

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 858**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.1998 E 08006554 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2045322**

54 Título: **Doble musculación en mamíferos**

30 Prioridad:

14.07.1997 US 891789
15.01.1998 US 7761

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (100.0%)
Avenue Pré-Aily, 4
4031 Angleur, BE

72 Inventor/es:

GROBET, LUC;
GEORGES, MICHEL y
PONCELET, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 547 858 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

Doble musculación en mamíferos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a factores que afectan al desarrollo muscular en mamíferos, especialmente ganado. En particular, la presente invención se refiere a la clonación de un procedimiento para determinar genotipos de miostatina.

10

Descripción de la técnica relacionada

La superfamilia de TGF- β consiste en un grupo de polipéptidos multifuncionales que controlan un amplio intervalo de procesos de diferenciación en muchos tipos celulares de mamífero. GDF-8 es un miembro de la superfamilia de TGF- β . Todos los miembros de esta superfamilia comparte una estructura común que incluye una corta señal peptídica para la secreción y un fragmento peptídico N-terminal que se separa del fragmento carboxi-terminal bioactivo por escisión proteolítica en un sitio de escisión proteolítica altamente conservado. El dominio carboxi-terminal bioactivo se caracteriza por restos de cisteína en posiciones altamente conservadas que están implicados en puentes disulfuro intra- e intermoleculares. Las moléculas funcionales son dímeros covalentemente unidos (mediante un enlace S-S) del dominio carboxi-terminal (Masterson y col., 1996).

15

20

Recientemente, se informó de que ratones deficientes en el gen que codifica GDF-8 se caracterizaban por una hiperplasia muscular generalizada (McPherron y col., 1997). Los ratones GDF-8 deficientes se produjeron por direccionamiento génico usando recombinación homóloga en células madre embrionarias, un procedimiento mencionado como "desactivación génica". La hiperplasia muscular generalizada murina pareció ser muy similar en su expresión a la hiperplasia muscular que caracteriza al ganado bovino de "doble musculación". Esta observación planteó la intrigante posibilidad de que el gen bovino que codifica GDF-8 (es decir, el homólogo evolutivo bovino del gen de GDF-8 de ratón) esté implicado en el fenotipo bovino de doble musculación. También planteó la posibilidad de que el gen humano que codifica GDF-8 (es decir, el homólogo evolutivo humano del gen de GDF-8 de ratón) esté implicado en la regulación del desarrollo muscular en seres humanos, específicamente la génesis del músculo esquelético. El aislamiento del gen de GDF-8 humano puede tener usos/aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades musculodegenerativas a través de la regulación positiva o regulación negativa de la expresión de GDF-8.

25

30

35

Se ha informado de la existencia de animales caracterizados por una hipertrofia muscular generalizada distinta, habitualmente conocidos como animales de "doble musculación", en varias razas de ganado bovino en todo el mundo. La primera descripción documentada de ganado bovino de doble musculación data de tan pronto como 1807 (Culley, 1807). Una de las razas en que esta característica ha sido más minuciosamente estudiada es la raza Azul Belga de ganado bovino ("raza Azul Belga"). Ésta es una de las pocas razas en las que se ha seleccionado sistemáticamente el rasgo de doble musculación, y en las que el fenotipo de doble musculación es casi fijo. Una comparación de animales de doble musculación y convencional dentro de la raza Azul Belga, mostró un aumento en la masa muscular del 20% de promedio, mientras que todos los demás órganos estaban reducidos en tamaño (Hanset, 1986 y 1991). Se demostró que la hipertrofia muscular era una hiperplasia histológica que afectaba principalmente a músculos superficiales, acompañada por una reducción del 50% en el contenido total de lípidos y una reducción en la fracción de tejido conectivo medida por contenido de hidroxiprolina (Hanset y col., 1982). Los animales de doble musculación demostraron tener una ingesta reducida de pienso con tasa mejorada de conversión del pienso (Hanset y col., 1987). Un importante beneficio económico de los animales de doble musculación, en contraste con los animales convencionales, es el aumento sustancial en el precio de venta y los ingresos netos para el ganadero (Hanset y col., 1987).

40

45

50

Una de las series de estudios más minuciosos sobre musculación doble es la de Hanset y colaboradores en la raza Azul Belga. Se midieron los criterios objetivos de desarrollo muscular, tales como porcentaje de desollamiento, el porcentaje de magro y grasa, las concentraciones de creatina y creatinina en plasma y glóbulos rojos, en casi 150 animales seleccionados aleatoriamente criados en condiciones normalizadas. Estos estudios revelaron claramente distribuciones bimodales anormales del fenotipo de doble musculación y confirmaron objetivamente la clasificación visual tradicionalmente realizada por los criadores sobre animales de doble musculación y convencionales. La distribución fenotípica se resolvió usando un procedimiento de probabilidad máxima en dos poblaciones normales componentes con una varianza común que reveló diferencias en la media de tres a cuatro desviaciones típicas dependiendo del rasgo. Esto sugirió la presencia de un alelo que tenía un efecto principal sobre el desarrollo muscular con una frecuencia de población cercana al 50% (Hanset y Michaux, 1985b). La evidencia más convincente a favor de dicho alelo, sin embargo, proviene de cruces experimentales que implican toros Azul Belga de doble musculación y vacas lecheras Holstein Friesian (teniendo los últimos animales un desarrollo muscular muy pobre). Aunque la descendencia F1 mostró una distribución fenotípica muy similar a sus hembras Holstein Friesian, el retrocruzamiento de estos F1 con toros de doble musculación produjo una generación BC bimodal, que apunta claramente hacia una segregación mendeliana de un alelo "mh" (hipertrofia muscular) recesivo (Hanset y Michaux., 1985a).

55

60

65

Posteriormente se usó el mismo tipo de cruces experimentales para realizar una exploración de genoma completo usando un mapa de marcadores basado en microsatélites. Para realizar el análisis de vinculación, los animales se clasificaron como de doble musculación o convencionales. Se obtuvieron valores muy significativos del logaritmo de la probabilidad (valores lod) en el cromosoma 2 (> 17), y un análisis de vinculación de múltiples puntos posicionó el locus *mh* en el extremo centromérico de este cromosoma, a [2]centimorgan del marcador más cercano de microsatélite: TGLA44. La región cromosómica correspondiente justificó toda la varianza del rasgo asumido como completamente penetrante en este experimento (Charlier y col., 1995).

En seres humanos, se han aislado los genes que codifican algunas formas de anomalías musculares, por ejemplo distrofia muscular. La divulgación proporciona el gen que regula el desarrollo del músculo esquelético solamente, en oposición a otros tipos de músculo, por ejemplo músculo liso o cardíaco. La divulgación puede proporcionar una comprensión del papel del gen de GDF-8 o su receptor en el crecimiento de músculo esquelético en seres humanos que solamente experimentan una respuesta hiperplásica.

15 Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado y secuenciado un gen (ADNc y genómico) que codifica una proteína miostatina bovina. La secuencia codificante de ácido nucleico se identifica como SEC ID N° 1 y la secuencia proteica se identifica como SEC ID N° 2. La secuencia i bovina genómica se identifica como SEC ID N° 54. Se ha secuenciado un gen mutante (SEC ID N° 3) en que la secuencia codificante carece de una secuencia consecutiva de 11 pares de bases (SEC ID N° 11) de la secuencia que codifica la proteína bovina que tiene actividad miostatina. Se ha demostrado que ganado bovino de la raza Azul Belga homocigóticos para el gen mutante que carece de actividad miostatina son de doble musculación. También se han determinado otras mutaciones bovinas que conducen a doble musculación, identificándose en el presente documento como *nt419(del7-ins10)*, *Q204X*, *E226X* y *C313Y*, respectivamente. En un aspecto, como se define en las reivindicaciones, la presente invención por tanto proporciona un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero. El procedimiento incluye obtener una muestra de material que contiene ADN del mamífero y averiguar si está presente una secuencia del ADN que codifica (a) una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, y si está presente una secuencia del ADN que codifica (b) una proteína alélica que carece de la actividad de (a). La ausencia de (a) y la presencia de (b) indican la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.

Por supuesto, la mutación responsable de la ausencia de actividad puede ser una mutación de origen natural, como es el caso para las razas Azul Belga, Asturiana, Parthenaise o Rubia Gallega, aquí mostradas.

35 El mamífero puede ser un bovino, etc.

Existen varios procedimientos conocidos para determinar si una secuencia nucleotídica particular está presente en una muestra. Un procedimiento común es la reacción en cadena de la polimerasa. Un aspecto preferido de la invención por tanto incluye una etapa en que averiguar si una secuencia del ADN que codifica (a) está presente, y si una secuencia del ADN que codifica (b) está presente incluye amplificar el ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.

Un cebador de la presente invención, usado en PCR por ejemplo, es una molécula de ácido nucleico suficientemente complementaria a la secuencia en la que está basada y de longitud suficiente para hibridar selectivamente con la parte correspondiente de una molécula de ácido nucleico pretendida para amplificarse y para cebar la síntesis de la misma en condiciones *in vitro* habitualmente usadas en PCR. Asimismo, una sonda de la presente invención, es una molécula, por ejemplo una molécula de ácido nucleico de suficiente longitud y suficientemente complementaria a la molécula de ácido nucleico de interés, que se une selectivamente, en condiciones de rigurosidad elevada o baja con la secuencia de ácido nucleico de interés para la detección de la misma en presencia de moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias diferentes.

Los cebadores pueden basarse en la secuencia identificada como SEC ID N° 7 (secuencia de ADNc humano) o SEC ID N° 54.

Se describe un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero que incluye obtener una muestra de material que contiene ARNm del mamífero. Dicho procedimiento incluye averiguar si está presente una secuencia del ARNm que codifica (A) una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, y si está presente una secuencia del ARNm que codifica (B) una proteína al menos parcialmente codificada por una secuencia nucleotídica truncada correspondiente a sustancialmente la secuencia del ARNm y que carece de la actividad de (A). La ausencia de (A) y la presencia de (B) indican la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.

El ARNm que codifica (A) y la secuencia truncada pueden corresponder a alelos de ADN del mamífero.

De nuevo, si se usa un procedimiento de amplificado tal como PCR en averiguar si está presente una secuencia del ARNm que codifica (A), y si está presente una secuencia del ARNm que codifica (B), el procedimiento incluye

amplificar el ARNm en presencia de un par de cebadores complementarios a una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina. Cada uno de estos cebadores puede contener una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria, por ejemplo, a la secuencia identificada como SEC ID N° 7. La secuencia truncada puede contener al menos 50 nucleótidos consecutivos sustancialmente correspondientes a 50 nucleótidos consecutivos de la SEC ID N° 7, por ejemplo.

En otro aspecto, la invención es un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero descrito que incluye obtener una muestra tisular que contiene ARNm del mamífero y averiguar si está presente un ARNm que codifica una proteína miostatina de tipo mutante que carece de actividad biológica de miostatina. La presencia de dicho ARNm que codifica una proteína miostatina de tipo mutante indica la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino. El procedimiento incluye obtener una muestra de material que contiene ADN del animal y averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina. La ausencia de ADN que tiene dicha secuencia nucleotídica indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal. Averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina puede incluir la amplificación del ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.

En particular, el procedimiento puede realizarse usando una muestra de un animal en que dicho animal bovino que no presenta hiperplasia muscular se sabe que tiene una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia identificada como SEC ID N° 1 en condiciones rigurosas de hibridación.

Es posible que averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluya amplificar el ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente, de la proteína que tiene actividad biológica de miostatina.

Los cebadores, es decir primero y segundo cebadores, pueden basarse en la primera y segunda secuencias nucleotídicas que codifican regiones apartadas entre ellas de la proteína, en las que las regiones flanquean una mutación que se sabe que sucede de forma natural y que cuando está presente en ambos alelos de dicho animal provoca hiperplasia muscular.

También puede ser que el ADN de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular contenga una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID N° 2 y la secuencia codificante de ADN de dicho animal que presenta hiperplasia muscular se sabe que contiene una delección de 11 pares de bases que comienza en el par de bases n° 821 de la secuencia codificante, y dicho primer cebador se selecciona para que esté cadena arriba del codón que codifica el ácido glutámico n° 275 y el segundo cebador se selecciona para que esté cadena abajo del codón que codifica el ácido aspártico n° 274.

Además, un ADN de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular podría no contener una secuencia nucleotídica que hibride en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID N° 2. La secuencia codificante de ADN de dicho animal que presenta hiperplasia muscular podría saberse que contiene una delección de 11 pares de bases que comienza en el par de bases n° 821. Puede seleccionarse un cebador que abarque la secuencia nucleotídica que incluye los pares de bases n° 820 y 821 de la secuencia de ADN que contiene la delección.

El animal puede ser de la raza Azul Belga.

En un aspecto particular, averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ADN en presencia de un cebador que contiene al menos una parte de una mutación que se sabe que sucede de forma natural y que cuando está presente en ambos alelos de dicho animal provoca hiperplasia muscular.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino que incluye obtener una muestra del animal que contiene ARNm y averiguar si está presente un ARNm que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina en la muestra. La ausencia de dicho ARNm indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.

Una muestra que contiene ARNm puede ser tejido muscular, particularmente, tejido de músculo esquelético. En un aspecto particular, la invención es un procedimiento para determinar la presencia de doble musculación en un animal bovino, que implica obtener una muestra de material que contiene ADN del animal y averiguar si el ADN

contiene la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 11 en que la ausencia de la secuencia indica doble musculación en el animal.

En un aspecto particular, el animal es de la raza Azul Belga.

5 En otro aspecto, la invención es un procedimiento para determinar el genotipo de miostatina de un mamífero, que puede ser deseable saber con fines de cría. El procedimiento incluye obtener una muestra de material que contiene ácido nucleico del mamífero, en el que el ácido nucleico no está contaminado el ácido nucleico heterólogo; averiguar si la muestra contiene (i) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina; y averiguar si la muestra contiene (ii) una molécula de ácido nucleico alélico que codifica una proteína que carece de actividad biológica de miostatina. El mamífero puede ser bovino.

15 La invención incluye un kit de diagnóstico, para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero del cual se ha obtenido una muestra que contiene ADN del mamífero. El kit incluye un primer y segundo cebadores para amplificar el ADN, siendo los cebadores complementarios a las secuencias nucleotídicas del ADN cadena arriba y cadena abajo, respectivamente, de una mutación en la parte del ADN que codifica miostatina que provoca hiperplasia muscular del mamífero, en el que al menos una de las secuencias nucleotídicas se selecciona para que sea de una región no codificante del gen de miostatina. El kit también puede incluir un tercer cebador complementario a una mutación de origen natural de una parte codificante del gen de miostatina.

20 Un kit de diagnóstico particular, para determinar el genotipo de una muestra de material genético de mamífero, particularmente material bovino incluye un par de cebadores para amplificar una parte del material genético correspondiente a una secuencia nucleotídica que codifica al menos una parte de una proteína miostatina, en el que un primero de los cebadores incluye una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a una mutación de la SEC ID N° 1 para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la mutación, seleccionándose la mutación entre el grupo de mutaciones resultante de: (a) deleción de 11 nucleótidos empezando en el nucleótido 821 de la parte codificante de la SEC ID N° 1; (b) deleción de 7 nucleótidos empezando en el nucleótido 419 de la secuencia codificante e inserción de la secuencia AAGCATACAA en el lugar de los mismos; (c) deleción del nucleótido 610 de la secuencia codificante e inserción de T en el lugar del mismo; (d) deleción del nucleótido 676 de la secuencia codificante e inserción de T en el lugar del mismo; y (e) y combinaciones de los mismos. El segundo del par de cebadores se localiza preferentemente cadena arriba completamente o cadena abajo completamente de la mutación o mutaciones seleccionadas. En un kit, uno de dicho primer cebador abarca la mutación (a) y comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 11 para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la SEC ID N° 11. En otro (o el mismo kit), uno de dicho primer cebador es suficientemente complementario a la secuencia insertada de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la mutación (b) y comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia correspondiente a la deleción de 7 nucleótidos de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la deleción de 7 nucleótidos de la mutación (b). En otro (o el mismo kit), uno de dicho primer cebador abarca la mutación (c) y comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la correspondiente región que carece de la mutación (c) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (c). En otro (o el mismo kit), uno de dicho primer cebador abarca la mutación (d) y comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la correspondiente región que carece de la mutación (d) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (d). En otro (o el mismo kit), uno de dicho primer cebador abarca la mutación (e) y comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la correspondiente región que carece de la mutación (e) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (e).

50 Se describe una proteína purificada que tiene actividad biológica de miostatina, y que tiene una secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID N° 2, o una variante sustituida de forma conservativa de la misma. Se describe una proteína bovina purificada que tiene actividad biológica de miostatina o una proteína humana purificada (SEC ID N° 8) que tiene actividad biológica de miostatina.

55 Se describe una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína anterior. Se describe una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una molécula de ADN que tiene la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 3 o SEC ID N° 7 o que varía de la secuencia debido a la degeneración del código genético, o una hebra de ácido nucleico capaz de hibridar con al menos una de dicha molécula de ácido nucleico en condiciones rigurosas de hibridación.

60 Se desvela una sonda que contiene una molécula de ácido nucleico suficientemente complementaria a una secuencia identificada como SEC ID N° 1, o su complemento, de modo que se una a la misma en condiciones rigurosas. La sonda puede ser una secuencia que es entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1195 nucleótidos de longitud.

65 Se desvela una composición de cebadores útil para la detección de la presencia de ADN que codifica miostatina en

ganado bovino. La composición puede incluir un cebador de ácido nucleico sustancialmente complementario a una secuencia de ácido nucleico que codifica una miostatina bovina. La secuencia de ácido nucleico puede identificarse como SEC ID N° 1.

