cacctcctag	3960
gttcaagcga ttctccacct tagcctcccc agcagctggg attacagggt cccatcaaca	4020
caccgggcta atttttgtat ttttattaga gatgggggtt tgccatgttg gccaggctgc	4080
tctcgaactc ctaacctcag gtgatccacc ccattgggc tcccaaaata ctgggattac	4140
aggcatgagc caccgtgccc agctgaattt cttaaatttt gatagagatc gggctcttct	4200
atgttgccca agctggctct gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tcggcctccc	4260
agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag	4320
acccttecca gcagctcctg gcatctaggt agtgacgtga catcatggag tgttcgggag	4380
gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctcttctgccc ttgcagggtg cctgcggaca	4440
cgctgggect ctgtcctgat gctgctgagc tccctgggtg ctctcgctgg ttctgtctac	4500
ctggcctgga tctgttctt cgtgctctat gatttctgca ttgtttgtat caccacctat	4560
gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggcaag	4620
gctaagaggc actgagccct caaccgaagc caggctgacc tcatctgctt tgctttggca	4680
tgtgagcctt gcctaagggg gcatatctgg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc	4740

ES 2 453 895 T3

tagattaccc cctcctcctg ccatacccg c acatgacaat ggaccaa atg tgccacacgc	4800
tcgctctttt ttacaccag tgcctctgac tctgtcccca tgggctggtc tccaaagctc	4860
tttccattgc ccagggaggg aagggtctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa	4920
gtctgaacca tgtgtctgcc atggactgtg gtgctgggcc tccctcggtg ttgcctcttc	4980
tggagctggg aagggtagt cagagggaga gtggagggcc tgcagggaag ggtgggtatg	5040
ggtagctc ca tctccagtgt gtggagtcag caaggcctgg ggcaaccattg gccccaccc	5100
ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgcccacagg agccaggcct cctctcctgg	5160
gaaggtctgag cacacacctg gaagggcagg ctgcccttct ggttctgtaa atgcttctg	5220
ggaagttctt ccttgagttt aactttaacc cctccagtgt ccttatcgac cattccaagc	5280
cagtattggt agccttgagg ggtcagggcc aggttgtgaa ggtttttgtt ttgcctatta	5340
tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttgtgttg gcagggtgca	5400
gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc	5460
caggagtcc agaccagcct gggcaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa	5520
aaaaaaaaa ttagccaggc atgggtggtgt atgtacctat agtcccaact aatcggaag	5580
ctggcgggaa gactgcttga gcccagaagg ttgaggctgc agtgagccat gatcactgca	5640
ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaac	5700
ttgtgttaac gtgttaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggtg ggtactatta	5760
ttatccctat ctgatgata gggacagagt ggctaattag tatgcctgag atcacacagc	5820
tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctgggtcca tctgggtcca gcatctatat	5880
gctttttttt ttgttggtt gtttttgaga cggac	5915

<210> 16

<211> 5915

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

caccatcaga tgggacgtct gtgaaggaga gacctcatct ggcccacagc ttggaaagga	60
gagactgact gttgagttga tgcaagctca ggtgttgcca ggcggggcgcc atgatagtag	120
agaggttagg atactgtcaa ggggtgtgtgt ggccaaagga gtgggttctgt gaatgtatgg	180
gagaaagga gaccgaccac caggaagcac tggtaggca ggaccggga ggatgggagg	240
ctgcagccc aatggtgcct gaaatagttt caggggaaat gcttgggtcc cgaatcggat	300
cgcctatcc gctggatccc ctgatccgct ggtctctagg tcccggatgc tgcaattctt	360
acaacaggac ttggcatagg gtaagcgcaa atgctgttaa ccacactaac acactttttt	420

ttttcttttt	tttttttgag	acagagtctc	actctgtcgg	cctggctgga	gtgcagtggc	480
acgatctcgg	ctcactgcaa	cctccggctc	cccggctcaa	gcaattctcc	tgccctcagcc	540
tcccagtag	ctgggattac	aggcatgtgc	caccacgccc	ggctaatttt	tgtattttta	600
gttgagatgg	ggtttcacca	tgttggcgag	gctggctctg	aactcctgac	ctcaggtaat	660
ccgccagcct	cggcctccca	aagtgtctgg	attacaagcg	tgagccaccg	tgcccggcca	720
acagttttta	aatctgtgga	gacttcattt	cccttgatgc	cttgccagccg	cgccgactac	780
aactcccatc	atgcctggca	gccgctgggg	ccgcgattcc	gcacgtccct	taccgccttc	840
actagtcctg	gcattcttcg	ctgttttctc	aactcgcccg	cttgactagc	gccctggaac	900
agccatttgg	gtcgtggagt	gcgagcacgg	ccggccaatc	gccgagtcag	agggccagga	960
ggggcgcggc	cattcgccgc	ccggcccttg	ctccgtggct	ggttttctcc	gggggcgcc	1020
cgggcggaac	ctggagataa	tgggcagcac	ctgggggagc	cctggctggg	tgccgctcgc	1080
tctttgcctg	acgggcttag	tgctctcgct	ctacgcgctg	cacgtgaagg	cggcgcgcgc	1140
ccgggaccgg	gattaccgcg	cgctctgcga	cgtgggcacc	gccatcagct	gttcgcgcgt	1200
cttctcctcc	aggtgtgcac	gggagtggga	ggcggtgggc	ctcggagcag	ggcgccaggg	1260
atgccagatg	attattcttg	agtctgggat	cgggtgtgcc	ggggaacgga	cacggggctg	1320
gactgctcgc	ggggtcgttg	cacaggggct	gagctacca	gcgatactgg	tgttcgaaat	1380
aagagtgcga	ggcaagggac	cagacagtgc	tggggactgg	gattattccg	gggactcgca	1440
cgtgaattgg	atgccaagga	ataacggtga	ccaggaaagg	cggggaggga	ggatggcggt	1500
agagattgac	gatggtctca	aggacggcgc	gcagggtgaag	gggggtgttg	gcgatggctg	1560
cgccagggaa	caaggtggcc	cggctctggt	gtgcgtgatg	gccaggcggt	agcataatga	1620
cggaatacag	aggaggcgag	tgagtggcca	gggagctgga	gattctgggg	tccagggcaa	1680
agataatctg	cccccgactc	ccagtctctg	atgcaaaacc	gagtgaaccg	ttataccagc	1740
cttgccattt	taagaattac	ttaaggggcg	ggcgcggtgg	cccactcctg	taatccagc	1800
actttgggag	gccgaggcgg	atggatcact	tgaagtcagg	agttgaccag	cctggccaac	1860
atggtgaaag	cctgtctcta	ccaaaaatag	aaaaattaat	cgggcgctat	ggcggtgccc	1920
ttaatcccag	ctactcgggg	gggctaaggc	aggagaatcg	cttgaaccgg	ggaggcggag	1980
gtttcagtga	gccgagatcg	cgccactgca	ctccagcctg	ggccagagtg	agactccgtc	2040
tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	agacttactt	aaggtctaag	atgaaaagca	2100
gggcctacgg	agtagccacg	tccgggcctg	gtctggggag	aggggaggat	agggtcagtg	2160
acatggaatc	ctgacgtggc	caaagggtgc	cgggtgccagg	agatcatcga	cccttggaact	2220

ES 2 453 895 T3

```

aggatgggag gtcggggaac agaggatagc ccagggtggt tcttggaat cacctttctc 2280
gggcagggtc caaggcactg ggttgacagt cctaacctgg ttccaccca cccacccct 2340
ctgccagggtg gggcaggggt ttccggctgg tggagcatgt gctgggacag gacagcatcc 2400
tcaatcaatc caacagcata ttccggttgca tcttctacac actacagcta ttgttaggtg 2460
agtggctccg cccctccct gcccgcccg ccccgccct catccccctt ggtcagctca 2520
gccccactcc atgcaatctt ggtgatccac acagctgaca gccagctage tgctcatcac 2580
ggagcgtcct gcgggtgggg atgtggggag gtaactaaca ggagtctttt aattggttta 2640
agtactgtta gaggtgaag ggccttaaa gacatcctag gtccccaggt ttttgtttg 2700
ttgttgtttt gagacagggt ctggctctgt tgcccaaagt gaggtctagg atgcccttag 2760
tgtgcactgg cgtgatctca gttcatggca acctctgcct ccctgcecaa gggatccctc 2820
caccttagcc tccaagcag ctggaatcac aggcgtgcac cactatgcc agctaatttt 2880
tgtttttgtt tttttttgtt agagatggtg tctcgccatg ttgccaggc tggctctcaag 2940
caatctgtct gcctcagcct cccaaagtgc tggggggatt acaggcgtga gctaccatgc 3000
cccaccaaca cccagtttt gtggaaaaga tgccgaaatt cctttttaag gagaagctga 3060
gcatgagcta tcttttgtct catttagtgc tcagcaggaa aatttgtatc tagtcccata 3120
agaacagaga gaggaaccaa gggagtggaa gacgatggcg cccaggcct tgctgatgcc 3180
atatgccgga gatgagacta tccattacca cccttcccag caggctocca cgctcccttt 3240
gagtcaccct tcccagctcc agagaaggca tctctgaggg agggccagca ccatggctct 3300
ggctgacaca tgggtcagac ttggccgatt tatttaagaa attttattgc tcagaacttt 3360
ccctccctgg gcaatggcaa gagcttcaga gaccagtccc ttggagggga cctgttgaag 3420
ccttcttttt tttttttttt aagaaataat ctgtctctgt tgcccaggct ggagtgcagt 3480
ggcacaatca tagctcactg taacctggct caagcgatcc tcctgagtag ctaggactat 3540
aggcatgtca ctgcaccag ctaatttttt tttttttttt tttttttttt ttgcgacata 3600
gtctcgctct gtcaccaggc tggagtgcag tggcacgatc ttggctcact gcaacctctg 3660
cctcccggt tcaagcaatt ttctgcctc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc 3720
gtgtcaccac gccagctaa tttttgtatt tttagtggag acagggtttc accatgttgg 3780
ctaggatggg ctcaatctct tgacctgggt atccatccgc cttggcctcc caaagtgcta 3840
ggattacagg cgtgagtcaa cctcaccggg catttttttt ttgagacgaa gtcttgctct 3900
tgctgcecaa gctggaatgt ggtggcatga tctcggtca ctgcaacctc cacctcctag 3960
gttcaagcga ttctccacct tagcctccc agcagctggg attacagggt cccatcaaca 4020
caccgggcta atttttgtat ttttattaga gatggggttt tgccatgttg gccaggctgc 4080