5 La invención incluye un procedimiento para identificar una secuencia nucleotídica de un gen mutante que codifica una proteína miostatina de un mamífero que presenta hiperplasia muscular. El procedimiento incluye obtener una muestra de material que contiene ADN del mamífero y sondear la muestra usando una sonda de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica de un gen conocido que codifica miostatina para identificar la secuencia nucleotídica del gen mutante. En un enfoque particular, la sonda se basa en una secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 1, SEC ID N° 5 o SEC ID N° 7. Preferentemente, la sonda es de al menos 8 ácidos nucleicos de longitud. La etapa de sondear la muestra puede incluir la exposición del ADN a la sonda en condiciones de hibridación y comprender adicionalmente el aislamiento de moléculas hibridadas de ácido nucleico. El procedimiento puede incluir adicionalmente la etapa de secuenciar ADN aislado. El procedimiento puede incluir la etapa de aislar y secuenciar un ADNc o ARNm que codifica la proteína miostatina mutante completa. El procedimiento puede incluir una etapa de aislar y secuenciar una miostatina de tipo silvestre funcional del mamífero que no presenta hiperplasia muscular.

El procedimiento puede incluir la comparación de la secuencia codificante completa de la proteína miostatina mutante completa con, si la secuencia codificante para la miostatina de tipo silvestre funcional de dicho mamífero es previamente conocida, (1) la secuencia conocida, o si la secuencia codificante para una miostatina de tipo silvestre funcional de dicho mamífero es previamente desconocida, (2) la secuencia determinada de acuerdo con la reivindicación 63 o reivindicación 66, para determinar la localización de cualquier mutación en el gen mutante.

La invención incluye una composición de cebadores útil para la determinación de una secuencia nucleotídica que codifica una miostatina que contiene una primera molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica localizada cadena arriba de una mutación determinada de acuerdo con un procedimiento de la invención y una segunda molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica localizada cadena abajo de la mutación.

Una sonda de la invención puede incluir una molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica que abarca una mutación determinada de acuerdo con la invención.

Se describe un procedimiento para determinar si una muestra de material genético de mamífero es capaz de conferir un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, que comprende averiguar si el material genético contiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, en el que la ausencia de dicha secuencia indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.

Realizaciones adicionales de la invención son como se describe en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Al describir aspectos particulares de la invención, se hace referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

La Figura 1 es un resumen esquemático de información de mapeo genético, físico y comparativo alrededor del locus *mh* bovino. Se muestra una curva de valor lod de múltiples puntos obtenida para el locus *mh* con respecto al mapa de marcadores de microsatélite. Los marcadores que no fueron informativos en la genealogía usada se muestran entre paréntesis; su posición en el mapa se infiere de los datos de mapeo publicados. Los marcadores y los YAC de los cuales se aislaron están conectados por flechas. Se muestra el mapa RH de la sección relevante de HSA2 humano, con la posición relativa en cR de los EST usados. Las líneas punteadas conectan marcadores de microsatélite y Tipo I con sus respectivos YAC positivos. Los YAC que muestran productos de SINE-PCR de hibridación cruzada están conectados por los recuadros rojos.

La Figura 2(a) muestra electroferogramas obtenidos por secuenciación cíclica de la secuencia de ADNc de miostatina a partir de un animal de doble musculación y uno convencional, que muestra la delección *nt821del(11)* (SEC ID N°11) en el animal de doble musculación. Los cebadores usados para amplificar el fragmento que abarca la delección del ADN genómico están apartados de los nucleótidos restantes.

La Figura 2(b) muestra la secuencia de aminoácidos del alelo *nt821del(11)* murino (fila superior), bovino normal (fila central) y bovino (fila inferior). El sitio putativo de procesamiento proteolítico está recuadrado, mientras que las nueve cisteínas conservadas en la región carboxi-terminal están subrayadas. Las diferencias entre el alelo bovino normal y *nt821del(11)* se indican por el doble subrayado.

La Figura 3 es una representación esquemática del gen de miostatina bovina con la posición y definición de los polimorfismos de secuencia de ADN identificados. Los recuadros "A" (transparentes) corresponden a las secuencias líder y tráiler no traducidas (diámetro grande), y las secuencias intrónicas (diámetro pequeño) respectivamente. Los recuadros "B", "C", y "D" corresponden a las secuencias que codifican el péptido líder, el péptido asociado a latencia N-terminal y el dominio carboxi-terminal bioactivo de la proteína respectivamente. Las flechas pequeñas "e", "f" y "g" apuntan hacia las posiciones de los cebadores usados para la amplificación de intrones, la amplificación y secuenciación de exones y la secuenciación de exones respectivamente; las correspondientes secuencias cebadoras se presentan en la Tabla 1. Las posiciones de los polimorfismos de

secuencia de ADN identificados se muestran como líneas "h", "i" o "j" en el gen de miostatina para mutaciones silenciosas, conservativas y de interrupción respectivamente. Cada mutación está conectada mediante una flecha con un recuadro que presenta los detalles de la correspondiente secuencia de ADN y la secuencia peptídica finalmente codificada. En cada recuadro, la secuencia variante se compara con la secuencia de control de Holstein-Friesian y las diferencias están resaltadas en color.

La Figura 4 muestra la distribución de mutaciones identificadas en las diversas razas examinadas. El orden de las mutaciones de miostatina corresponde a la Figura 3. Todos los animales analizados fueron de doble musculación excepto para los dos Holstein-Friesian y los dos Jersey usados como controles (columna 1).

10 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El procedimiento usado para aislar genes que causan fenotipos específicos es conocido como clonación de candidatos posicionales. Implica: (i) la localización cromosómica del gen que causa el fenotipo específico usando marcadores genéticos en un análisis de vinculación; y (ii) la identificación del gen que causa el fenotipo específico entre los genes "candidatos" que se sabe que están localizados en la región correspondiente. La mayor parte de las veces estos genes candidatos se seleccionan entre información de mapeo disponible en seres humanos y ratones.

Las herramientas necesarias para realizar la localización inicial (etapa (i) anterior) son mapas de marcadores de microsatélite, que están disponibles para especies de ganadería y se encuentran en el dominio público (Bishop y col., 1994; Barendse y col., 1994; Georges y col., 1995; y Kappes, 1997). Las herramientas necesarias para la clonación de candidatos posicionales, particularmente las bibliotecas de YAC (etapa (ii) anterior) están parcialmente disponibles en el dominio público. Están disponibles bibliotecas genómicas con grandes insertos construidas con cromosomas artificiales de levadura ("YAC") en el dominio público para la mayoría de las especies de ganadería incluyendo ganado bovino. Cuando se hace referencia cruzada al mapa humano y de ratón, es necesario identificar el candidato posicional, que está disponible a baja resolución pero tiene que refinarse en cada caso específico para obtener el nivel apropiado de alta resolución. Se describen varias estrategias originales en el presente documento para conseguir este último objetivo. Para los principios generales de clonación de candidatos posicionales, véase Collins, 1995 y Georges y Andersson, 1996.

Para permitir una referencia cruzada entre el mapa génico bovino y humano como parte del enfoque de clonación de candidatos posicionales, HSA2q31-32 (mapa del brazo largo del cromosoma humano 2, bandas citogenéticas q31-32) y BTA2q12-22 (mapa del brazo del cromosoma bovino 2, bandas citogenéticas q12-22) se integraron basándose en YAC bovinos de coincidencia como se describe a continuación.

Usando una población de retrocruzamiento experimental descrita anteriormente [(normal x doble musculación) x doble musculación] que comprende 108 individuos de retrocruzamiento, se mapeó recientemente el locus *mh* por análisis de vinculación con la punta centromérica del cromosoma bovino 2 (BTA2), a 3,1 centiMorgan proximal del último marcador en el mapa de vinculación: TGLA44 (Charlier y col., 1995). También se supo a partir de trabajos previos que el pro- α (III) colágeno (*Col3A1*) estaba localizado en la misma región cromosómica que el locus *mh*. *Col3A1* se ha mapeado en BTA2q12-22 por hibridación *in situ* (Solinas-Toldo y col., 1995), mientras que se demostró que un marcador RFLP de *Col3A1* estaba estrechamente vinculado con TGLA44 ($\theta=2\%$) (Fisher y col., 1996). Esto identifica la región que flanquea *Col3A1* en el mapa humano, es decir HSA2q31-32, como el segmento cromosómico humano probablemente ortólogo. Esta suposición es compatible con los datos de experimentos Zoo-FISH (Solinas-Toldo y col., 1995) así como los datos de mapeo de marcadores Tipo I sobre híbridos de células somáticas (O'Brien y col., 1993), que establecen una correspondencia evolutiva entre segmentos de HSA2q y BTA2.

Para refinar la correspondencia entre los mapas de HSA2q31-33 y BTA2q12-22, se desarrollaron secuencias marcadas ancladas comparativas o CATS, es decir pares de cebadores que amplificarían un sitio marcador con secuencia o STS del gen ortólogo en diferentes especies (Lyons y col., 1996), para una serie de genes que flanquean *Col3A1* en el mapa humano y para los cuales hay información de secuencia disponible en más de un mamífero. Además de *Col3A1*, se obtuvieron CATS de trabajo para α 2(V) colágeno (*Col5A2*), inositol polifosfato-1 fosfatasa (*INPP1*), precursor de inhibidor de la vía del factor tisular (*TFPI*), titina (*TTN*), n-quimerina (*CHN*), glutamato descarboxilasa 67 (*GAD1*), proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (*CTLA4*) y glucoproteína CD28 de membrana celular de linfocitos T (*CD28*). Las secuencias cebadores correspondientes se dan en la Tabla 1.

Tabla 1:

CATS		
INPP1	UP: 5' CAGCAAAGTCCTTAATGGTAACAAGC 3'	DN: 5' GGGTCACTGAAGAAAACGTCTCG 3'
COL3A1	UP: 5' CCCCATATTATGGAGATGAACCG 3'	DN: 5' AGTTCAGGATGGCAGAATTTTCAG 3'
COL5A2	UP: 5' GCAAAGTGGYGGRAGCAAGACC 3'	DN: 5' TTSTTCCTGGCCTTTTATTGAGAC 3'
TFPI	UP: 5' AAGCCWGATTTCTGCTTYTTGGAAG 3'	DN: 5' TGCCMAGGCAHCCRCRCACTTGAA 3'
TTN	UP: 5' GGTCGTCCTACACCAGAAG 3'	DN: 5' GGTTGACATTGTCAAGAACAAG 3'
CHN	UP: 5' TCTCMAAAGTCGTCTGTGACAATC 3'	DN: 5' TGYTCRTTTTCTTTTCAGAGTTGC 3'
GAD1	UP: 5' RCTGGTCCTCTTCACCTCAGAAC 3'	DN: 5' ACATTGTCTVGTTCCAAAGCCAAG 3'
CTLA4	UP: 5' AGGTYCGGGTGACDGTGCTKC 3'	DN: 5' TGGRTACATGAGYTCCACCTTGC 3'

CD28	UP: 5' AGCTGCARGTATWCCTACAACT 3'	DN: 5' GTYCCRTTGCTCYTCTCRTTGYC 3'
Marcadores de microsatélite		
TGLA44	UP: 5' AACTGTATATTGAGAGCCTACCATG 3'	DN: 5' CACACCTTAGCGACTAAACCACCA 3'
BULGE27	UP: 5' CTACCTAACAGAATGATTTTGTAAAG 3'	DN: 5' AGTGTCTTGCCTAGAGAATCCCAG 3'
BULGE23	UP: 5' ACATTCTCTCACCAATATGACATAC 3'	DN: 5' TAAGTCACCATTACATCCTTAGAAC 3'
BM81124	UP: 5' GCTGTAAGAATCTTCATTAAGCACT 3'	DN: 5' CCTGATACATGCTAAGGTTAAAAAC 3'
BULGE28	UP: 5' AGGCATACATCTGGAGAGAAACATG 3'	DN: 5' CAGAGGAGCCTAGCAGGCTACCGTC 3'
BULGE20	UP: 5' CAGCAGGTCTGTTGAAGTGTATCAG 3'	DN: 5' AGTGGTAGCATTACAGGTAGCCAG 3'
BM3627	UP: 5' CAGTCCATGGCACCATAAAG 3'	DN: 5' TCCGTTAGTACTGGCTAATTGC 3'
ILSTS026	UP: 5' CTGAATTGGCTCCAAAGGCC 3'	DN: 5' AACAGAAAGTCCAGGGCTGC 3'
INRA40	UP: 5' TCAGTCTCCAGGAGAGAAAAC 3'	DN: 5' CTCTGCCCTGGGGATGATTG 3'
Cebadores de miostatina bovina		
GDF8,19	5' AATGTATGTTTATTTACCTGTTTCATG 3'	
GDF8,11	5' ACAGTGTTTGTGCAAATCCTGAGAC 3'	
GDF8,12	5' CAATGCCTAAGTTGGATTGAGTTG 3'	
GDF8,25	5' CTTG CTGTAACCTTCCCAG GACCAG 3'	
GDF8,15	5' TCCCATCCAAAGGCTTCAAATC 3'	
GDF8,21	5' ATACTCWAGGCCTAYAGCCTGTGGT 3'	
Lectura de izquierda a derecha de y hacia abajo en la tabla, las secuencias dadas en la Tabla 1 se identifican como SEC ID N° 12 a SEC ID N° 53, respectivamente.		

Estas CATS se usaron para seleccionar una biblioteca de YAC bovino equivalente de 6 genomas por PCR usando una estrategia de combinación tridimensional como se describe por Libert y col., 1993. La misma biblioteca de YAC también se seleccionó con todos los marcadores de microsatélite disponibles para BTA2 proximal, es decir TGLA44, BM81124, BM3627, ILSTS026, INRA40 y TGLA431 (Kappes y col., 1997).

El solapamiento potencial entre los YAC obtenidos con este panel de STS se exploró basándose en el contenido de STS común, así como hibridación cruzada entre el producto de SINE-PCR de los YAC individuales. A partir de este análisis, surgieron tres cóntigos independientes de YAC en la región de interés: (i) el cóntigo A que contiene los microsatélites TGLA44, BM81124 y el marcador Tipo I *INPP1*; (ii) el cóntigo B que contiene *Col3A1* y *Col5A2*; y (iii) el cóntigo C que contiene los marcadores de microsatélite BM3627, ILSTS026 y INRA40, y el marcador Tipo I *TFPI*.

Ninguno de los microsatélites disponibles mapearon en el cóntigo B, por lo tanto este grupo de YAC no pudo posicionarse en ganado bovino con respecto a los otros dos cóntigos. La información de mapeo disponible en el ser humano, sin embargo, permitió la predicción de la posición del cóntigo B entre los cóntigos A y C. Para ensayar esta hipótesis, se aislaron dos nuevos marcadores de microsatélite del cóntigo B, BULGE20 y BULGE28. BULGE20 demostró ser polimórfico, permitiendo el genotipado de la población experimental de retrocruzamiento.

Además, para aumentar la capacidad informativa de los marcadores disponibles para el cóntigo A, se desarrollaron dos nuevos marcadores de microsatélite a partir de este cóntigo: BULGE23 y BULGE27. BULGE23 demostró ser polimórfico y se usó para tipar el mismo material de genealogía.

Todos los genotipos resultantes se usaron para construir un mapa de vinculación usando el programa ILINK (Lathrop y Lalouel, 1984). Se obtuvo el siguiente orden más probable y tasas de recombinación promediadas por sexo entre marcadores adyacentes: [TGLA44-(0%)-BULGE23]-(6,1%)-BULGE20-(1,6%)-ILSTS026-(2,3%)-INRA40-(7,1%)-TGLA431. La posición de BULGE20 entre TGLA44 e ILSTS026 confirmó el orden previsto de los tres cóntigos. La Figura 1 resume la información de mapeo resultante.

Se emprendió un análisis de vinculación de múltiples puntos usando LINKMAP, para posicionar el locus *mh* con respecto al nuevo mapa de marcadores. El análisis de vinculación se realizó en un modelo recesivo simple, suponiendo penetrancia completa para individuos *mhlmh* y penetrancia cero para los otros dos genotipos. Se obtuvo la curva de valores LOD mostrada en la Figura 1, que sitúa el locus *mh* en el intervalo TGLA44-BULGE20 con un valor LOD máximo asociado de 26,4. Tres individuos de retrocruzamiento demostraron recombinar con los marcadores BULGE20 y distal, pero no con TGLA44 y BULGE23, situando por lo tanto el locus *mh* proximal de este marcador. Un individuo demostró recombinar con TGLA44 y BULGE23, pero no con los marcadores más distales, posicionando por lo tanto el locus *mh* distal de TGLA44 y BULGE23. Dada la posición relativa de estos marcadores de microsatélite con respecto a *INPP1* y *Col3A1* deducida de la integración del mapa humano y bovino, estos resultados indicaron que el gen *mh* está probablemente localizado en un segmento cromosómico unido por *INPP1* y *Col3A1*.

Recientemente, McPherron y col. (1997) demostraron que ratones homocigóticos para una delección de desactivación de *GDF-8* o *miostatina*, se caracterizaban por un aumento generalizado en la masa de músculo esquelético. Usando la secuencia publicada del ADNc de *miostatina* murina de 2676 pb (número de acceso a GenBank U84005), se identificó un grupo consenso humano provisional (THC) en la base de datos Unigene que representaba tres clones de ADNc (221299, 300367, 308202) y seis secuencias EST (marca de secuencia

expresada) (H92027, H92028, N80248, N95327, W07375, W24782). El THC correspondiente cubría 1296 pb del gen de *miostatina* humana, que muestra una homología del 78,1% con la secuencia murina cuando se promedia sobre la secuencia completa, y del 91,1% cuando se consideran solamente las partes traducidas de los genes humano y murino (566 pb). Este THC por lo tanto corresponde muy probablemente al ortólogo humano del gen de *miostatina* murina. Por tanto se prepararon los cebadores (5'-GGCCCAACTATGGATATATTTG-3' (SEC ID N° 9) y 5'-GGTCCTGGGAAGGTTACAGCA-3' (SEC ID N° 10)) para amplificar un fragmento de 272 pb desde el segundo exón de *miostatina* humana y se usaron para genotipar el panel de híbridos de radiación Genebridge-4 de genoma completo (Walter y col., 1994). Se usó el programa *RHMapper* (Slonim y col., no publicado) para posicionar el gen de *miostatina* con respecto al mapa de híbridos de radiación flanqueante Whitehead/MIT, situándolo en la posición 948,7 cR del mapa de HSA2 con un valor lod asociado > 3. Un examen más cercano del vector de segregación de miostatina y su confrontación con los vectores de todos los marcadores localizados en esa región (cesión de datos 11.9, mayo de 1997) demostró que era idéntico a EST SGC38239 situado en el mapa de híbridos de radiación Whitehead/MIT (Hudson y col., 1995) en la posición 946,8 cR de HSA2. Esto sitúa el gen de *miostatina* humana en el mapa RH en el intervalo entre *Col3A1* (EST W116343 - 942,5 cR) e *INPP1* (EST L08488 - 950,2 a 951,2 cR) (Figura 1). La *miostatina* por lo tanto pareció un candidato posicional muy fuerte para el gen *mh*.

Para ensayar la implicación potencial de *miostatina* en la determinación de la doble musculación en ganado bovino, se diseñaron pares de cebadores basados en la secuencia disponible de *miostatina* de ratón y humana, con el objetivo de amplificar la secuencia codificante completa a partir del ADNc bovino usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Siempre que fue posible, los cebadores se posicionaron por lo tanto en partes de la secuencia de *miostatina* que mostraban un 100% de homología entre ratón y ser humano. Se identificaron dos pares de cebadores que amplificaban los que se predijo que representaba el 98,4% de la secuencia codificante bovina más 74 pb de la secuencia no traducida 3', en dos fragmentos de ADN solapantes, respectivamente de 660 (cebadores GDF8.19 - GDF8.12) y 724 pb (cebadores GDF8.11 - GDF8.21) de longitud. Los productos esperados de ADN se amplificaron satisfactoriamente a partir de ADNc generado a partir de músculo esquelético tanto de un animal normal (homocigótico (SEC ID N° 1) como uno de doble musculación (homocigótico *mh/mh*) (SEC ID N° 3), y se secuenciaron cíclicamente en ambas hebras.

La secuencia nucleotídica correspondiente al alelo normal presentaba una identidad del 88,9% con la secuencia de miostatina de ratón (SEC ID N° 5) sobre un solapamiento de 1067 pb, y contenía la fase de lectura abierta esperada que codifica una proteína (SEC ID N° 2) que muestra una identidad del 92,9% en un solapamiento de 354 aminoácido con miostatina de ratón (SEC ID N° 6). Como se esperaba para un miembro de la superfamilia de TGFβ, el gen de miostatina bovina se caracteriza por un sitio de procesamiento proteolítico que se cree que media la escisión del dominio carboxi-terminal bioactivo del fragmento N-terminal más largo, y mediante nueve restos de cisteína separados por un espaciado característico y sospechoso de estar implicado en puentes disulfuro intra- e inter-moleculares (McPherron y Lee, 1996).

La secuencia nucleotídica obtenida del alelo *mh* fue idéntica al alelo normal sobre su longitud completa, excepto por una delección de 11 pb que implica los nucleótidos 821 a 831 (a partir del codón de inicio). Esta delección de desplazamiento de fase, que sucede después del primer resto de cisteína del dominio carboxi-terminal, altera drásticamente la secuencia de aminoácidos cadena abajo y revela un codón de parada prematura después de 13 aminoácidos, véase la Figura 2. La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia mutante de ácido nucleico se identifica como SEC ID N° 4. Esta mutación altera la parte bioactiva de la molécula y por lo tanto es muy probable que sea la causa del fenotipo recesivo de doble musculación. Siguiendo la nomenclatura convencional, esta mutación se mencionará como *nt829(del11)*.

Para reforzar adicionalmente la suposición de la causalidad de esta mutación, se prepararon pares de cebadores que flanquean la delección (Figura 2) y se amplificó el segmento correspondiente de ADN de todos los animales de la población de retrocruzamiento experimental. Se realizó PCR en presencia de dCTP³² para marcar de forma radiactiva el producto de amplificación. Los productos de amplificación se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se detectaron por auto-radiografía. Se esperaba un producto de 188 pb para el alelo normal y un producto de 177 pb para el alelo *nt821(del11)*. La correlación entre el fenotipo y el genotipo se ajustó para la genealogía completa. Se descubrió que los diez toros de doble musculación BBCB eran homocigóticos para la mutación *nt821(del11)*, las 41 hembras F1 eran heterocigóticas, mientras que los 53 descendientes de doble musculación eran homocigóticos para la mutación, los 55 animales convencionales restantes eran heterocigóticos.

Para examinar la distribución de la mutación *nt821(del11)* en diferentes razas convencionales y de doble musculación, se genotipó una cohorte de 25 individuos normales que representa dos razas lecheras (Holstein-Friesian, Roja-y-Blanca) y una cohorte de 52 animales de doble musculación que representa cuatro razas (BBCB, Asturiana, Maine-Anjou y Piémontese). Los resultados se resumen en la Tabla 2. Todos los animales lecheros eran normales homocigóticos excepto un toro Rojo-y-Blanco que demostró ser heterocigótico. La aparición de una pequeña fracción de individuos que portaban la mutación ganado bovino lechero no es inesperada ya que el fenotipo está ocasionalmente descrito en esta raza. En BBCB y Asturiana, todos los animales de doble musculación fueron homocigóticos para la delección *nt821(del11)*, lo que apunta hacia homogeneidad alélica en estas dos razas. Se descubrió que los animales Maine-Anjou y Piémontese de doble musculación eran "normales" homocigóticos, es decir no mostraron la delección *nt821(del11)* sino una sustitución distinta de cisteína a tirosina (*C313Y*) en animales

Piémontese de doble musculación identificados por otros (Kambadur y col., 1997).

Tabla 2:

Raza	Fenotipo	Genotipo		
		+/+	+/ <i>nt821(del11)</i>	<i>nt821(del11)/nt821(del11)</i>
Azul Belga	DM			29
Asturiana	DM			10
Piémontese	DM	8		
Maine-Anjou	DM	4		
Holstein-Friesian	Normal	13		
Roja-y-Blanca	Normal	12	1	

5 También se determinó la secuencia codificante completa para el gen de *miostatina* en individuos de doble musculación a partir de diez razas europeas de ganado bovino y se identificó una serie de mutaciones que alteraba la función miostatina.

10 La secuencia codificante de cuatro individuos de control Holstein-Friesian y Jersey fue idéntica al alelo de tipo silvestre previamente descrito (Grobet y col., 1997), lo que indica adicionalmente que era la secuencia codificante de genuina de miostatina la que se estaba amplificando, y no un pseudogén no funcional.

15 Entre los 32 animales de doble musculación, se encontraron siete variantes de secuencia de ADN dentro de la región codificante, como se resume en la Figura 3.

Además de la mutación *nt821(del11)* en el tercer exón, descrita anteriormente, se encontraron cuatro nuevas mutaciones que se esperaba que alteraran la función miostatina. Una inserción/delección en la posición 419 a partir del codón de inicio, que reemplaza 7 pares de bases con un tramo aparentemente no relacionado de 10 presente de bases, revela un codón de parada prematura en el péptido asociado a latencia N-terminal en la posición de aminoácido 140. Esta mutación se menciona como *nt419(del7-ins10)*. Dos sustituciones de pares de bases en el segundo exón, una transición C→T en la posición de nucleótido 610 y una transversión G→T en la posición de nucleótido 676, produjeron, cada una, un codón de parada prematura en el mismo péptido asociado a latencia N-terminal en las posiciones de aminoácido 204 y 226 respectivamente. Estas mutaciones se llaman *Q204X* y *E226X* respectivamente. Finalmente, una transición G→A en la posición de nucleótido 938 provoca la sustitución de una cisteína por una tirosina. Esta mutación se menciona como *C313Y*. Esta cisteína es la quinta de nueve restos de cisteína altamente conservados típicos de los miembros de la superfamilia de TGF-β y compartidos en particular por TGF-β1, -β2 y -β3, e inhibina-βA y -βB (McPherron y Lee, 1996). Se cree que están implicados en un puente disulfuro intramolecular que estabiliza la conformación tridimensional del péptido carboxi-terminal bioactivo. Su sustitución por lo tanto probablemente afecte a la estructura y función de la proteína. Esta *C313Y* recientemente también se ha descrito por Kambadur y col. (1997).

También se encontró una sustitución conservativa de fenilalanina a leucina en la posición de aminoácido 94 en el primer exón, debida a una transversión C→A en la posición de nucleótido 282 del gen de *miostatina*. Dada la naturaleza conservativa de la sustitución de aminoácido, su localización en el péptido asociado a latencia N-terminal menos conservado, y como se observó esta mutación en condiciones homocigóticas en animales que no estaba mostrando ningún síntoma de desarrollo muscular excepcional, esta mutación probablemente no interfiere drásticamente con la función miostática de la proteína codificada, en caso de hacerlo. Esta mutación se menciona como *F94L*. La proteína murina se caracteriza por una tirosina en la posición de aminoácido correspondiente.

40 También se identificó una transición silenciosa C→T en la tercera posición del 138º codón de citosina en el segundo exón, mencionada como *nt414(C-T)*.

Además de estos polimorfismos de secuencia de ADN detectados en la región codificante del gen de *miostatina*, también se encontraron cuatro variantes de secuencia de ADN en secuencias intrónicas que son probablemente polimorfismos neutros y a las que se han asignado los siguientes símbolos: *nt374-51(T-C)*, *nt374-50(G-A)*, *nt374-16(del1)* en el intrón 1, y *nt748-78(del1)* en el intrón 2 (Figura 3).

La Figura 4 muestra la distribución observada de mutaciones en la muestra analizada clasificadas por raza. Para la mayoría de las razas estudiadas, los animales analizados de doble musculación fueron homocigóticos para una de las cinco mutaciones descritas que se espera que alteren la función miostatina o heterocigóticos compuestos para dos de estas mutaciones. Esto es compatible con la hipótesis de que la condición de doble musculación tiene un modo recesivo de herencia en todas estas razas.

Solamente en Limousin y Blonde d'Aquitaine no hubo evidencias claras para el papel de las mutaciones de pérdida de función de miostatina en el determinismo de la hipertrofia muscular observada. La mayoría de los animales Limousin fueron homocigóticos para la sustitución conservativa *F94L* que es improbable que cause la hipertrofia muscular que caracteriza estos animales, como se ha analizado anteriormente. Un animal Limousin demostró ser

heterocigótico para esta mutación, siendo el otro alelo el de "tipo silvestre". Todos los animales Blonde d'Aquitaine fueron homocigóticos de "tipo silvestre". Estos datos indican que el gen de miostatina posiblemente no está implicado en la condición de doble musculación que caracteriza estas dos razas, o que existen mutaciones adicionales de miostatina fuera de la región codificante. La condición de doble musculación a menudo se considera menos pronunciada en animales Limousin en comparación con otras razas.

Los datos indican que algunas mutaciones, tales como *nt821del(11)* y *C313Y*, están compartidas por varias razas, lo que apunta hacia migración génica entre las correspondientes poblaciones, mientras que otras parecen estar confinadas a razas específicas. Además, aunque algunas razas (la raza Azul Belga en particular) parece ser esencialmente homogénea genéticamente otras muestras evidencias claras de heterogeneidad alélica (por ejemplo, Maine-Anjou).

La observación de heterogeneidad alélica desmiente la visión clásica de que una única mutación *mh* se propagó a través del continente europeo a principios del siglo 19^o con la diseminación de la raza Shortorn desde las Islas Británicas (Méniissier, 1982). Dos de las mutaciones al menos están compartidas por más de una raza, lo que indica algún grado de migración génica pero definitivamente no desde un único origen.

En ratones, y además de los ratones knock-out para miostatina generados *in vitro* (McPherron y Lee, 1997), la mutación *compact* podría deberse a una mutación de origen natural en el gen de *miostatina*. El locus *compact* se ha mapeado en el intervalo *D1Mit375-D1Mit21* en el cromosoma 1 de ratón que se sabe que es ortólogo a *HSA2q31-32* y *BTA2q12-22* (Varga y col., 1997).

Desde una perspectiva aplicada, la caracterización de un panel de mutaciones en el gen de *miostatina* asociadas con doble musculación contribuye al establecimiento de un sistema de selección de diagnóstico que permite la selección asistida por marcadores de o frente a esta condición en ganado bovino.

Ejemplo 1

Mapeo genético y físico

La integración de los mapas de HSA2q31-32 y BTA2q12-22 se hizo usando YAC coincidentes y el locus *mh* se posicionó en el intervalo flanqueado por Col3A1 y INPP1 del siguiente modo. El mapeo genético se realizó usando una población de retrocruzamiento experimental previamente descrita (Holstein-Friesian x Azul Belga) x Azul Belga a partir de 108 individuos informativos (Charlier y col., 1995). El genotipado de microsátélites se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales (Georges y col., 1995), usando las secuencias cebadoras presentadas en la Tabla 1. Los análisis de vinculación se realizaron con los programas MLINK, ILINK y LINKMAP de los paquetes LINKAGE (versión 5.1) y FASTLINK (versión 2.3P, junio de 1995) (Lathrop y Lalouel, 1984; Cottingham y col., 1993). La biblioteca de YAC se seleccionó por PCR usando un esquema de combinación tridimensional como se describe en Libert y col., 1993. Los pares de cebadores correspondientes a las CATS usadas para seleccionar la biblioteca se presentan en la Tabla 1. La hibridación cruzada entre los productos de SINE-PCR de YAC individuales se realizó de acuerdo con Hunter y col. (1996), usando cebadores presentados en Lenstra y col. (1993). Los microsátélites se aislaron de YAC de acuerdo con Cornelis y col. (1992).

Ejemplo 2

Mapeo del gen de miostatina humana sobre el panel Genebridge-4

El ADN del panel Genebridge-4 (Walter y col., 1994) se adquirió de Research Genetics (Huntsville, Alabama), y se genotipo por PCR usando procedimientos convencionales y el siguiente par de cebadores de *miostatina* humana (5'-GGCCCAACTATGGATATATTTG-3' y 5'-GGTCCTGGGAAGGTTACAGCA-3'). El mapeo se realizó mediante el servidor WWW del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research usando su programa *RH-mapper* (Slonim, D.; Stein, L.; Kruglyak, L.; Lander, E., no publicado) para posicionar los marcadores con respecto al mapa flanqueante. Se compararon vectores de segregación de los marcadores de consulta con los vectores de todos los marcadores en la región de interés en la cesión de datos completa 11.9 (mayo de 1997) para obtener una posición más precisa. Esto posiciona la miostatina en el INPP1-Col3A1 en el mapa humano con valor LOD superior a 3.

Ejemplo 3

RT-PCR

Para clonar el ortólogo de miostatina bovina se escogió una estrategia basada en amplificación por RT-PCR de ADNc de músculo esquelético. Se extrajo el ARN total de músculo esquelético (*Triceps brachialis*) de acuerdo con Chirgwin y col. (1979). Se realizó RT-PCR usando el kit de PCR de ARN Gene-Amp (Perkin-Elmer) y los cebadores presentados en la Tabla 1. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación por PCR QiaQuick (Qiagen) y se secuenciaron usando la reacción lista para secuenciación cíclica con terminador con colorante (Perkin-Elmer) y un secuenciador automático ABI373, usando los cebadores presentados en la Tabla 2.

Ejemplo 4

Diagnóstico de la delección nt821(del11)

5 Para diagnosticar nt821(del11) se diseñaron las siguientes secuencias cebadoras que flanquean la delección
 nt821(del11): 5'-TCTAGGAGAGATTTTGGGCTT-3' (SEC ID N° 53) y 5'-GATGGGTATGAGGATACTTTTGC-3' (SEC
 ID N° 52). Estos cebadores amplifican un fragmento de 188 pb de individuos normales y un fragmento de 177 pb de
 10 individuos de doble musculación. Los individuos heterocigóticos muestran los dos productos de amplificación. Estos
 productos de amplificación pueden detectarse usando una diversidad de procedimientos. En este ejemplo el
 producto de PCR se marcó por incorporación de dCTP³², se separó en un gel desnaturalizante de acrilamida y se
 reveló por auto-radiografía. Otros enfoques que podrían usarse para distinguir los tres fenotipos diferentes son
 conocidos para los especialistas en la técnica e incluirían separación en geles de agarosa y visualización con
 bromuro de etidio, secuenciación directa, ensayos TaqMan, hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo,
 15 dot-blot inversa, análisis de RFLP y varios otros. La especificidad del ensayo está ligada a la mutación detectada y
 no a los cebadores usados en el procedimiento de detección. Eso significa que pueden diseñarse fácilmente otros
 cebadores basándose en dicha secuencia de miostatina bovina que cumplirían los mismos requisitos.

Ejemplo 5

20 Determinación de mutaciones en otras razas

Se muestreó un total de 32 animales con desarrollo muscular extremo a partir de diez razas europeas de ganado
 vacuno en que se sabe que la doble musculación sucede a frecuencia alta a moderada: (i) Bélgica: Azul Belga (4),
 (ii) Francia: Blonde d'Aquitaine (5), Charolais (2), Gasconne (2), Limousin (5), Maine-Anjou (4), Parthenaise (3), (ii)
 25 España: Asturiana (2), Rubia Gallega (2), (iv) Italia: Piedmontese (2). La determinación del fenotipo de doble
 musculación de los animales muestreados se realizó visualmente por observadores experimentados. Se analizaron
 cuatro animales con fenotipo convencional muestreados de las poblaciones lecheras Holstein-Friesian (2) y Jersey
 (2) como controles.