```

ES 2 453 895 T3

```

tctcgaactc ctaacctcag gtgateccacc cccattggcc tcccaaaata ctgggattac 4140
aggcatgagc caccgtgccc agctgaattt ctaaattttt gatagagatc gggctcttct 4200
atgttgccca agctggtctt gaactcctag cctaaagcag tcttcccacc tcggcctccc 4260
agagtgtttg gaatacgtgc gtaagccacc acatctgccc tggagcctct tgttttagag 4320
acccttccca gcagctcctg gcatctaggt agtgagtgga catcatggag tgttcgggag 4380
gtggccagtg cctgaagccc acaccggacc ctctctgccc ttgcaggttg cctgcggaca 4440
cgctgggect ctgtcctgat gctgctgagc tccttggtgt ctctcgctgg ttctgtctac 4500
ttggcctgga tctgttctt ctgtctctat gatttctgca ttgtttgtat caccacctat 4560
gctatcaacg tgagcctgat gtggctcagt ttccggaagg tccaagaacc ccagggaag 4620
gctaagaggc actgagccct caacccaagc caggctgacc tcatctgctt tgctttggca 4680
tgtgagcctt gcctaagggg gcataatctgg gtccctagaa ggccctagat gtggggcttc 4740
tagattaccc cctcctcctg ccataaccgc acatgacaat ggaccaaag tgccacacgc 4800
tcgctctttt ttacaccagc tgcctctgac tctgtcccca tgggctggtc tccaaagctc 4860
tttccattgc ccagggaggg aagggtctga gcaataaagt ttcttagatc aatcagccaa 4920
gtctgaacca tgtgtctgcc atggactgtg gtgctgggccc tccctcggtg ttgccttctc 4980
tggagctggg aagggtgagt cagagggaga gtggagggcc tgcctgggaag ggtggttatg 5040
ggtagtctca tctccagtgt gtggagtcag caaggcctgg ggcaccattg gccccacccc 5100
ccaggaaaca ggctggcagc tcgctcctgc tgccacagg agccaggcct cctctcctgg 5160
gaaggctgag cacacacctg gaagggcagg ctgcccttct ggttctgtaa atgcttgctg 5220
ggaagtctct ccttgagttt aactttaacc cctccagttg ccttatcgac cattccaagc 5280
cagtattggt agccttgag gtgcagggcc aggttgtaga ggtttttgtt ttgcctatta 5340
tgccctgacc acttacctac atgccaagca ctgtttaaga acttggtgtg gcagggtgca 5400
gtggctcaca cctgtaatcc ctgtactttg ggaggccaag gcaggaggat cacttgaggc 5460
caggagttcc agaccagcct gggcaaaata gtgagacccc tgtctctaca aaaaaaaaaa 5520
aaaaaaaaaa ttagccaggc atggtggtgt atgtacctat agtcccaact aatcggaag 5580
ctggcgggaa gactgcttga gccagaagg ttgaggtgc agtgagccat gatcactgca 5640
ctccagcctg agcaacagag caagaccgtc tccaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaaaac 5700
ttgtgttaac gtgttaaaact cgtttaatct ttacagtgat ttatgagggt ggtactatta 5760
ttatccctat cttgatgata gggacagagt ggctaattag tatgcctgag atcacacagc 5820
tactgcagga ggctctcagg atttgaatcc acctggtcca tctggctcca gcatctatat 5880
gctttttttt ttgttggttt gtttttgaga cggac 5915

```

<210> 17

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de la sonda VIC vk2581 G>C

<400> 17
 tcatcacgga gcgtc 15
 <210> 18
 <211> 15
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la sonda FAM vk2581 G>C
 <400> 18
 10 tcatcaccga gcgtc 15
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 19
 ggtgatccac acagctgaca 20
 <210> 20
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 25 <400> 20
 cctgttagtt acctcccccac atc 23
 <210> 21
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la sonda VIC vk3294 T>C
 <400> 21
 ccaggacat ggtgc 15
 35 <210> 22
 <211> 15
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la sonda FAM vk3294 T>C
 <400> 22
 5 ccaggaccgt ggtgc 15
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 23
 gctccagaga aggcattcact 20
 <210> 24
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 20 <400> 24
 gccaaagtctg aaccatgtgt ca 22
 <210> 25
 <211> 15
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la sonda VIC vk4769 G>A
 <400> 25
 atacccgcac atgac 15
 30 <210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia de la sonda FAM vk4769 G>A
 <400> 26
 cataccaca catgac 16

<210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 27
 gtccctagaa ggcctagat gt 22
 <210> 28
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 15 <400> 28
 gtgtggcaca ttgtgtccat t 21
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 29
 ccaatcgccg agtcagagg 19
 25 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de PCR
 <400> 30
 cccagtcccc agcactgtct 20
 <210> 31
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Cebador de PCR
 <400> 31
 aggggaggat agggtcagtg 20
 <210> 32
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 10 <400> 32
 cctgttagtt acctcccccac a 21
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 33
 atacgtgcgt aagccaccac 20
 20 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador de PCR
 <400> 34
 acccagatat gcccccttag 20

REIVINDICACIONES

1. Célula que contiene y expresa un ácido nucleico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica vitamina K epóxido reductasa (VKOR) operativamente asociada a un promotor heterólogo, en la que dicho ácido nucleico que codifica VKOR comprende SEC ID NO:9, o un ácido nucleico que es al menos 80% idéntico a SEC ID NO:9, y en la que dicha VKOR expresada convierte vitamina K epóxido en vitamina K.
2. Célula de la reivindicación 1, en la que dicha VKOR expresada es sensible a warfarina.
3. Célula de la reivindicación 1 ó 2, que expresa además ácido nucleico que codifica una proteína dependiente de vitamina K y que contiene y expresa un ácido nucleico heterólogo que codifica una carboxilasa dependiente de vitamina K.
4. Célula de la reivindicación 3, en la que la proteína dependiente de vitamina K se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Factor IX, Factor X, Proteína C, Proteína S y protrombina.
5. Un método para obtener una proteína dependiente de vitamina K, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 3 ó 4 en presencia de vitamina K.