30 Para facilitar el estudio de la secuencia codificante de miostatina a partir de ADN genómico, se determinaron las
 secuencias de los límites exón-intrón del gen bovino. En ratones, se sabe que el gen de *miostatina* está interrumpido
 por dos intrones, respectivamente ≈ 1,5 y 2,4 kb de longitud (McPherron y Lee, 1997). Por tanto se diseñaron dos
 pares de cebadores, respectivamente, en los exones bovinos 1 y 2, y los exones 2 y 3, que se había predicho que
 35 flanquean los dos intrones, suponiendo la conservación de la organización génica entre ratón y ganado bovino
 (Figura 3 y Tabla 3). Usando estos conjuntos de cebadores, se generaron dos productos de PCR respectivamente
 de 2 kb y 3,5 kb de longitud a partir de un clon YAC (179A3) que contenía el gen de miostatina bovina (Grobet y col.,
 1997). Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación por PCR QiaQuick (Qiagen) y se
 secuenciaron parcialmente usando la reacción lista para secuenciación cíclica con terminador con colorante (Perkin-
 Elmer) y un secuenciador automático ABI373. La alineación con la secuencia de ADNc bovina identificó los cuatro
 40 límites predichos exón-intrón. La secuencia nucleotídica correspondiente al ADN genómico bovino se identifica como
 SEC ID N° 54.

Tabla 3: Cebadores usados para amplificación por PCR y secuenciación cíclica.

Intrón1-5'	5'-GAAGACGATGACTACCAC GCCAGGACG-3'	Intrón1-3'	5'-CTAGTTTATTGTATTGTATCTT AGAGC-3'
Intrón2-5'	5'-AGACTCCTACAACAGTGT TTGT-3'	Intrón2-3'	5'-ATACTCWAGGCCTAYAGCCT GTGGT-3'
Exón1-5'	5'-ATTCACCTGGTGTGGCAAG TTGTCTCTCAGA-3'	Exón1-3'	5'-CCCTCCTCCTTACATACAAGC CAGCAG-3'
Exón2-5'	5'-GTTTCATAGATTGATATGG AGGTGTTTCG-3'	Exón2-3'	5'-ATAAGCACAGGAAACTGGTAG TTATT-3'
Exón3-5'	5'-GAAATGTGACATAAGCAA AATGATTAG-3'	Exón3-3'	5'-ATACTCWAGGCCTAYAGCCT GTGGT-3'
Exón1-Sec1	5'-TTGAGGATGTAGTGT CC-3'	Exón1-Sec2	5'-GCCATAAAAATCCAATCCTC AG-3'
Exón2-Sec1	5'-CATTTATAGCTGATCTTC TAACGCAAG-3'	Exón2-Sec2	5'-TGTCGCAGGAGTCTTGACAG GCCTCAG-3'
Exón2-Sec3	5'-GTACAAGGTATACTGGAA TCCGATCTC-3'		
Exón3-Sec1	5'-AGCAGGGGCCGCTGAA CCTCTGGG-3'	Exón3-Sec2	5'-CCCCAGAGTTTCCAGCCGCC CCTGC-3'

Basándose en las secuencias exónicas e intrónicas disponibles del gen de miostatina bovina, se diseñaron tres pares de cebadores que permiten de forma conjunta la amplificación conveniente de la secuencia codificante completa a partir del ADN genómico. La posición de los cebadores correspondientes se muestra en la Figura 3, y las secuencias correspondientes se presentan en la Tabla 3.

5 Después de amplificación por PCR de la secuencia codificante completa a partir del ADN genómico en los tres fragmentos descritos, éstos se purificaron usando el kit de purificación por PCR QiaQuick (Qiagen) y se secuenciaron usando la reacción lista para secuenciación cíclica con terminador con colorante (Perkin-Elmer) y un secuenciador automático ABI373, usando los cebadores usados para la amplificación así como una serie de
10 cebadores anidados (Figura 3 y Tabla 3). Los archivos con coloración producidos con el secuenciador ABI373 se analizaron con la aplicación *Polyphred* (D. Nickerson, comunicación personal), que es parte de una serie de programas de análisis de secuencia incluyendo *Phred* (Ewing, B. y Green, P. (1992), no publicado), *Phrap* (Green, P. (1994), no publicado) y *Consed* (Gordon, D. (1995), no publicado), pero lo haría cualquier programa de secuenciación adecuado, como saben los especialistas en la técnica.

15 Pueden ser útiles anticuerpos monoclonales (Mab) específicos para *miostatina*. En el caso de la proteína bovina que tiene la secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID N° 2, por ejemplo, pueden usarse anticuerpos con fines de diagnóstico tal como para determinar los niveles de proteína miostatina en tejido muscular. Para producir estos anticuerpos, se prepara miostatina purificada. La miostatina puede producirse en células bacterianas como una
20 proteína de fusión con glutatión-S-transferasa usando el vector pGEX2 (Pharmacia). Esto permite la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad a GSH. En otro enfoque, la miostatina se expresa como una proteína de fusión con el dominio bacteriano de unión a maltosa. La proteína de fusión por tanto se recupera de extractos bacterianos pasando el extracto sobre una columna de resina de amilosa seguido de elución de la proteína de fusión con maltosa. Para esta construcción de fusión, puede usarse el vector pMalC2, disponible en el mercado
25 en New England Biolabs. Puede ser útil la preparación de una segunda proteína de fusión en la selección preliminar de Mab.

La generación de hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína miostatina se realiza del siguiente modo: a ratones BALB/c se les inyecta por vía intraperitoneal adyuvante proteico tres veces a
30 intervalos de un mes, seguido de una inyección final en la vena de la cola poco antes de la fusión celular. Se recogen células del bazo y se fusionan con células de mieloma NS-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) usando polietilenglicol 4000 de acuerdo con protocolos convencionales (Kennett, 1979; Mirski, 1989). El proceso de fusión celular se realiza como se describe en más detalle a continuación.

35 Las células fusionadas se siembran en placas de 96 pocillos con células de exudado peritoneal y esplenocitos irradiados de ratones BALB/c como capas de alimentación y se realiza selección con hipoxantina, aminoptericina, y timidina (medio HAT).

40 Se usa un ensayo ELISA como procedimiento de selección inicial. Se usan 1-10 µg de miostatina purificada (escindida de la proteína de fusión) en PBS para recubrir pocillos individuales, y se incuban 50-100 µl por pocillo de sobrenadantes de hibridoma. Se usan anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano rusticano para el ensayo colorimétrico.

45 Los hibridomas positivos se clonan por dilución limitante y se cultivan a gran escala para congelación y producción de anticuerpos. Se seleccionan diversos hibridomas positivos por su utilidad en transferencia de western e inmunohistoquímica, así como para reactividad cruzada con proteínas miostatina de diferentes especies, por ejemplo las proteínas de ratón y humana.

50 Como alternativa, puede realizarse inmunización activa mediante la generación de un anticuerpo endógeno por exposición directa del animal huésped a pequeñas cantidades de antígeno. La inmunización activa implica la inyección de cantidades insignificantes de antígeno (g) que probablemente no inducirán una respuesta fisiológica y se degradarán rápidamente. El antígeno solamente tendrá que administrarse como inmunizaciones de sensibilización y refuerzo de forma muy parece a las técnicas usadas para conferir resistencia a enfermedades (Pell y col., 1997).

55 Por supuesto se entenderá que es posible una diversidad de sustituciones de aminoácidos conservando al mismo tiempo la estructura responsable de la actividad miostatina de las proteínas desveladas en el presente documento. Se describen sustituciones conservativas en la bibliografía de patentes, como por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.264.558 o 5.487.983. Por tanto se espera, por ejemplo, que fuera posible intercambio entre aminoácidos neutros alifáticos no polares, glicina, alanina, prolina, valina e isoleucina. Asimismo, podría ser posible hacer
60 sustituciones entre los aminoácidos neutros alifáticos polares, serina, treonina, metionina, asparagina y glutamina. Probablemente podrían hacerse sustituciones entre los aminoácidos ácidos cargados, ácido aspártico y ácido glutámico, como también sustituciones entre los aminoácidos básicos cargados, lisina y arginina. Probablemente también serían posibles sustituciones entre los aminoácidos aromáticos, incluyendo fenilalanina, histidina, triptófano y tirosina. Estas clases de sustituciones e intercambios son bien conocidos para los especialistas en la técnica.
65 Podrían ser también posibles otras sustituciones. Por supuesto, también se esperaría que cuanto mayor sea el porcentaje de homología, es decir, la similitud de secuencia, de una proteína variante con una proteína de origen

natural, mayor será la retención de la actividad metabólica. Por supuesto, como las variantes proteicas que tienen la actividad de miostatina como se describe en el presente documento pretenden estar dentro del alcance de la presente invención, también los ácidos nucleicos que codifican dichas variantes.

5 Puede obtenerse una ventaja adicional a través de formas quiméricas de la proteína, como se sabe en la técnica. Por tanto podría ligarse una secuencia de ADN que codifica la proteína completa, o una parte de la proteína, por ejemplo, con una secuencia que codifica la parte C-terminal de β -galactosidasa de *E. coli* para producir una proteína de fusión. Se describe un sistema de expresión para las glucoproteínas F y G del virus sincitial respiratorio humano en la patente de Estados Unidos N° 5.288.630 expedida el 22 de febrero de 1994, por ejemplo.

10 Un vector de expresión recombinante puede ser un plásmido, como se ha descrito anteriormente. El vector de expresión recombinante de la invención puede ser adicionalmente un virus, o parte del mismo, que permite la expresión de un ácido nucleico introducido en el ácido nucleico viral. Por ejemplo, pueden usarse retrovirus deficientes en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados.

15 Se describe un kit de diagnóstico para identificar células que comprenden una molécula que se une a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2, por ejemplo, para su incubación con una muestra de células tumorales; un medio para detectar la molécula unida a la proteína, proteína sin reaccionar o molécula no unida; un medio para determinar la cantidad de proteína en la muestra; y un medio para comparar la cantidad de proteína en la muestra con un patrón. La molécula puede ser un anticuerpo monoclonal.

La detectabilidad de la molécula que se une a miostatina puede activarse mediante dicha unión (por ejemplo, cambio en el espectro de fluorescencia, pérdida de marcador radioisotópico). El kit de diagnóstico también puede contener un manual de instrucciones para el uso del kit.

25 Se desvela adicionalmente un kit de diagnóstico para identificar células que comprende una sonda nucleotídica complementaria a la secuencia, o un fragmento oligonucleotídico de la misma, mostrada en la SEC ID N° 1, por ejemplo, para su hibridación con ARNm de una muestra de células, por ejemplo, células musculares; un medio para detectar la sonda nucleotídica unida al ARNm en la muestra con un patrón. En un aspecto particular, la invención es una sonda que tiene una molécula de ácido nucleico suficientemente complementaria a una secuencia identificada como SEC ID N° 1, o su complemento, de modo que se una a la misma en condiciones rigurosas. "Condiciones rigurosas de hibridación" adopta su significado común para un especialista en la técnica aquí. Las condiciones rigurosas apropiadas que promueven la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, cloruro sódico 6x/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C son conocidas para los especialistas en la técnica. Los siguientes ejemplos se encuentran en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6: Para 50 ml de una primera solución de hibridación adecuada, mezclar juntos 24 ml de formamida, 12 ml de SSC 20x, 0,5 ml de Tris-HCl 2 M pH 7,6, 0,5 ml de solución de Denhardt 100x, 2,5 ml de H₂O desionizada, 10 ml de sulfato de dextrano al 50%, y 0,5 ml de SDS al 10%. Una segunda solución de hibridación adecuada puede ser BSA cristalina al 1% (fracción V), EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 0,5 M pH 7,2, SDS al 7%. La concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse entre una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2x a 50°C hasta una elevada rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2x a 50°C. Estas dos soluciones de lavado pueden contener SDS al 0,1%. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta rigurosidad, a aproximadamente 65°C. La referencia citada da más detalles, pero la rigurosidad apropiada del lavado depende del grado de homología y longitud de la sonda. Si la homología es del 100%, puede usarse una alta temperatura (65°C a 75°C). Si la homología es baja, deben usarse temperaturas inferiores de lavado. Sin embargo, si la sonda es muy corta (<100 pb), deben usarse temperaturas inferiores incluso con homología del 100%. En general, se empieza el lavado a bajas temperaturas (37°C a 40°C), y se eleva la temperatura en intervalos de 3-5°C hasta que el fondo es suficientemente bajo para no ser un factor principal en auto-radiografía. El kit de diagnóstico también puede contener un manual de instrucciones para el uso del kit. La invención proporciona un kit de diagnóstico definido en las reivindicaciones que puede usarse para determinar el genotipo de material genético de mamífero, por ejemplo. Un kit incluye un conjunto de cebadores usados para amplificar el material genético. Un kit puede contener un cebador que incluye una secuencia nucleotídica para amplificar una región del material genético que contiene una de las mutaciones de origen natural descritas en el presente documento. Dicho kit también podría incluir un cebador para amplificar la región correspondiente del gen normal que produce miostatina funcional. Habitualmente, dicho kit también incluiría otro cebador cadena arriba o cadena abajo de la región de interés complementaria a una parte codificante y/o no codificante del gen. Un kit particular incluye un cebador seleccionado entre una secuencia no codificante de un gen de miostatina. Ejemplos de dichos cebadores se proporcionan en la Tabla 3, denominados como Exón1-5', Exón1-3', Exón2-5', Exón3-5' y Exón3-3'. Estos cebadores se usan para amplificar el segmento que contiene la mutación de interés. El genotipado real se realiza usando cebadores que abordan mutaciones específicas descritas en el presente documento y que podrían funcionar como oligonucleótidos específicos de alelo en hibridación convencional, ensayos Taqman, ensayos OLE, etc. Como alternativa, los cebadores pueden diseñarse para permitir el genotipado por microsecuenciación.

65 Un kit de cebadores por tanto incluye un primer, segundo y tercer cebadores, (a), (b) y (c), respectivamente. El cebador (a) se basa en una región que contiene una mutación de miostatina, por ejemplo una región del gen de

miostatina que abarca la delección *nt821del(11)*. El cebador (b) codifica una región cadena arriba o cadena abajo de la región a amplificar por el cebador (a) de modo que se amplifique el material genético que contiene la mutación, por PCR, por ejemplo, en presencia de los dos cebadores. El cebador (c) se basa en la región correspondiente a aquella en que se basa el cebador (a), pero que carece de la mutación. Por tanto, se amplificará el material genético que contiene la región no mutada en presencia de los cebadores (b) y (c). El material genético homocigótico para el gen de tipo silvestre por tanto proporcionará productos amplificados en presencia de los cebadores (b) y (c). El material genético homocigótico para el gen mutado por tanto proporcionará productos amplificados en presencia de los cebadores (a) y (b). El material genético heterocigótico proporcionará productos amplificados en ambos casos.

- 5
- 10 Se describen proteínas purificadas que tienen actividad biológica de miostatina. Los términos "aislado" y "purificado" se refieren cada uno a una proteína sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza de forma química. En ciertos aspectos, la proteína que tiene actividad biológica de miostatina comprende una secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID N° 2. Además, se abarcan proteínas que tienen actividad biológica de miostatina que están codificadas por ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas, como se ha analizado anteriormente, con un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 7.

15

20 Pueden obtenerse proteínas que tienen actividad miostatina por expresión en una célula huésped adecuada usando técnicas conocidas en la técnica. Las células huésped adecuadas incluyen organismos o líneas celulares procariontas o eucariotas, por ejemplo, levaduras, *E. coli*, células de insecto y células COS 1.

Se desvelan los siguientes puntos:

- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
1. Un procedimiento para aumentar la masa muscular de un mamífero que tiene células musculares en que se expresa miostatina, comprendiendo el procedimiento administrar al mamífero una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico sustancialmente complementaria a al menos una parte de ARNm que codifica la miostatina y que es de suficiente longitud para reducir suficientemente la expresión de la miostatina para aumentar la masa muscular.
 2. El procedimiento del punto 1 en el que el mamífero es bovino.
 3. Un procedimiento para aumentar la masa muscular de un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar al mamífero una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que tiene actividad ribozima y una secuencia nucleotídica sustancialmente complementaria a al menos una parte de ARNm que codifica miostatina y que es de suficiente longitud para unirse selectivamente a la misma para reducir suficientemente la expresión de la miostatina para aumentar la masa muscular.
 4. El procedimiento del punto 3 en el que el mamífero es bovino.
 5. Un kit de diagnóstico, para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero del cual se ha obtenido una muestra que contiene ADN del mamífero, comprendiendo el kit:
 - primer y segundo cebadores para amplificar el ADN, siendo los cebadores complementarios a secuencias nucleotídicas del ADN cadena arriba y cadena abajo, respectivamente, de una mutación en la parte del ADN que codifica miostatina que provoca hiperplasia muscular del mamífero, en el que al menos una de las secuencias nucleotídicas se selecciona para que sea de una región no codificante del gen de miostatina.
 6. El kit de diagnóstico del punto 5, que comprende adicionalmente un tercer cebador complementario a una mutación de origen natural de una parte codificante del gen de miostatina.
 7. Un kit de diagnóstico, para determinar el genotipo de una muestra de material genético de mamífero, comprendiendo el kit: un par de cebadores para amplificar una parte del material genético correspondiente a una secuencia nucleotídica que codifica al menos una parte de una proteína miostatina, en el que un primero de los cebadores incluye una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a una mutación de la SEC ID N° 1 para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la mutación, seleccionándose la mutación entre el grupo de mutaciones resultantes de: (a) delección de 11 nucleótidos empezando en el nucleótido 821 de la parte codificante de la SEC ID N° 1; (b) delección de 7 nucleótidos empezando en el nucleótido 419 de la secuencia codificante e inserción de la secuencia AAGCATACAA en el lugar de la misma; (c) delección del nucleótido 204 de la secuencia codificante e inserción de T en el lugar de la misma; (d) delección del nucleótido 226 de la secuencia codificante e inserción de T en el lugar de la misma; y (e) delección del nucleótido 313 de la secuencia codificante e inserción de A en el lugar de la misma; y combinaciones de las mismas.
 8. El kit de diagnóstico del punto 7 en el que un segundo del par de cebadores está localizado completamente cadena arriba o completamente cadena abajo de la mutación o mutaciones seleccionadas.