Fig. 1A vk2581

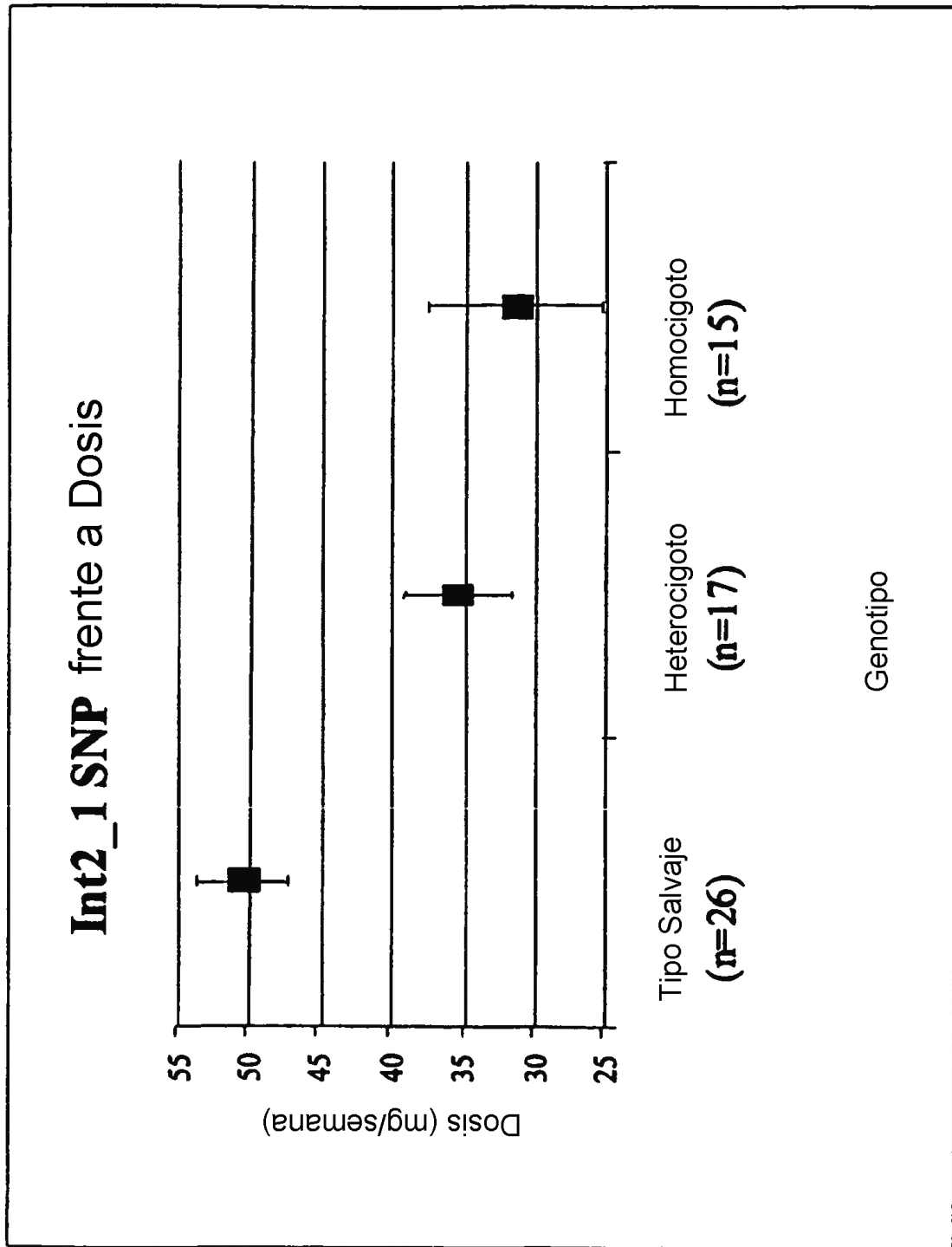


Fig. 1B vk3294

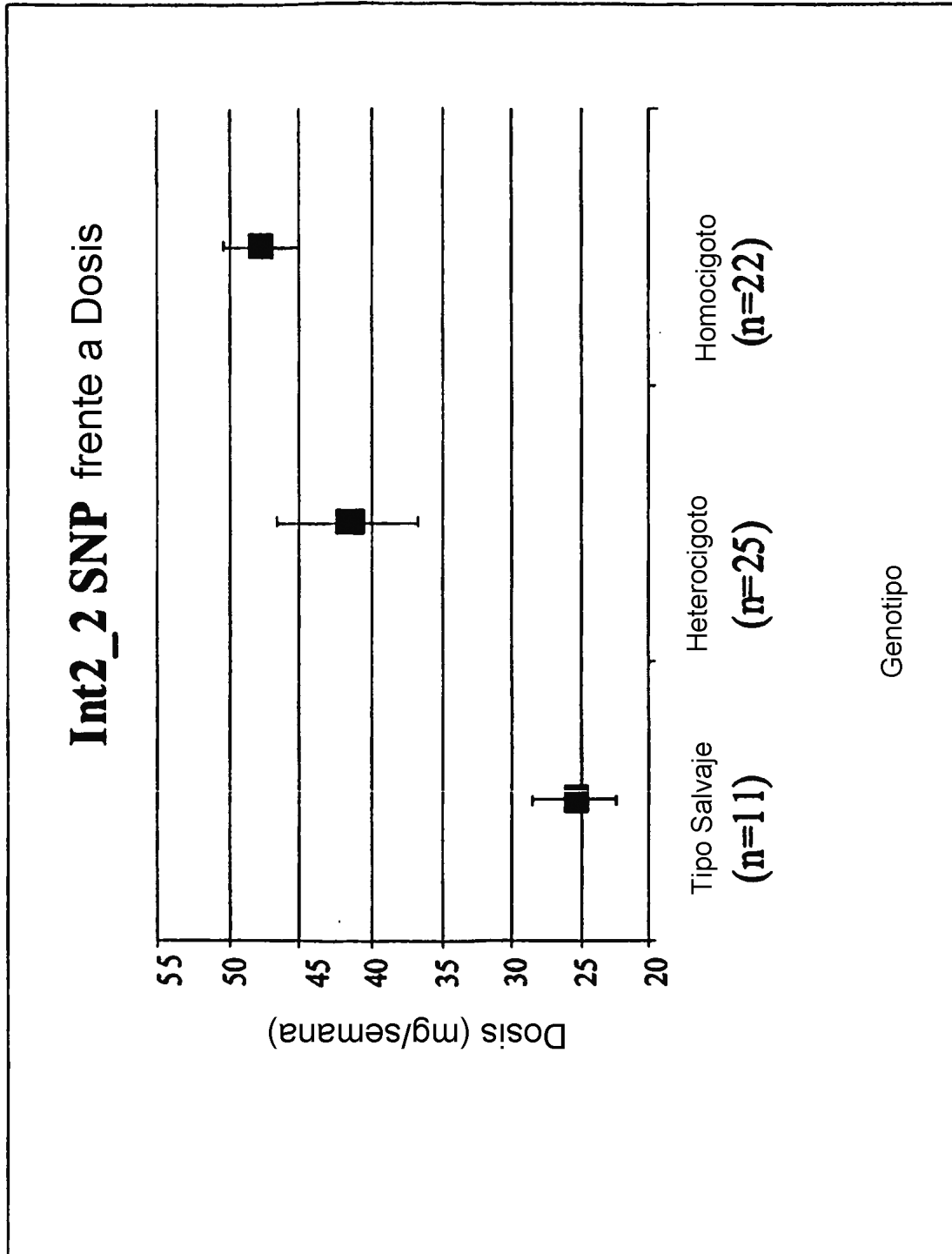


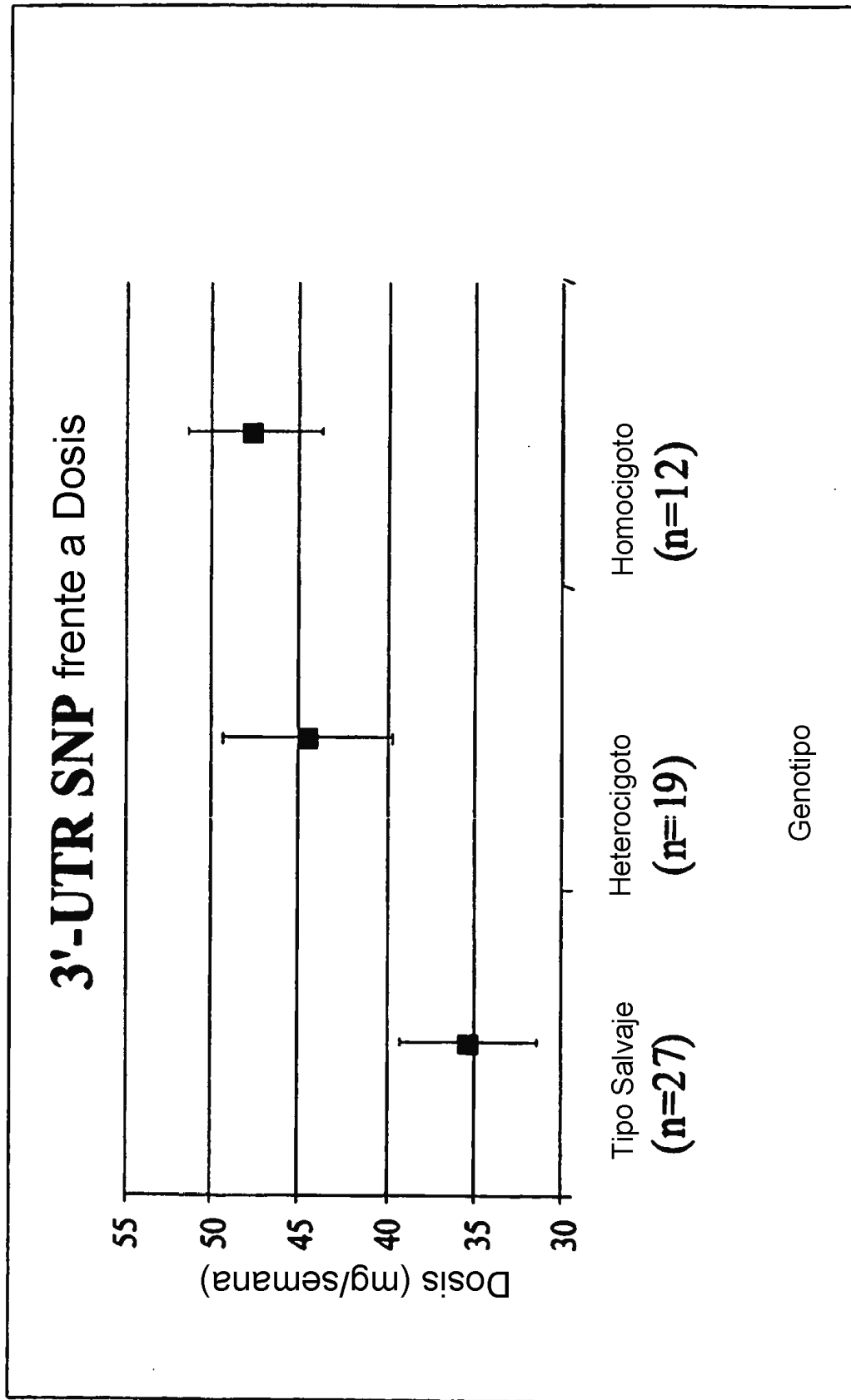