- 5 9. El kit de diagnóstico del punto 8 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (a) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 11 para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la SEC ID N° 11.
- 10 10. El kit de diagnóstico del punto 8 en el que un dicho primer cebador es suficientemente complementario a la secuencia insertada de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la mutación (b) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia correspondiente a la delección de 7 nucleótidos de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la delección de 7 nucleótidos de la mutación (b).
- 15 11. El kit de diagnóstico del punto 8 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (c) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la región correspondiente que carece de la mutación (c) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (c).
- 20 12. El kit de diagnóstico del punto 8 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (d) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la región correspondiente que carece de la mutación (d) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (d).
- 25 13. El kit de diagnóstico del punto 8 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (e) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la región correspondiente que carece de la mutación (e) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (e).
- 30 14. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino, comprendiendo el procedimiento:
 obtener una muestra de material que contiene ADN de dicho animal; y averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, en el que la ausencia de ADN que tiene dicha secuencia nucleotídica indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.
- 35 15. El procedimiento del punto 14 en el que averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
- 40 16. El procedimiento del punto 15 en el que el ADN de dicho animal bovino que no presenta hiperplasia muscular tiene una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia identificada como SEC ID N° 1 en condiciones rigurosas de hibridación.
- 45 17. El procedimiento del punto 14, en el que averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica el extremo N-terminal y el C-terminal, respectivamente, de la proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
- 50 18. El procedimiento del punto 14, en el que averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ADN en presencia de un primer y segundo cebadores basados en una primera y segunda secuencias nucleotídicas que codifican regiones apartadas entre sí de la proteína, en el que dichas regiones flanquean una mutación que se sabe que sucede de forma natural y que cuando está presente en ambos alelos de dicho animal provoca dicha hiperplasia muscular.
- 55 19. El procedimiento del punto 18 en el que un ADN de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular contiene una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID N° 2 y la secuencia codificante de ADN de dicho animal que presenta hiperplasia muscular se sabe que contiene una delección de 11 pares de bases que empieza en el par de bases n° 821, y dicho primer cebador se selecciona para estar cadena arriba del codón que codifica el ácido glutámico n° 275 y el segundo cebador se selecciona para estar cadena abajo del codón que codifica el ácido aspártico n° 274.
- 60 20. El procedimiento del punto 14 en el que un ADN de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular contiene una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID N° 2 y la secuencia codificante de ADN
- 65

de dicho animal que presenta hiperplasia muscular se sabe que contiene una delección de 11 pares de bases que empieza en el par de bases nº 821, y dicho cebador se selecciona para abarcar la secuencia nucleotídica que incluye los pares de bases nº 820 y 821 de la secuencia de ADN que contiene dicha delección.

- 5 21. El procedimiento del punto 19 en el que el animal es de una raza seleccionada entre Azul Belga, Asturiana, Parthenaise y Rubia Gallega.
22. El procedimiento del punto 20 en el que el animal es una raza seleccionada entre Azul Belga, Asturiana, Parthenaise y Rubia Gallega.
- 10 23. El procedimiento del punto 14 en el que averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ADN en presencia de un cebador que contiene al menos una parte de una mutación que se sabe que sucede de forma natural y que cuando está presente en ambos alelos de dicho animal provoca dicha hiperplasia muscular.
- 15 24. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino, comprendiendo el procedimiento:
- 20 obtener una muestra de material que contiene ADN de dicho animal; y
 averiguar si está presente ADN que tiene una mutación definida en el punto 7; y
 averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, en el que la ausencia de ADN que tiene dicha secuencia nucleotídica y la presencia de dicha mutación indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.
- 25 25. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino, comprendiendo el procedimiento:
- 30 obtener una muestra del animal que contiene ARNm; y
 averiguar si está presente un ARNm que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina en la muestra, en el que la ausencia de dicho ARNm indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.
26. El procedimiento del punto 25 en el que la muestra es de tejido muscular o en el que el tejido es tejido de músculo esquelético.
- 35 27. El procedimiento del punto 25 en el que averiguar si está presente ARNm que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ARNm en presencia de cebadores sustancialmente complementarios a la secuencia nucleotídica que codifica la proteína.
- 40 28. El procedimiento del punto 27 en el que el ARNm de dicho animal bovino que no presenta hiperplasia muscular tiene una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia identificada como SEC ID Nº 1 en condiciones rigurosas de hibridación.
- 45 29. El procedimiento del punto 25, en el que averiguar si está presente ARNm que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ARNm en presencia de cebadores sustancialmente complementarios a una secuencia nucleotídica que codifica el extremo N-terminal y el C-terminal, respectivamente, de la proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
- 50 30. El procedimiento del punto 25, en el que averiguar si está presente ARNm que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ARNm en presencia de un primer y segundo cebadores sustancialmente complementarios a una primera y segunda secuencias nucleotídicas que codifican regiones apartadas entre sí de la proteína, en el que dichas regiones flanquean una mutación que se sabe que sucede de forma natural y que cuando está presente en ambos alelos de dicho animal provoca dicha hiperplasia muscular.
- 55 31. El procedimiento del punto 30 en el que un ARNm de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular contiene una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID Nº 2 y la secuencia codificante de ADN de dicho animal que presenta hiperplasia muscular se sabe que contiene una delección de 11 pares de bases que empieza en el par de bases nº 821, y dicho primer cebador se selecciona para estar cadena arriba del codón que codifica el ácido glutámico nº 275 y el segundo cebador se selecciona para estar cadena abajo del codón que codifica el ácido aspártico nº 274.
- 60 32. El procedimiento del punto 25 en el que averiguar si está presente ARNm que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina incluye amplificar el ARNm en presencia de un cebador que contiene una secuencia nucleotídica complementaria a al menos una parte de una mutación que se sabe que sucede de forma natural en dicho animal y que cuando está presente en ambos alelos
- 65

de dicho animal provoca dicha hiperplasia muscular.

- 5 33. El procedimiento del punto 32 en el que un ARNm de dicho animal que no presenta hiperplasia muscular contiene una secuencia nucleotídica que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia identificada como SEC ID N° 2 y la secuencia codificante de ADN de dicho animal que presenta hiperplasia muscular se sabe que contiene una delección de 11 pares de bases que empieza en el par de bases nº 821, y dicho cebador se selecciona para abarcar la parte delecionada.
- 10 34. El procedimiento del punto 31 en el que el animal es de una raza seleccionada entre Azul Belga, Asturiana, Parthenaise y Rubia Gallega.
- 15 35. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:
 obtener una muestra de material que contiene ADN del mamífero; y
 averiguar si está presente una secuencia del ADN que codifica (a) una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, y si está presente una secuencia del ADN que codifica (b) una proteína alélica que carece de la actividad de (a); en el que la ausencia de (a) y la presencia de (b) indica la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.
- 20 36. El procedimiento del punto 35 en el que (b) contiene una mutación de origen natural responsable de la ausencia de actividad.
- 25 37. El procedimiento del punto 35 en el que el mamífero es un ser humano.
- 30 38. El procedimiento del punto 37 en el que averiguar si está presente una secuencia del ADN que codifica (a), y si está presente una secuencia del ADN que codifica (b) incluye amplificar el ADN en presencia de cebadores basados en una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
- 35 39. El procedimiento del punto 38 en el que dichos cebadores se basan en la secuencia identificada como SEC ID N° 7.
- 40 40. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:
 obtener una muestra de material que contiene ARNm del mamífero; y
 averiguar si está presente una secuencia del ARNm que codifica (a) una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, y si está presente una secuencia del ARNm que codifica (b) una proteína al menos parcialmente codificada por una secuencia nucleotídica truncada correspondientes a sustancialmente la secuencia del ARNm y que carece de la actividad de (a);
 en el que la ausencia de (a) y la presencia de (b) indica la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.
- 45 41. El procedimiento del punto 40 en el que el ARNm que codifica (a) y la secuencia truncada corresponden a alelos de ADN del mamífero.
- 50 42. El procedimiento del punto 40 en el que el mamífero es humano.
- 55 43. El procedimiento del punto 42 en el que averiguar si está presente una secuencia del ARNm que codifica (a), y si está presente una secuencia del ARNm que codifica (b) incluye amplificar el ARNm en presencia de un par de cebadores complementarios a una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
- 60 44. El procedimiento del punto 43 en el que cada uno de dichos cebadores contiene una secuencia nucleotídica truncada sustancialmente complementaria a una parte de la secuencia identificada como SEC ID N° 7.
- 65 45. El procedimiento del punto 44 en el que la secuencia truncada contiene al menos 50 nucleótidos consecutivos sustancialmente correspondientes a aproximadamente 10, o entre aproximadamente 10 y 20, o entre aproximadamente 20 y 30, o entre aproximadamente 30 y 40, o entre aproximadamente 40 y 50 nucleótidos consecutivos de la SEC ID N° 7.
46. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:
 obtener una muestra tisular que contiene ARNm del mamífero; y
 averiguar si está presente un ARNm que codifica una proteína miostatina de tipo mutante que carece de actividad biológica de miostatina, en el que la presencia de dicho ARNm que codifica una proteína miostatina

de tipo mutante indica la presencia de hiperplasia muscular en el mamífero.

47. El procedimiento del punto 46 en el que la proteína miostatina de tipo mutante que carece de actividad biológica está codificada por un alelo de origen natural de ADN que codifica el ARNm.

5 48. Un procedimiento para determinar la presencia de doble musculación en un animal bovino, comprendiendo el procedimiento:

10 obtener una muestra de material que contiene ADN del animal; y
averiguar si el ADN contiene la secuencia nucleotídica codificante identificada como SEC ID N° 11, en el que la ausencia de la secuencia indica doble musculación en el animal.

15 49. El procedimiento del punto 34 en el que el animal es de una raza seleccionada entre Azul Belga, Asturiana, Parthenaise y Rubia Gallega.

50. Un procedimiento para determinar el genotipo de miostatina de un mamífero, que comprende:

20 obtener una muestra de material que contiene ácido nucleico del mamífero, en el que el ácido nucleico está sin contaminar por ácido nucleico heterólogo;
averiguar si la muestra contiene (i) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina; y
averiguar si la muestra contiene (ii) una molécula de ácido nucleico alélico que codifica una proteína que carece de actividad biológica de miostatina.

25 51. El procedimiento del punto 50 en el que el mamífero es humano y (i) comprende una secuencia de ácido nucleico sustancialmente homóloga a la secuencia identificada como SEC ID N° 7.

30 52. Una proteína purificada que tiene actividad biológica de miostatina, y que tiene una secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID N° 2, o una variante sustituida de forma conservativa de la misma.

53. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica una proteína del punto 52.

35 54. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una molécula de ADN que tiene la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 1 o que varía de la secuencia debido a la degeneración del código genético, o una hebra de ácido nucleico capaz de hibridar con al menos una dicha molécula de ácido nucleico en condiciones rigurosas de hibridación.

40 55. ARNm aislado transcrito de ADN que tiene una secuencia que corresponde con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 54.

56. ADN aislado que tiene una secuencia de acuerdo con el punto 54 en un vector de clonación recombinante.

45 57. Una célula microbiana que contiene y que expresa ADN heterólogo que es complementario a una molécula de ácido nucleico del punto 54.

58. Una línea celular transfectada que expresa una proteína del punto 52.

59. Un proceso para producir la proteína del punto 52 que comprende:

50 preparar un fragmento de ADN que incluye una secuencia nucleotídica que codifica dicha proteína; incorporar el fragmento de ADN en un vector de expresión para obtener una molécula de ADN recombinante que incluye el fragmento de ADN y es capaz de experimentar replicación;
transformar una célula huésped con dicha molécula de ADN recombinante para producir un transformante que puede expresar dicha proteína;
55 cultivar el transformante para producir dicha proteína; y
recuperar dicha proteína de la mezcla cultivada resultante.

60 60. Un procedimiento para aumentar la masa muscular en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo contra miostatina a dicho mamífero.

61. Un procedimiento para aumentar la masa muscular en un mamífero, que comprende crear un auto-anticuerpo contra la miostatina en el mamífero.

65 62. El procedimiento del punto 61 en el que la creación del auto-anticuerpo incluye administrar una proteína que tiene actividad miostatina al mamífero.

63. Un procedimiento para aumentar la masa muscular en un mamífero que lo necesite, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un ácido nucleico antisentido u oligonucleótido sustancialmente complementario a al menos una parte de la secuencia identificada como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 5, o SEC ID N° 7.
- 5 64. El procedimiento del punto 63 en el que la parte es de al menos 5 bases nucleotídicas de longitud.
65. El procedimiento del punto 64 en el que el mamífero es un bovino y la secuencia es la secuencia identificada como SEC ID N° 1.
- 10 66. Un procedimiento para aumentar la masa muscular en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la miostatina.
67. Una sonda que comprende una molécula de ácido nucleico suficientemente complementaria con una secuencia identificada como SEC ID N° 1, o su complemento, de modo que se una a la misma en condiciones rigurosas.
- 15 68. La sonda del punto 67 en el que la secuencia es entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 15 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 25 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 35 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 45 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 55 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 65 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 75 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 85 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 95 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 105 y 1195 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 115 y 1195 nucleótidos de longitud.
- 20 69. Un procedimiento para identificar una secuencia nucleotídica de un gen mutante que codifica una proteína miostatina de un mamífero que presenta hiperplasia muscular, comprendiendo el procedimiento:
- 30 obtener una muestra de material que contiene ADN del mamífero; y
 sondear la muestra usando una sonda de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica de un gen conocido codificante de miostatina para identificar la secuencia nucleotídica del gen mutante.
- 35 70. El procedimiento del punto 69, en el que la sonda se basa en una secuencia nucleotídica de una región no codificante del gen.
71. El procedimiento del punto 70 en el que la sonda se basa en la SEC ID N° 54.
- 40 72. El procedimiento del punto 71 en el que la sonda es de al menos 8 ácidos nucleicos de longitud.
73. El procedimiento del punto 69, en el que la etapa de sondear la muestra incluye exponer el ADN a la sonda en condiciones de hibridación y que comprende adicionalmente aislar moléculas hibridadas de ácidos nucleicos.
- 45 74. El procedimiento del punto 73, que comprende adicionalmente la etapa de secuenciar ADN aislado.
75. El procedimiento del punto 69, en el que el mamífero es un mamífero bovino y la sonda se basa en una dicha secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 1.
- 50 76. El procedimiento del punto 74, que comprende adicionalmente la etapa de aislar y secuenciar un ADNc o ARNm que codifica la proteína miostatina mutante completa.
77. El procedimiento del punto 71, que comprende adicionalmente la etapa de aislar y secuenciar una miostatina de tipo silvestre funcional de dicho mamífero que no presenta hiperplasia muscular.
- 55 78. El procedimiento del punto 76, que comprende adicionalmente comparar la secuencia codificante completa de la proteína miostatina mutante completa con, si la secuencia codificante para una miostatina de tipo silvestre funcional de dicho mamífero es previamente conocida, (1) la secuencia conocida, o si la secuencia codificante para una miostatina de tipo silvestre funcional de dicho mamífero es previamente desconocida, (2) la secuencia determinada de acuerdo con el punto 74 o punto 77, para determinar la localización de cualquier mutación en el gen mutante.
- 60 79. Un procedimiento para determinar el genotipo de miostatina de un mamífero, en el que la miostatina de tipo silvestre del mamífero es sustancialmente la del punto 78, que comprende:
- 65 obtener una muestra de material que contiene ADN del mamífero; y

averiguar si el ADN contiene dicha mutación determinada de acuerdo con el punto 78.