Fig. 1C vk4769

Fig. 1D p1075

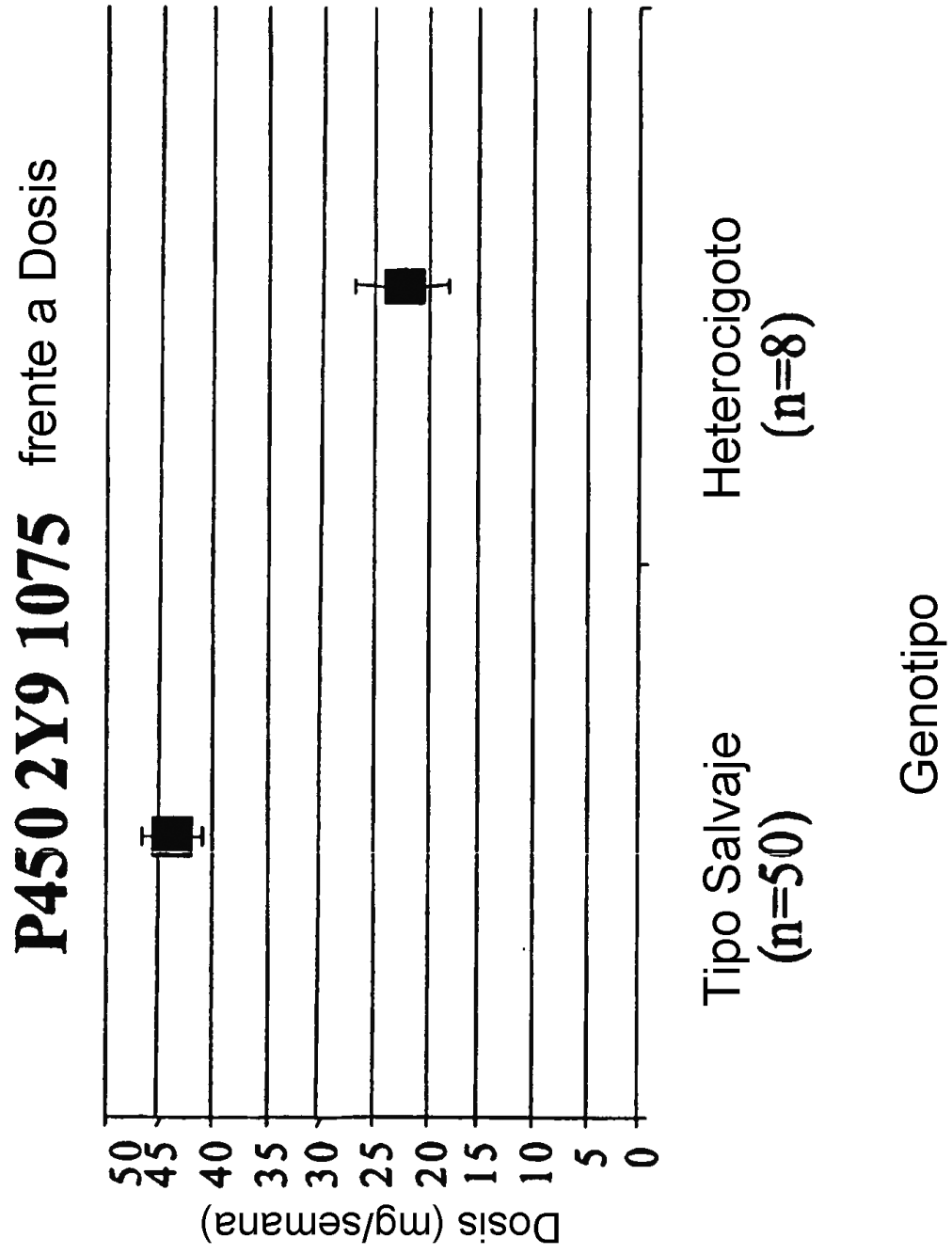