80. Un procedimiento para determinar el genotipo de miostatina de un mamífero, en el que la miostatina de tipo silvestre del mamífero es sustancialmente la del punto 78, que comprende:

- 5 obtener una muestra de material que contiene ARNm del mamífero; y
 averiguar si el ARNm contiene dicha mutación determinada de acuerdo con el punto 78.
- 10 81. Una composición de cebadores útil para la detección de una secuencia nucleotídica que codifica una miostatina que comprende una primera molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica localizada cadena arriba de dicha mutación determinada de acuerdo con el punto 78 y una segunda molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica localizada cadena abajo de la mutación.
- 15 82. Una sonda que comprende una molécula de ácido nucleico basada en una secuencia nucleotídica del punto 74 o punto 76 y que abarca dicha mutación determinada de acuerdo con el punto 78.
- 20 83. Un mamífero transgénico que tiene un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, estando dicho fenotipo conferido por un transgén contenido en las células somáticas y germinales del mamífero, codificando el transgén una proteína miostatina que tiene una mutación negativa dominante.
- 25 84. El mamífero transgénico del punto 83 en el que el mamífero es masculino y no humano y el transgén está localizado en el cromosoma Y.
- 30 85. El mamífero transgénico del punto 83 en el que el mamífero es bovino y el transgén está localizado para estar bajo el control de un promotor que es normalmente un promotor de un gen de miosina.
- 35 86. Un mamífero transgénico que tiene un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, estando dicho fenotipo conferido por un transgén que tiene una secuencia antisentido a la que codifica una proteína miostatina del mamífero.
- 40 87. El mamífero transgénico del punto 86 en el que el mamífero es bovino y el transgén está localizado en el cromosoma Y.
- 45 88. El mamífero transgénico del punto 86 en el que el transgén comprende adicionalmente una secuencia que cuando se transcribe obtiene un ARNm que tiene actividad ribozima.
- 50 89. Un mamífero no humano transgénico que tiene un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, siendo dicho fenotipo inducible y estando conferido por un gen de miostatina flanqueado por lados JoxP y un transgén Cre bajo la dependencia de un promotor inducible.
- 55 90. Un mamífero masculino no humano transgénico que tiene un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, estando dicho fenotipo conferido por un gen de miostatina flanqueado por lados JoxP y un transgén Cre localizado en el cromosoma Y.
- 60 91. Un procedimiento para determinar si una muestra de material genético de mamífero es capaz de conferir un fenotipo caracterizado por hiperplasia muscular, que comprende averiguar si el material genético contiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, en el que la ausencia de dicha secuencia indica la presencia de hiperplasia muscular en el animal.
- 65 92. Un bovino transgénico que tiene un genoma que carece de un gen que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina.
93. Un ratón transgénico que tiene un genoma que contiene un gen que codifica una proteína humana que tiene actividad biológica de miostatina o que contiene un gen que codifica una proteína bovina que tiene actividad biológica de miostatina.
94. Un bovino transgénico que tiene un gen que codifica una proteína bovina que tiene actividad biológica de miostatina y secuencia nucleotídica heteróloga antisentido al gen.
95. Un bovino transgénico del punto 94, que comprende adicionalmente un gen que codifica una secuencia de ácido nucleico que tiene actividad ribozima y en asociación transcripcional con la secuencia nucleotídica antisentido al gen.

Referencias

A continuación se dan referencias concretas citadas anteriormente. Todas las referencias enumeradas se incorporan

en el presente documento por referencia.

- 5 Barendse, W., S.M. Armitage, L.M. Kossarek, A. Shalom, B.W. Kirkpatrick, A.M. Ryan, D. Clayton, L. Li, H.L. Neibergs, N. Zhang, W.M. Grosse, J. Weiss, P. Creighton, F. McCarthy, M. Ron, A.J. Teale, R. Fries, R.A. McGraw, S.S. Moore, M. Georges, M. Soller, J.E. Womack, y D.J.S. Hetzel. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet.* 6: 227-235.
- 10 Bishop, M.D., S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, S.L.F. Sunden, G.A. Hawkins, S. Solinas Toldo, R. Fries, M.D. Grosz, J. Yoo, y C.W. Beattie. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- 15 Boss y col., patente de Estados Unidos N° 4.816.397.
- Cabilly y col. patente de Estados Unidos N° 4.816.567.
- Charlier, C.; Coppieters, W.; Farnir, F.; Grobet, L.; Leroy, P.; Michaux, C.; Mni, M.; Schwers, A.; Vanmanshoven, P.; Hanset, R. y Georges, M. (1995) The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2, *Mammalian Genome* 6: 788-792.
- 15 Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; MacDonald, R.J.; Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Cockett, N.E.; Jackson, S.P.; Shay, T.D.; Nielsen, D.; Green, R.D.; Georges, M. (1994). Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU*, 91: 3019-3023.
- 20 Cockett, N.E.; Jackson, S.P.; Shay, T.D.; Farnir, F.; Berghmans, S.; Snowden, G.; Nielsen, D.; Georges, M. (1996). Polar overdominance at the ovine callipyge locus. *Science* 273: 236-238.
- Cole y col. (1985). *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy*. Allen R. Bliss, Inc.
- Collins, F.S. 1995. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nature Genet.* 9: 347-350.
- 25 Cornelis, F.; Hashimoto, L.; Loveridge, J.; MacCarthy, A.; Buckle, V.; Julier, C.; Bell, J. (1992). Identification of a CA repeat at the TCRA locus using YACs: a general method for generating highly polymorphic markers at chosen loci. *Genomics* 13: 820-825.
- Cottingham, R.W.; Idury, R.M.; Schäffer, A.A. (1993). Faster sequential genetic linkage computations. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 252-263.
- 30 Culley, G. (1807). *Observations on livestock*. 4^a ed., (Londres, G. Woodfall).
- Fisher, S.R.; Beever, J.E.; Lewin, H.A. (1996). Genetic mapping of COL3A1 to bovine chromosome 2. *Mammalian Genome* 8: 76-77.
- Fuji, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; Deleon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E. O'Brien, P.J.; MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor associated with malignant hiperthermia. *Science* 253: 448-451.
- 35 Georges, M.; Andersson, L. (1996). Livestock genomics comes of age. *Genome Research* 6: 907-921.
- Georges, M.; Nielsen, D.; Mackinnon, M.; Mishra, A.; Okimoto, R.; Pasquino, A.T.; Sargeant, L.S.; Sorensen, A.; Steele, M.R.; Zhao, X.; Womack, J.E.; Hoeschele, I. (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- 40 Gossen, M. y Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU*, 89: 5547-5551.
- Grobet, L.; Royo Martin, L.J.; Poncet, D.; Pirottin, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Menissier, F.; Massabanda, J.; Fries, R.; Hanset, R.; Georges, M. (1997) A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. *Nature Genetics* 17: 71-74.
- 45 Gu, H.; Marth, J.D.; Orban, P.C.; Mossmann, H.; Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103-106.
- Hanset, R. y Michaux, C. (1985a). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I. Experimental data. *Génét. Sél. Evol.* 17: 359-368.
- Hanset, R. y Michaux, C. (1985b). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. II. Population data. *Génét. Sél. Evol.* 17: 369-386.
- 50 Hanset, R. (1991). The major gene of muscular hypertrophy in the belgian Blue Cattle Breed. In *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, Owen, Axford, eds. C.A.B. International, pág.467-478.
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329:219-222.
- Hogan, B. y col., (1986). *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- 55 Hoess, R.H.; Ziese, M.; Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79: 3398-3402.
- Houbenwycyl, (1987). *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch. Vol. 15 I y II. Thieme, Stuttgart.
- Hudson y col. (1995) *Science* 270:1945-1954 con datos suplementarios del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Human Genetic Mapping Project, cesión de datos 11.9 (mayo de 1997).
- 60 Hunter, K.; Riba, L.; Schalkwyk, L.; Clark, M.; Resenchuk, S.; Beeghly, A.; Su, J.; Tinkov, F.; Lee, P.; Ramu, E.; Lehrach, H. y Housman, D. (1996). Toward the Construction of Integrated Physical and Genetic Maps of the Mouse Genome Using Interspersed Repetitive Sequence PCR (IRS\NPCR) *Genomics. Genome Research* 6: 290-299.
- Huse y col., (1989). *Science* 246: 1275 - 1281.
- 65 Kambadur, R.; Sharma, M.; Smith, T.P.L.; Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in doublé-muscled Belgian Blue Cattle. *Genome Research* 7: 910-916.
- Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; McGraw, R.A.; Sonstegard, T.S.; Smith, T.P.L.; Lopez-Corrales, N.L. y

- Beattie, C.W. (1997). A Second-Generation Linkage Map of the Bovine Genome. *Genome Research* 7: 235-249.
- Kennett, R. (1979). Cell fusion. *Methods Enzymol.* 58: 345-359.
- Kohler y Milstein. (1975). *Nature* 256: 495-497.
- Kozbor y col. (1983). *Immunol. Today* 4: 72.
- 5 Lathrop, M.; Lalouel, J.M. (1984). Easy calculations of lodscores and genetic risk on small computers. *American Journal of Human Genetics* 36: 460-465.
- Lenstra, J.A.; van Boxtel, J.A.F.; Zwaagstra, K.A.; Schwerin, M. (1993). Short interspersed nuclear element (SINE) sequences of the Bovidae. *Animal Genetics* 24: 33-39.
- Libert, F.; Lefort, A.; Okimoto, R.; Georges, M. (1993) Construction of a bovine genomic library of large yeast
10 artificial chromosome clones. *Genomics* 18: 270-276.
- Lopez, A.R.; Cook, J.; Deininger, P.L.; Derynck, R. (1992). Dominant negative mutants of transforming growth factor-beta1 inhibit the secretion of different transforming growth factor beta isoforms. *Molecular and Cellular biology* 12(4): 1674-1679.
- Lyons, A.L.; Laughlin, T.F.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Womack, J.E.; O'Brien, S.J. (1996). Comparative
15 Anchor tagged Sequences for Integrative mapping of Mammalian Genomes. *Nature Genetics* 15: 47-56.
- McPherron, A.C.; Lee, S.-J. (1996). The transforming growth factor β superfamily. En *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*, Volumen 1B, páginas 357-393, JAI press Inc.
- McPherron, A.C.; Lawler, A.M.; Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF β superfamily member. *Nature* 387: 83-90.
- 20 Menissier, F. (1982). Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. En *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol. 16: Muscle hipertrophy of genetic origin and its use to improve beef production, pág. 387-428. Ed. King y Menissier, Martinus Nijhoff, Merrifield, (1964]. *J. Am. Chem. Assoc.* 85: 2149-2154.
- McCafferty y col., (1990). *Nature* 348: 552-554.
- 25 Mirski, S. y Cole, S. P. C. (1989). Antigens associated with multidrug resistance in H69AR, a small cell lung cancer cell line. *Cancer Res.* 49: 5719-5724.
- Morrison y col., (1985). *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU*, 81: 6851.
- O'Brien, S.J.; Womack, J.E.; Lyons, L.A.; Moore, K.J.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G. (1993). Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genetics* 3: 103-112.
- 30 Old, R.W. y Primrose, S.B., En: *Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering*, 4^a ed. Oxford University Press. 63-66.
- Pell, J.M.; Flint, D.J.; (1997). En: *Milk Composition, Production and Biotechnology*, Ed. Welch y col., Capítulo 19.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 35 Shockett, P.E.; Schatz, D.G. (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU*, 93: 5173-5176.
- Solinas-Toldo, S.; Lengauer, C; Fries, R. (1995). Comparative genome map of man and cattle. *Genomics* 27: 489-496.
- 40 Staerz y Bevan (1986a). *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU*, 83: 1453.
- Staerz y Bevan (1986b). *Immunology Today* 7: 241.
- Stewart, A.J., Canitrot, Y., Baracchini, E., Dean, N.M., Deeley, R.G., y Cole, S.P.C. (1996). Reduction of Expression of the multidrug resistance protein (MRP) in human tumor cells by antisense phosphorotioate oligonucleotides. *Biochem. Pharamcol.* 51: 461-469.
- Takeda y col., (1985). *Nature* 314: 452.
- 45 Tanaguchi y col., publicación de patente europea EP171496.
- Teng, y col., (1982) *Meth. Enzymol.* 92: 3-16.
- Varga, L.; Szabo, G.; Darvasi, A.; Muller, G.; Sass, M.; Soller, M. (1997). Inheritance and mapping of compact (Cmpt), a new mutation causing hipermuscularity in mice. *Genetics*, en la prensa.
- 50 Walter, M.A.; Spillett, D.J.; Thomas, P.; Weissenbach, J.; Goodfellow, P.N. (1994). A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nature Genetics* 7:22-28.
- Ward y col., (1989). *Nature* 341: 544-546.

SECUENCIA ID Nº 1

1 AGGAAGAATA AGAACAAGGG AAAAGATTGT ATTGATTTTA AAACCATGCA
 51 AAAACTGCAA ATCTCTGTTT ATATTTACCT ATTTATGCTG ATTGTTGCTG
 101 GCCCAGTGGG TCTGAATGAG AACAGCGAGC AGAAGGAAAA TGTGCAAAAA
 151 GAGGGGCTCT GTAATGCATG TTTGTGCAGG GAAAACACIA CATCCTCAAG
 201 ACTAGAAGCC ATAAAAATCC AAATCCTCAG TAAACITCGC CTGGAAACAG
 251 CTCCTAACAT CAGCAAAGAT GCTATCAGAC AACITTTGCC CAAGGCTCCT
 301 CCACTCCTGG AACTGATGGA TCAGTTGGAT GTCCAGAGAG ATCCAGCAG
 351 TGACGGCTCC TTGGAAGAGC ATGACTACCA CGCCAGGAGC GAAACCGTCA
 401 TTACCATGCC CACGGAGTCT GATCTTCTAA CGCAAGTGGG AGCAAAAACC
 451 AAATGTTGCT TCTTTAAAT TAGCTCTAAG ATACAATACA ATAACTAGT
 501 AAAGGCCCAA CTGTGGATAT ATCTGAGGCC TGTCAAGACT CCGCGACAG
 551 TGTTTGTGCA AATCCTGAGA CTCATCAAAC CCATGAAAGA CGGTACAAGG
 601 TATACTGGAA TCCGATCTCT GAAACTTGAC ATGAACCCAG GCCTGGTAT
 651 TTGCCAGAGC ATTGATGTGA AGACAGTGTG GCAGAACTGG CTCAAACAAC
 701 CTGAATCCAA CTTAGGCATT GAAATCRAAG CTTTAGATGA GAATGGCCAT
 751 GATCTTGCTG TAACCTTCCC AGAACCCAGGA GAAGATGGAC TGACTCCTTT
 801 TTTAGAAGTC AAGGTAACAG ACACACCAA AAGATCTAGG AGAGATTTTG
 851 GGCTTGATTG TGATGAACAC TCCACAGAAT CTCGATGCTG TCGTTACCCT
 901 CTAACCTCTGG ATTTTGAAGC TTTTGGATCG GATTTGGATTA TTGCACCTAA
 951 AAGATATAAG GCCAATTACT GCTCTGGAGA ATGTGAATTT GSTATTTTGC
 1001 AAAAGTATCC TCATACCCAT CTTGTGCACC AAGCAAACCC CAGAGUTTCA
 1051 CCCGGCCCCCT GCTGTACTCC TACAAAGATG TCTCCAATTA ATATGCCATA
 1101 TTTTAATGGC CAAGGACAAA TAATATACGG GAAGATCCCA GCCATCCTAG
 1151 TAGATCGCTG TGGGTGTTCA TGAGTCTATA TTTGGGTTCA TAAGC

SECUENCIA ID Nº 2

1 ^g MOKLQISVY IYLPMLIVAG PVDLNENSEQ KENVEKEGLC NAELWRENTT
51 SSRLEATKIQ ILSKIRLETA PNISKDAIRQ LLPKAPFLE LLDQPDVORD
101 ASSDGSLEDD DYHARTETVI TMPTESDLLT QVEGKPKCCP FKFSSKIQYN
151 RIVKAQLWIY LRFVKTPATV FVQILRIJKP MKDGTRYTGI KSLKLDMPNG
201 TGIWQSIDVK TVLQNWLKQP ESNLGIETKA LDENGHDLAV TPFEPGEDGL
251 TPFLEVKVTD TPKRSRRDFG LDCDEHSTES RCCKYPLTVD FEAPGWDWIE
301 APKRYKANYC SCECEVFLQ KYPHTHLVHQ ANPRGSAGPC CTPTKMSPIN
351 MLYFNNEGQI IVGKIPAMVV DRCGCS*

SECUENCIA ID Nº 3

1 AGGAAGAATA AGAACAAGGG AAAAGATTGT ATTGATTITA AAACCATGCA
 51 AAAACTCCAA ATCTCTGTTT ATATTTACCT ATTTATGCTG ATTGTTGCTG
 101 GCCCAGTCCA TCTGAATGAG AACAGCGAGC AGAAGGAAAA TCTGGAAAAA
 151 CAGGGGCTGT GTAATGCATG TTTGTGGAGG GAAAACACTA CATCCTCAAG
 201 ACTAGAAGCC ATAAAAATCC AAATCCTCAG TAAACTTCGC CTGGAAACAG
 251 CTCCTAACAT CAGCAAAGAT GCTATCAGAC AACTTTTCCC CAAGGCTCCT
 301 CCACTCCTGG AACTGATTGA TCAGTTCGAT GTCCAGAGAC ATGCCAGCAG
 351 TGACGGCTCC TTGCAAGACG ATGACTACCA CGCCAGGAGC GAAACGGTCA
 401 TTACCATGCC CACGGAGTCT GATCTTCTAA CGCAAGTGGG AGAAAAACCC
 451 AAATGTTGCT TCTTTAAATT TAGCTCTAAG ATACARTACA ATAACTAGT
 501 AAAGCCCCAA CTGTGGATAT ATCTGAGGCC TGTCAGACT CCTGCGACAG
 551 TGTTTGTGCA AATCCTCACA CTCATCAAAC CCATGAAAGA CGGTACAAGC
 601 TATACTGGAA TCCGATCTCT GAAACTTGAC ATGAACCCAG GCACTGGTAT
 651 TTGGCAGAGC ATTGATGTGA AGACAGTGTT GCAGAACTGG CTCAAACAAC
 701 CTGAATCCAA CTTACGCATT GAAATCAAAG CTTTAGATGA GAATGGCCAT
 751 GATCTTGCTG TAACCTTCCC AGAACCAGGA GAAGATGGAC TGACTCCTTT
 801 TTTAGAAGTC AAGGTAACAG ACACACCAA AAGATCTAGG AGAGATTTTG
 851 GGCTTGATG TGACAGAATC TCGATGCTGT CGTTACCCTC TAACTGTGGA
 901 TTTTGAAGCT TTTGGATGGG ATTGGATTAT TCCACCTAAA AGATATAAGG
 951 CCAATTACTG CTCTGGAGAA TGTGAATTTG TATTTTTGCA AAAGTATCCT
 1001 CATACCCATC TTGTGCACCA AGCAAACCCC AGAGGTTGAG CCGGCCCTG
 1051 CTGTACTCCT ACAAAGATGT CTCCAATTAA TATGCTATAT TTTAATGGCG
 1101 AAGGACAAAT AATATACGGG AAGATTCCAG CCATGGTAGT AAATCGCTGT
 1151 GGGTGTTCAT CAGCTCTATA TTTGGTTCAT AGCTTCCTCA AACATGGAAG
 1201 GTCTTCCCCT CAACAATTTT GAAACTGTTG AAATTATGT

SECUENCIA ID Nº 4

1 ² VMQKLQISVY IYLFMLIVAG PVDLNENSEQ KENVEKEGLC NACLWRENTT
51 SSRLEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ ILPKAPLLE LILQFDVQRD
101 ASSDGSLEDD DYHARTETVI TMPTESDLLT QVEGKPKCCF PKPSSKIQYN
151 KLVKAQLWIY LRPVKTPATV FVQILRLIKP MKDGTRYTGI RSIKIDMNPQ
201 TGIWQSIDVK TVLQNWLRQP ESNIIGTEIKA LDENGHDLAV TFPEPGELGL
251 TPFLEVKVTD TPKRSRRDFG LDCDRISMLS LPSNCGF
301
351

SECUENCIA ID Nº 5

1 GTCTCTCGGA CGGTACATGC ACTAATATTT CACTTGGCAT TACTCAAAG
 51 CAAAAAGAAG AATAAGAAC AAGCGAAAA AAAAGATTGT GCTGATTTTT
 101 AAAATGATGC AAAAAGTGA AATGTATGTT TATATTTACC TGTTTCATGCT
 151 GATTGCTGCT GGCCCAAGTG ATCTAATGA GGGCAGTGAG AGAGAAGAAA
 201 ATGTGGAAAA AGAGGGGCTG TGTAATGCAT GTCGTTGGAG ACAAACACG
 251 AGGTACTCCA GAATAGAAC CATAAAAATT CAAATCCTCA GTAAGCTGCG
 301 CCTGGAAACA GTCCTAACA TCAGCAAAGA TGCTATAAGA CAACTTCTGC
 351 CAAGACCGCC TCCACTCCCG GAAGTATCG ATCAGTACGA CGTCCAGAG
 401 GATGACAGCA GTGATGGCTC TTTGGAAGAT GACGATTATC ACGCTACCAC
 451 GGAAACAATC ATTACCATGC CTACAGAGTC TGACTTTCTA ATGCAAGCGG
 501 ATGGCAAGCC CAAATGTTGC TTTTTTAAAT TTAGCTCTAA AATACAGTAC
 551 AACAAAGTAG TAAAAGCCCA ACTGTGGATA TATCTCAGAC CCGTCAAGAC
 601 TCCTACAACA GTGTTTCTGC AAATCCTGAG ACTCATCAAA CCCATGAAAG
 651 ACCGTACAAG GTATACTGGA ATCCGATCTC TGAAACTTGA CATGAGCCCA
 701 GGCCTGGTA TTTGGCAGAG TATTGATGTG AAGACAGTGT TGCAAAATTG
 751 GCTCAAACAG CCTCAATCCA ACTTAGGCAT TGAAATCAAA GUTTTGGATG
 801 AGAATGGCCA TGATCTTCTT GTAACCTTCC CAGGACCAGG AGAAGATGGG
 851 CTGAATCCCT TTTTAGAAGT CAAGGTGACA GACACACCCA AGAGGTTCCG
 901 GAGAGACTTT GGGCTTGAAT GCGATGAGCA CTCCACGGAA TCCCGGTGCT
 951 GCCGCTACCC CCTCACGGTC GATTTTGAAG CCTTTGGATG GGACTGGATT
 1001 ATCGCACCCA AAAGATATAA GGCCAATTAC TGCTCAGGAG AGTGTGAATT
 1051 TGTGTTTTTA CAAAATATC CGCATACTCA TCTTGTGLAC CAAGCAAACC
 1101 CCAGAGGCTC AGCAGGCCCT TGCTGCACTC CGACAAAAT GTCTCCCAT
 1151 AATATGCTAT ATTTTAATGG CAAAGAACAA ATAATATATG GAAAAATTCC
 1201 AGCCATGGTA GTAGACCGCT CTCGGTGTCT ATGAGCTTTG CATTAGGTTA
 1251 GAAACTTCCC AACTCATGGA AGGTCTTCCC CTCAATTTG AACTGTGAA

1301 TTCAAGCACC ACAGGCTGTA GGCCTTGAGT ATGCTCTACT AACGTAAGCA
 1351 CAAGCTACAG TGTATGAACT AAAAGAGAGA ATAGATGCAA TGGTTGGCAT
 1401 TCAACCACCA AAATAAACCA TACTATAGGA TGTTGTATGA TTTCCAGAGT
 1451 TTTTGAAATA CATGGAGATC AAATTACATT TATGTCCATA TATGTATATT
 1501 ACAACTACAA TCTAGCCAAG GAAGTGAGAG CACATCTTGT GGTCTGCTGA
 1551 GTTAGGAGGG TATGATTAAA AGGTAAAGTC TTATTTCTTA ACAGTTTCAC
 1601 TTAATATTTA CAGAACAATC TATATGTAGC CTTTGTAAG TGTAGGATTG
 1651 TTATCATTTA AAAACATCAT GTACACTTAT ATTTGTATTG TATACTTGGT
 1701 AAGATAAAAT TCCACAAAGT AGGAATGGGG CCTCACATAC ACATTGCCAT
 1751 TCCTATTATA ATTGGACAAT CCACCACGGT GCTAATGCAG TGCTCAATGG
 1801 CTCCTACTGG ACCTCTCGAT AGAACACTCT ACAAAGTACG AGTCTCTCTC
 1851 TCCCTTCCAG GTGCATCTCC ACACACACAG CACTAAGTGT TCAATGCATT
 1901 TTCTTTAAGG AAAGAAGAAT CTTTTTTTCT AGAGGTCAAC TTTCAGTCAA
 1951 CTCTAGCACA GCGGGAGTGA CTGCTGCATC TTAAAAGGCA GCCAAACAGT
 2001 ATTCATTTTT TAATCTAAT TTCAAATCA CTGTCTGCCT TTATCACATG
 2051 CCAATTTTGT GGTAAAATAA TGGAAATGAC TGGTTCTATC AATATTGTAT
 2101 AAAAGACTCT GAAACAATTA CATTATATA ATATGTATAC AATATTGTTT
 2151 TGTAATAAAG TGTCTCCTTT TATATTTACT TTGGTATATT TTTACACTAA
 2201 TGAAATTTCA AATCATTAAA GTACAAAGAC ATGTCATGTA TCACAAAAAA
 2251 GGTGACTGCT TCTATTTTCA AGTGAATTAG CAGATTC AAT AGTGGTCTTA
 2301 AAACTCTGTA TGTTAAGATT AGAAGGTTAT ATTACAATCA ATTTATGTAT
 2351 TTTTACATT ATCAACTTAT GGTTCATGG TGGCTGTATC TATGAATGTG
 2401 GCTCCCAGTC AAATTTCAAT GCCCCACCAT TTTAAAAATT ACAAGCATT A
 2451 CTAACATAC CAACATGTAT CTAAAGAAAT ACAAATATGG TATCTCAATA
 2501 ACAGCTACTT TTTATTTTA TAATTTGACA ATGAATACAT TTCTTTTATT
 2551 TACTTCAGTT TTATAAATTG GAACTTTGTT TATCAAATGT ATTGTACTCA
 2601 TAGCTAAATG AAATTATTTT TTACATAAAA ATGTGTAGAA ACTATAAATT
 2651 AAAGTGTTTT CACATTTTTT AAAGCC

SECUENCIA ID Nº 6

1 MMQKLQMYVY IYLFMLIAAG PVDLNEGSR EENVEKEGLC NACAWRQNTK
51 YSRIEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLRE LIDQYDVQRD
101 DSSDGSIEDD DYHATTETII TMPTESDFLM QADGKPKCCF FKPSSKIQYN
151 KVVKAQLWIY LRPVKTPPTV FVQILRLIKP MKDGTRYTGI RSIKTDMSPG
201 TGIWQSIDVK TVLQNWLRQP ESNLQIEIKA LDENGDLAV TFPQPGEDGL
251 NPFLEVKVTD TPKRSRDFG LDCDEHSTES RCCRYPLTVD FEAFGWDWII
301 APKRYKANYC SGECEVFVLRQ KYPHTHLVHQ ANPRGSAGPC CTPKMSPIN
351 MLYFNGKEQI IYGKIPAMVV DRCGCS*

SECUENCIA ID Nº 7

hs3753

NGATTTTCTAATGCAAGTGGATCCAAAACCC

hs3753 AAATGTTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAAATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAA

hs3753 CTATCCATATATTTGAGACCCGTCGAGACTCCTACAACAGTGTGTTGTGCAAATCCTGAGA

hs3753 CTCATCAAACCTATGAAAGACCGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGAC

hs3753 ATCAACCCAGGCACTGGTATTTGGCAGA - NATTGATGTGAAGACACTGTTCGAAAATTGG

hs3753 CTCRAACAACCTGAATCCCACTTAGGGATTGAARATAAAAGCTTTACATGAGAAATGATCAT

hs3753 GATCTTGCTGTAACTTCCACGACCCAGGAAGAAGATGGGCTGAATCCCTTTTTAAGAA

hs3753 GGTCAAGGTAAACAGACACACCAAAAAGATTCCAAAGGGATTTTCCTCTTTGACTGGTGA

hs3753 TGACCACTCAACAGAATCACGATCCTGTCCCTACCCCTAACTGGTGGATTTTGAAGCCT

hs3753 TTGGATGGGATTGGA - TATCG

hs7823

AGCGATGGTAGTAGACCGCTGTGGGTGCTC

hs7823 ATGACATTTATATTAAGCGTTTCATAACTTCCTAAAACATGGAAGGTTTTCCCTCAACAA

hs7823 TTTTCAAGCTGTGAAATTAAGTACCACAGGCTATAGGCCTAGAGTATGCTACAGTCACTT

hs7823 AAGCATAAGCTACAGTATGTAAACTAAAAGGGGGAANGGCAATATATGCAATGGTTGGCA

hs7823 TTTAACCATCCAAACAAATCATAC--CAGAAAGTTTATGATTTCCANAGTTTTTTNAGG

hs7823 CNAGAAAGGAGGAGTCAAANTTTCANTCTTATGCT

hs92027 ATTTCCGGCACAGGTNAAACACTTGAATTTATATTGTATGGTAGTATA

hs92027 CTTGGTAAGATAAAAATCCACAAAAATAGGGATGGTGCAGCATATGCA-ATTTCCATCC

hs92027 TATTATAATTGACACAGTACATTAAACAATCCATGCCAACGGTGCTAATACGATAGGCTGA

n95327 TAAATCTCAACGTTCCATTATTTTAATACTTGCAAAAACATTACTAAOTATACAAAATA
n95327 ATTGACTCTATTATC-TG-AAATGAAG-AATAAACTGATGCTATCTCAACAATAACTGTT
n95327 ACTTTTATTTTATAAATTTGATAAATGAATATATTTCTGCATTTATTTACTTCTGTTTTGTA
n95327 AATTGGGATTTTGTAAATCAAATTTATTGFACT-ATGACTAAATGAAATTATTTCTTACA
n95327 T-CTAATTTGTAGAAAACAGTATAAGTTATATTAAAGTGTTTTCACATTTTTTTGAAAAGAC

SECUENCIA ID Nº 8

1 MQKLQLCVYI YLFMLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN ACTWRQNTKS
51 SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL LPKAPPLREL IDQYDVQRDD
101 SSDGSLEDDD YHATTETIIT MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK
151 VVKAQLWIYL RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMNEGT
201 GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGEIKAL DENGHDLAVT FPGPGEDGLN
251 PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWILA
301 PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHOA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM
351 LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS*

SECUENCIA ID N° 54

1 GCGGCCGCC GGGCAGGTAT CGAAAGTTTC ACATATAAAG ATGAATAAGA
 51 TCTAAGTGTA TATGTTATTG TTAATAAAGT TTTTAATTTT TCGAATGTCA
 101 CATAACAGCCT TTATTATTCA TAGATTTATT CCTTTTAAGA AGTAGTCAAA
 151 TGAATCAGCT CACCCTTGAC TGTAACAAAA TACTGTTTGG TGACTIONGTGA
 201 CAGACAGGGT TTTAACCTCT GACAGCGAGA TTCATTGTGG AGCAAGAGCC
 251 AATCACAGAT CCCGACGACA CTTGTCTCATCAAAGTTGGA ATATAAAAAG
 301 CCACTTGGAA TACAGTATAAAAAGATTCACT GGTGTGGCAA GTTGTCTCTA
 351 GACTGGGCAG GCATTAACGT TTGGCTTGGC GTTACTCAA AGCAAAAAGAA
 401 AAGTAAAAGG AAGAAGTAAG AACCAAGGGAA AAGATTGTAT TGATTTTAAA
 451 ACCATGCAAA AACTGCAAAT CTCTGTTTAT ATTTACCTAT TTATGCTGAT
 501 TGTGCTGGC CCAGTGGATC TGAATGAGAA CAGCGAGCAG AAGGAAAATG
 551 TGGAAAAGA GGGGCTGTGT AATGCATGTT TGTGGAGGGA AAACACTACA
 601 TCCTCAAGAC TAGAAGCCAT AAAAATCCAA ATCCTCAGTA AACTTCGCCT
 651 GGAAACAGCT CCTAACATCA GCAAAGATGC TATCAGACAA CTTTTGCCCA
 701 AGGCTCCTCC ACTCCTGGAA CTGATTGATC AGTTCGATGT CCAGAGAGAT
 751 GCCAGCAGTG ACGGCTCCTT GGAAGACGAT GACTACCACG CCAGGACGGA
 801 AACGGTCATT ACCATGCCCA CGGAGT/GTGA GTAGTCCTGCTGGTGCAAAG
 851 CAACGACTCT GCTGACTGCT GTTCTAGTGT TCATGAAAAA CCGATCTATT
 901 TTCAGGCTCT TTTAACAAGC TGCTGGCTTG TATGTAAGGA GGAGGGGAAA
 951 GAGCTTTTTT CAAGATTTCA TGAGAAATAG ACCAATGAGA CTGAAAGCTG
 1001 CTACTTTATT TGTTTCCTTA GAGAGCTAAA AAGCTAAAAA TCAAAAATGA
 1051 AATGCTTGCA TAGCATTTCAT GTTATATAGT TTAGTATGAC AACTATAACA
 1101 TGTTTATGTT TTCACAGCTT AATGCTACCA AGGTAAAGGA TTGGGAAACA
 1151 GTATCAGCAA TGTGAAAAT TTACATCAA TTTCTAATT GCATTTGGTT

ES 2 547 858 T3

1201 GCCTGAAATA TGCATTTATA ATAACAGGTT TTTTTTTTTT CATTAATAAA
 1251 AGAGAAAGGA AGAAATCTGT AGAGGTTGAA GCCTATCTGG GCATTTGCTG
 1301 AACACTTAGA ATGACTTCTG TTATTCAAAA CTATTTCTCA TAGGGTTTTT
 1351 ATGGTCTTCA CAGAGTATCT AATTTTGAAA GCTATTAGAG TGGAAAGGAT
 1401 AAAAGAATAT TCTTAATAAA CTTAATGTAT TAGTAAGAGC AATAAGGAAG
 1451 TAAACACAGC ATAGTGAAAA ATCATGAGCT AATCAGCAGA AAATTCTAAG
 1501 AAATAAACAT TTTAATTACA AAGTTCCACT TATACCCTGA CCATGGTACT
 1551 ATTGTTGAGA GTACCTTGTC TGCACATATC TAGGAGGCAC ATGCTTAATA
 1601 ACCTTCTAAA ATATTATTGT ATTCCTCATA GGAGGGAGAA CTATTACCTA
 1651 TATGTAGTAC CTATGTTGTT TCTGAAAGAT AATATGTTTC ATGTATTTCT
 1701 GTTGCAGTCA CTTCAAACCT AACTCAAGG AAAGGGAGAC AGGCATCTCA
 1751 ACAGAGAAGG CATGACCAGA AAGAGTTTTG TGCCATGTGT CTGCGATCTT
 1801 GCTTTATACA GGGCTCTACC CACTTTAAAC TGGACTCAAA ACAGTTTCAA
 1851 AATACTGCTT TTTCTTATTA AGTAACTAGT TTATAAGGCA ACAAATAAAT
 1901 TTCCTTFAAG ACTGTGCTAT CAGATAATCC TGGAATAGAT TTGCCTTACT
 1951 TATAACAAT CTTGAGAAAA CAAAAAGGCA AGAAATTGCT AAGTGCTTCT
 2001 GCTTACAATG ACAGCCTGGC CCTAAAGACA ATGTTTTCTA AGTTTTGAAA
 2051 CAGCTTGAAT ACAACATCTA AGTTTTGGTG CTAATTACCT GCTAGTTTTT
 2101 TTATTTTTTT CCTTTAAAAG GCTGTCCCAG CGTCCTAACA TAACAGATGC
 2151 ACTATATTTT CTGCTAATTC CCGAGGCTCA GTTAGTTGCT CACTGTGTCT
 2201 TGTCCCCAGG TAATTCAGGC CTGGGGGAAG GGTCCTTCC TCCAGACTGA
 2251 TTGGTACAGC TGCTCAGTAA GTGTAECTAC TCAGATTCCC AAAGAATTCT
 2301 AAGTGGATGT TCTTCCACAG TGTCTCTTGT TCTCTCTAAT CATCATCATT
 2351 TTAAAATTTT ATCCACTTTT CATTCCTTAA TAGAATTTTC CTTAGTCCAC
 2401 AGTTCTCTGG AAAGGAAGTA GGCTTCTCAT AACAGCTGAA AAAACATATA
 2451 CCTAAAAGAT TCTGAAAAGC TGTAATAACT GTTATACTTG ATATTTTGCT