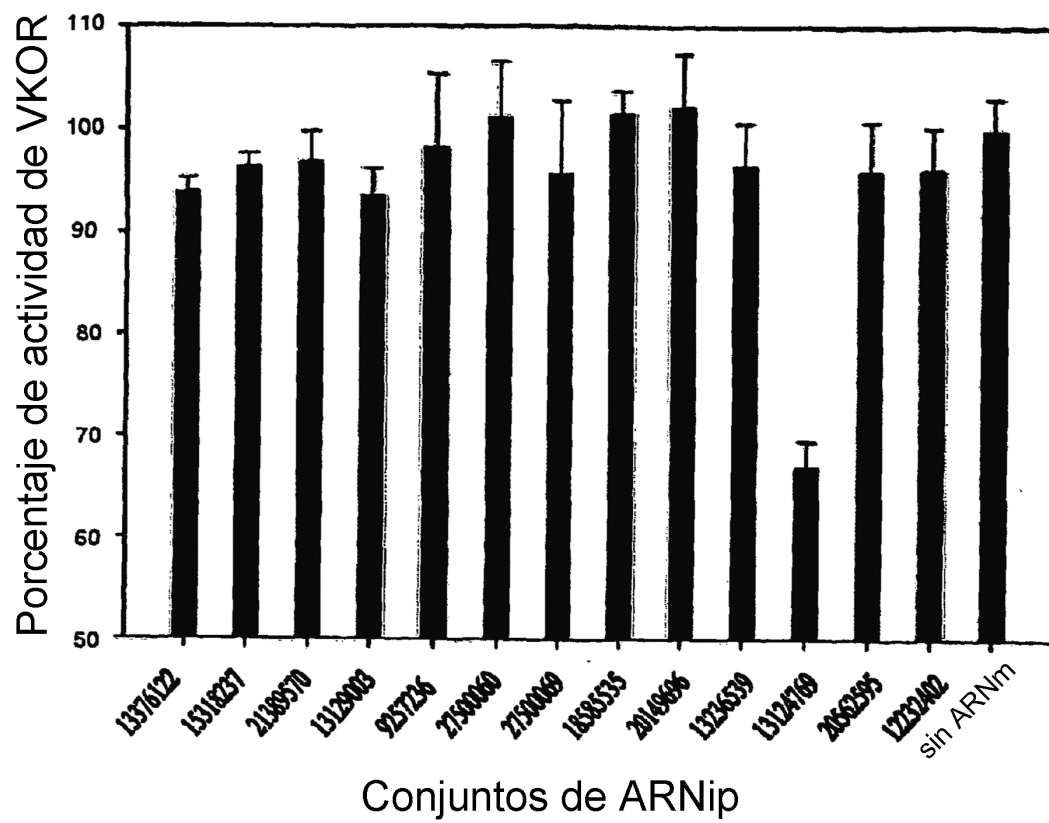
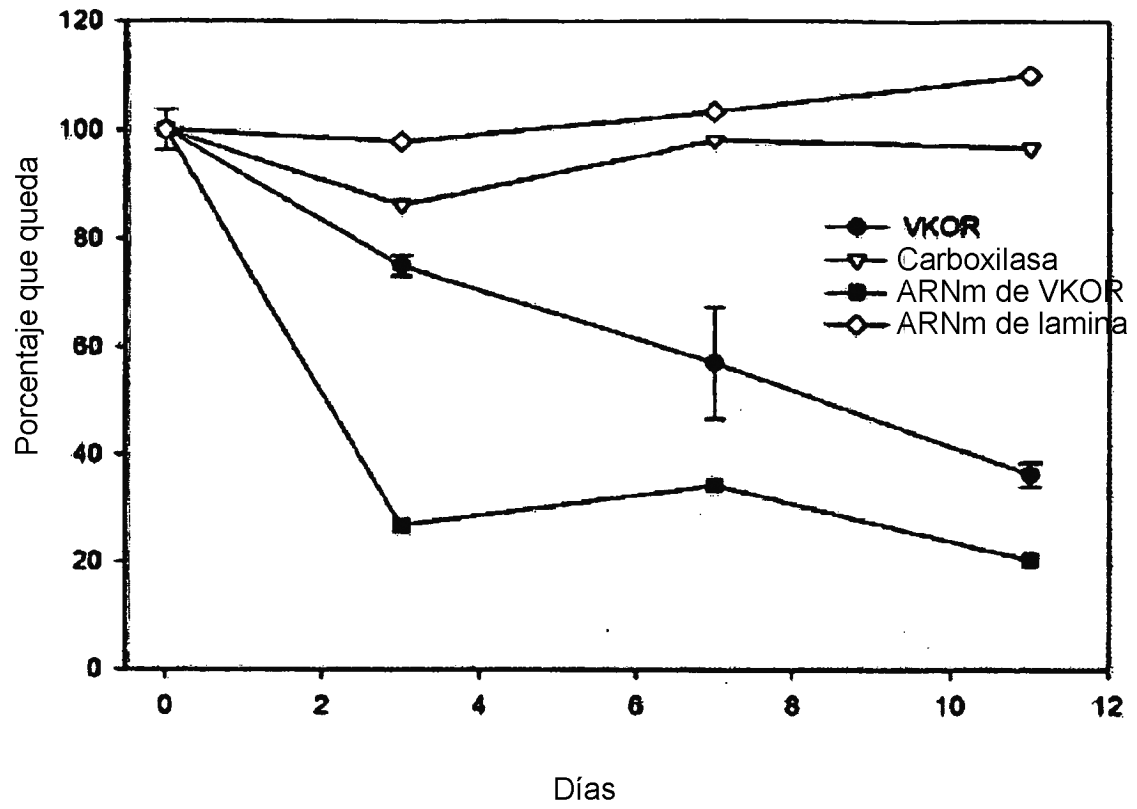
Fig. 2

Fig. 3



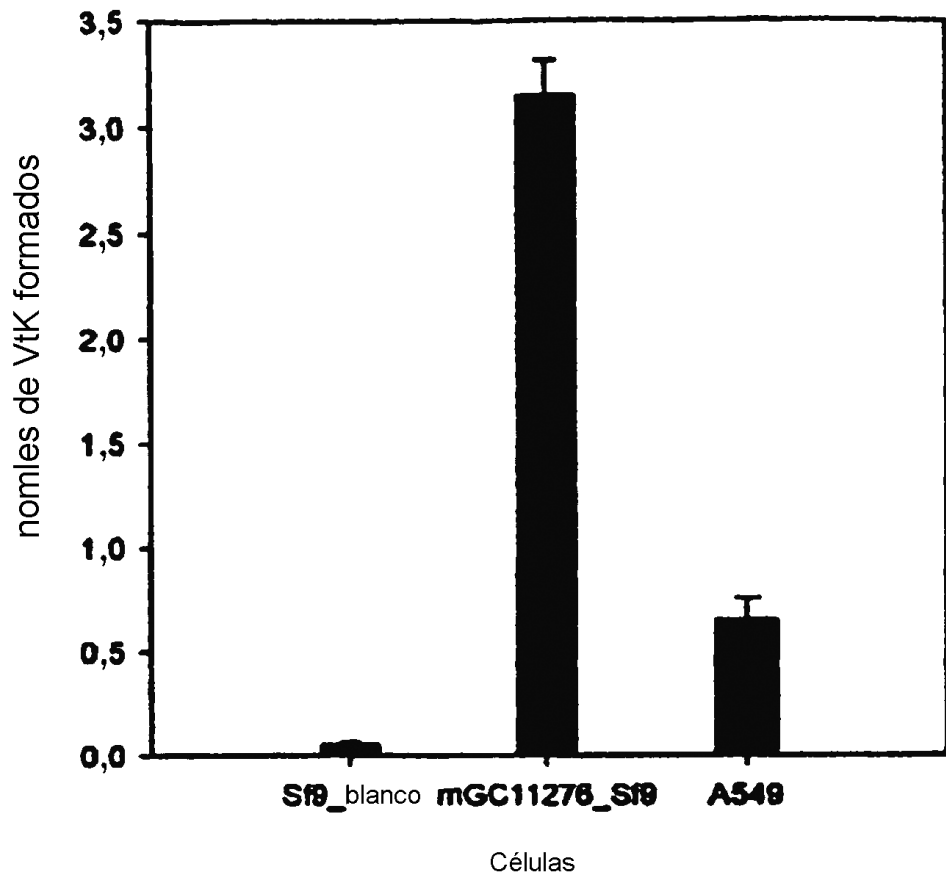


Figura 4

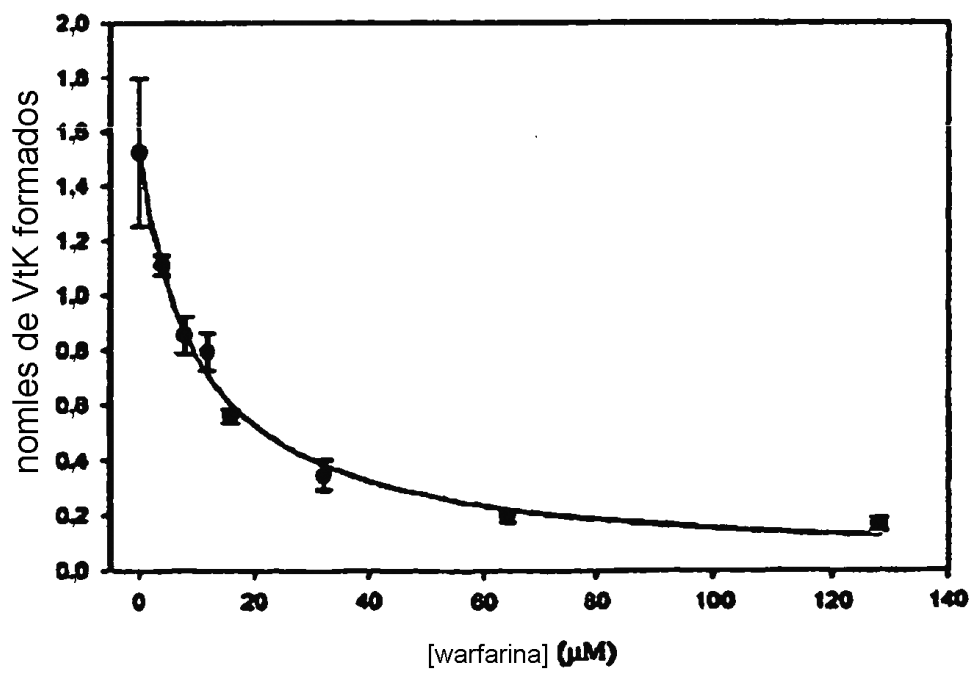


Figura 5