2501 GTTATGAATG AAATGCTACA TATTTTTCCA TTTTAAAAGA CTAAATATGC
 2551 ACACATTATTCCAATTAAAA AATGTTTCATA GATTGATATGGAGGTGTTTCG
 2601 TTCATTTTTTC ATAAAAATGA TCTTAGTAAC TTTTTTTCTT ATTCATTTAT
 2651 AG/CTGATCTT CTAACGCAAGTGGGAAGGAAA ACCCAAATGT TGCTTCTTTA
 2701 AATTTAGCTC TAAGATACAA TACAATAAAC TAGTAAAGGC CCAACTGTGG
 2751 ATATATCTGA GGCCTGTCAA GACTCCTGCG ACAGTGTTTG TGCAAATCCT
 2801 GAGACTCATC AAACCCATGA AAGACGGTAC AAGGTATACT GGAATCCGAT
 2851 CTCTGAAACT TGACATGAAC CCAGGCACTG GTATTTGGCA GAGCATTGAT
 2901 GTGAAGACAG TGTTGCAGAA CTGGCTCAAA CAACCTGAAT CCAACTTAGG
 2951 CATTGAAATC AAAGCTTTAG ATGAGAATGG CCATGATCTT GCTGTAACCT
 3001 TCCCAGAACC AGGAGAAGAT GGACTG/GTAA GTGATTACTGAAAATAACAT
 3051 GCTAAAAACC TTGTTATGTG TTTATTCATA ATGTGAATGA ATAGTAGTGA
 3101 AAAATAACTA CCAGTTTCCT GTGCTTATAA GCCAGACAAA GGCACCTTAC
 3151 CCCAGTGGTA GCCCTGTACT CAATAAAAGT AGGTGTCCCA TTTCACATCC
 3201 TATGAAACAC TCTCTTGATA CTTTGACTTT GCATGAGGAT TTAAAAGAAA
 3251 AAAAGTTATA CCATGGTCCT TAAGTTTTTA GGAATTCTT TGGAATTGAG
 3301 AATGAAATAT AAAATGCTTT CCGTTGATGT GCTACATGAT TATATAAATA
 3351 AAAACATGAA GTCTTCACAG TGGATTCTAG TACTCACCCA ACAACACATT
 3401 TTTTCCCCCA GAAGAGTGAC CAATTTGTTA AAATTCTTTT GCTTAATAAG
 3451 GCAGAAAAAT GAACTCTACA AGTTATAATT AAAATAAAAT GCTTTTACTT
 3501 ATAGAAATTA ACTAGATATA TGTTTCAGGT TATATACTAT TAAATATACT
 3551 ATATTTAAGA TCTCTCATGA TAAATATGTT CCTTGTTTTA TAGACTATTG
 3601 ATGCACTGAT GTATATGTGG ATTACTTTGT GAATTACCCC TGGTAAAATT
 3651 AAAAATTTCA GGCTAGTTAA CTTGTACTAC TTAGCTATTT TCTGAACTGT
 3701 CTTACTGTTC TTTAACAGGA GTTAACTTAG GTAATGTCAA CTAATTTAAT

ES 2 547 858 T3

3751 ATAAAGTCAA ACAGAAAATA ATGCCTTATA TATTATAAAA ATTAATAAAA
 3801 AACCATTTTA AAATCTAGTA TAAGTTTAGA GCTACTCACT CTTCTGGCTT
 3851 ATCTATGCTT GTATTTACTT CTGTTTTCAA AAAATTTTTT AATGTGACCA
 3901 TACTTTTTAT TTCCAGTTAT TGATATAATT TACAACAAAA GATTATACTT
 3951 GCAAGCTTTA TAGTTTTTAA ATGGTCTTAT TTGTAGTGAA TATCATATCT
 4001 AAATGATATC TAAATGTAAA GTAAATCATA CCTAAATGAA AACATATTCT
 4051 TTAAGTCATT ATAAAATTTT CCAGGTGATC AATTTTTCTT TAAATATACT
 4101 ACATAAAATG TTATTGACTC CCAAATGAT GTTATTTTGT ATAATCTTAA
 4151 ATACCAATAA TTACCAGGTC TATTTTGGTT TTAGTGTAGG ATAAAAAAGA
 4201 ATGTGTTCTT TTTTCTAGGT AGCATTTTAA TGATCAAAGT TGGTGACGTG
 4251 ACAGAGGTCT TAAGTATTAT TAAACAGATG ATTAATAAGA TGTATTCCTC
 4301 AGACTTTTCC ATATAAAAGG AAAAATGTCT CAAATTCATG AAAAGATTGG
 4351 TACAGGAGGA GGATTAGCAA ATTGTAGTTT AAATATCTGA ATGGAAACAC
 4401 TTTTTAGTGA AAGAATAAAG GGAATATCAT TGTATCTTCT TCTGAGTCTG
 4451 TGCCTCTCTC TCTTGGAGTT AGTCTTTCCA ACCCTATATA CTTACCACTA
 4501 TCTTCATCCC TCTACCTTCC TTTTCCCAT TACATCTGTG CAGTACTGGG
 4551 TGGCAACTAT TGTGTTTCGG TGTTAATATC CAAGTTTCCC TGAATAAGAC
 4601 CAAGTGAATG GAGGATGAAT GAGTATACCT ATCCCTCCAG GGGTCATCAG
 4651 ACATATTTAG CCACCATATT TAATCAATAA GCAGGAAGAC ATAAGCTAGC
 4701 CTTGTCCTTC TTCTTTCCTC CCTGCTCCTT TCTCTTCTCT TCCCCCTCTC
 4751 CCTTTACTGT CATCCATCAG TATTTTCAGA GCATCTATTA TGTGTCAGGC
 4801 ATTCAGATAC TCAAACGGAG GAAAACAAGA ATAAACAAGA CAAAGATCTG
 4851 ACCACAGGGG AATCCCTATG GCTACTGTAG ACTTTTGAGC CATAAAGGAA
 4901 GAATCAAGCC TAGTGTAAT GAAATTCCT TAATGCTGTG CCTTTTAAAA
 4951 AGAAATGTGA CATAAGCAAA ATGATTAGTTTCTTTCTTTA ATAATGAGTC
 5001 CTTGAGGTAG GAGAGTGTTT TGGGATCTATTATTAACTCT TCTTTCCTTT

5051 CCATACAG/AC TCCTTTTTTA GAAGTCAAGG TAACAGACAC ACCAAAAAGI
 5101 TCTAGGAGAG ATTTTGGGCT TGATTGTGAT GAACACTCCA CAGAATCTCG
 5151 ATGCTGTCGT TACCCTCTAA CTGTGGATTT TGAAGCTTTT GGATGGGATT
 5201 GGATTATTGC ACCTAAAAGA TATAAGGCCA ATTACTGCTC TGGAGAATGT
 5251 GAATTTGTAT TTTTGCAAAA GATCCTCAT ACCCATCTTG TGCACCAAGC
 5301 AAACCCAGAG GGTTCAGCCG GCCCCTGCTG TACTCCTACA AAGATGTCTC
 5351 CAATTAATAT GCTATATTTT AATGGCGAAG GACAAATAAT ATACGGGAAG
 5401 ATTCCAGCCA TGGTAGTAGA TCGCTGTGGGTGTTCATGAG GTCTATATTT
 5451 GGTTCATAGC TTCCTCAAAC ATGGAAGGTC TTCCCCTCAA CAATTTTGAA
 5501 ACTGTGAAAT TATGTACCAC AGGCTATAAG CCTAGAGTAT GCTACAGTCA
 5551 CTTAAGCACA AGCTACAGTA TATGAGCTAA AAAGAGAGAA TATATGCAAT
 5601 GGTGTCATT TAACCATCCA AACAAATCGT ATAATAAAAA GTTTTATGAT
 5651 TTCCAGAGTT TTTGAACTAG GAGATCAAAT TCCATTTATG TTGAAATATA
 5701 TTACAACACA TGCAGGTGAA TGAAAGCAAT TCTCCTTGTC TTCTGGTGAA
 5751 TTAAAGGAGT ATGCTTTAAA ATCTATTTCT CTACAGTTTC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> UNIVERSITY OF LIEGE
- <120> DOBLE MUSCULACIÓN EN MAMÍFEROS
- <130> G2087 EP/1 S3
- 10 <150> EP 98 93 5228.1
- <151> 14-07-1998
- <150> US 19970891789
- 15 <151> 14-07-1997
- <150> US 19980007761
- <151> 15-01-1998
- 20 <160> 54
- <170> PatentIn ver. 2.0

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1196 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1

AGGAAAAAGT AAGAACAAGG GAAAAGATTG TATTGATTTT AAAACC ATG CAA AAA	55
Met Gln Lys 1	
CTG CAA ATC TCT GTT TAT ATT TAC CTA TTT ATG CTG ATT GTT GCT GGC	103
Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile Val Ala Gly 5 10 15	
CCA GTG GAT CTG AAT GAG AAC AGC GAG CAG AAG GAA AAT GTG CAA AAA	151
Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys 20 25 30 35	
GAG GGG CTG TGT AAT GCA TGT TTG TGG AGG GAA AAC ACT ACA TCC TCA	199
Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr Thr Ser Ser 40 45 50	
AGA CTA GAA GCC ATA AAA ATC CAA ATC CTC AGT AAA CTT CGC CTG GAA	247
Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu 55 60 65	
ACA GCT CCT AAC ATC AGC AAA GAT GCT ATC AGA CAA CTT TTG CCC AAG	295
Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys 70 75 80	
GCT CCT CCA CTC CTG GAA CTG ATT GAT CAG TTC GAT GTC CAG AGA GAT	343
Ala Pro Pro Leu Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val Gln Arg Asp 85 90 95	
GCC AGC AGT GAC GGC TCC TTG GAA GAC GAT GAC TAC CAC GCC AGG ACG	391
Ala Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Arg Thr 100 105 110 115	
GAA ACG GTC ATT ACC ATG CCC ACG GAG TCT GAT CTT CTA ACG CAA GTG	439
Glu Thr Val Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Leu Leu Thr Gln Val 120 125 130	

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 375 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2

Met Gln Lys Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr
 35 40 45
 Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val
 85 90 95
 Gln Arg Asp Ala Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110
 Ala Arg Thr Glu Thr Val Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Leu Leu
 115 120 125
 Thr Gln Val Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Leu Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Lys Thr Pro Ala Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270
 Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 275 280 285
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala

325	330	335													
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr
		340						345					350		
Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val
		355					360					365			
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser									
	370					375									

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 3

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1240 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3

AGGAAAAAGT AAGAACAAGG GAAAAGATTG TATTGATTTT AAAACC ATG CAA AAA	55
Met Gln Lys 1	
CTG CAA ATC TCT GTT TAT ATT TAC CTA TTT ATG CTC ATT GTT GCT GGC	103
Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile Val Ala Gly 5 10 15	
CCA GTG GAT CTG AAT GAG AAC AGC GAG CAG AAG GAA AAT GTG GAA AAA	151
Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys 20 25 30 35	
GAG GGG CTG TGT AAT GCA TGT TTG TGG AGG GAA AAC ACT ACA TCC TCA	199
Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr Thr Ser Ser 40 45 50	
AGA CTA GAA GCC ATA AAA ATC CAA ATC CTC AGT AAA CTT CGC CTG GAA	247
Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu 55 60 65	
ACA GCT CCT AAC ATC AGC AAA GAT GCT ATC AGA CAA CTT TTG CCC AAG	295
Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys 70 75 80	
GCT CCT CCA CTC CTG GAA CTG ATT GAT CAG TTC GAT GTC CAG AGA GAT	343
Ala Pro Pro Leu Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val Gln Arg Asp 85 90 95	
GCC AGC AGT GAC GGC TCC TTG GAA GAC GAT GAC TAC CAC GCC AGG ACG	391
Ala Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Tyr His Ala Arg Thr 100 105 110 115	
GAA ACG GTC ATT ACC ATG CCC ACG GAG TCT GAT CTT CTA ACG CAA GTG	439
Glu Thr Val Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Leu Leu Thr Gln Val 120 125 130	
GAA GGA AAA CCC AAA TGT TGC TTC TTT AAA TTT AGC TCT AAG ATA CAA	487
Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln 135 140 145	
TAC AAT AAA CTA GTA AAG GCC CAA CTG TGG ATA TAT CTG AGG CCT GTC	535
Tyr Asn Lys Leu Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val 150 155 160	
AAG ACT CCT GCG ACA GTG TTT GTG CAA ATC CTC AGA CTC ATC AAA CCC	583
Lys Thr Pro Ala Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro 165 170 175	

ATG	AAA	GAC	GGT	ACA	AGG	TAT	ACT	GGA	ATC	CGA	TCT	CTG	AAA	CTT	GAC	631
Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Asp	
180					185					190					195	
ATG	AAC	CCA	GGC	ACT	GGT	ATT	TGG	CAG	AGC	ATT	GAT	GTG	AAG	ACA	GTG	679
Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Val	
				200					205					210		
TTG	CAG	AAC	TGG	CTC	AAA	CAA	CCT	GAA	TCC	AAC	TTA	GGC	ATT	GAA	ATC	727
Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	
			215					220					225			
AAA	GCT	TTA	GAT	GAG	AAT	GGC	CAT	GAT	CTT	GCT	GTA	ACC	TTC	CCA	GAA	775
Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Glu	
		230				235						240				
CCA	GGA	GAA	GAT	GGA	CTG	ACT	CCT	TTT	TTA	GAA	GTC	AAG	GTA	ACA	GAC	823
Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Thr	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Thr	Asp	
	245				250						255					
ACA	CCA	AAA	AGA	TCT	AGG	AGA	GAT	TTT	GGG	CTT	GAT	TGT	GAC	AGA	ATC	871
Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Arg	Ile	
					265					270					275	
TCG	ATG	CTG	TCG	TTA	CCC	TCT	AAC	TGT	GGA	TTT	TGAAGCTTTT					914
Ser	Met	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Asn	Cys	Gly	Phe						
				280					285							
GGATGGGATT	GGATTATTGC	ACCTAAAAGA	TATAAGGCCA	ATTACTGCTC	TGGAGAATGT											974
GAATTTGTAT	TTTTGCAAAA	GTATCCTCAT	ACCCATCTTG	TGCACCAAGC	AAACCCAGA											1034
GGTTCAGCCG	GCCCCTGCTG	TACTCCTACA	AAGATGTCTC	CAATTAATAT	GCTATATTTT											1094
AATGGCGAAG	GACAAATAAT	ATACGGGAAG	ATTCCAGCCA	TGGTAGTAAA	TCGCTGTGGG											1154
TGTTTCATGAG	GTCTATATTT	GGTTCATAGC	TTCCTCAAAC	ATGGAAGGTC	TTCCCCTCAA											1214
CAATTTTGAA	ACTGTTGAAA	TTATGT														1240

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 286 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4

Met Gln Lys Leu Gln Ile Ser Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10
 Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30
 Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr
 35 40 45
 Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60
 Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val
 85 90 95
 Gln Arg Asp Ala Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110
 Ala Arg Thr Glu Thr Val Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Leu Leu
 115 120 125
 Thr Gln Val Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Leu Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Lys Thr Pro Ala Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
 180 185 190
 Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
 195 200 205
 Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
 210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Thr Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
 260 265 270
 Asp Arg Ile Ser Met Leu Ser Leu Pro Ser Asn Cys Gly Phe
 275 280 285

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2676 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5

ES 2 547 858 T3

GTCTCTCGGA	CGGTACATGC	ACTAATATTT	CACTTGGCAT	TACTCAAAAG	CAAAAAGAAG	60
AAATAAGAAC	AAGCGAAAAA	AAAAGATTGT	GCTGATTTTT	AAA	ATG ATG CAA AAA	115
					Met Met Gln Lys	
					1	
CTG CAA ATG TAT GTT TAT ATT TAC CTC TTC ATG CTG ATT GCT GCT GGC	163					
Leu Gln Met Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile Ala Ala Gly						
5 10 15 20						
CCA GTG GAT CTA AAT GAG GGC AGT GAG AGA GAA GAA AAT GTG GAA AAA	211					
Pro Val Asp Leu Asn Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys						
25 30 35						
GAG GGG CTG TGT AAT GCA TGT GCG TGG AGA CAA AAC ACG AGG TAC TCC	259					
Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser						
40 45 50						
AGA ATA GAA GCC ATA AAA ATT CAA ATC CTC AGT AAG CTG CGC CTG GAA	307					
Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu						

ES 2 547 858 T3

55					60					65						
ACA Thr	GCT Ala	CCT Pro	AAC Asn	ATC Ile	AGC Ser	AAA Lys	GAT Asp	GCT Ala	ATA Ile	AGA Arg	CAA Gln	CTT Leu	CTG Leu	CCA Pro	AGA Arg	355
GCG Ala	CCT Pro	CCA Pro	CTC Leu	CGG Arg	GAA Glu	CTG Leu	ATC Ile	GAT Asp	CAG Gln	TAC Tyr	GAC Asp	GTC Val	CAG Gln	AGG Arg	GAT Asp	403
GAC Asp	AGC Ser	AGT Ser	GAT Asp	GGC Gly	TCT Ser	TTG Leu	GAA Glu	GAT Asp	GAC Asp	GAT Asp	TAT Tyr	CAC His	GCT Ala	ACC Thr	ACG Thr	451
GAA Glu	ACA Thr	ATC Ile	ATT Ile	ACC Thr	ATG Met	CCT Pro	ACA Thr	GAG Glu	TCT Ser	GAC Asp	TTT Phe	CTA Leu	ATG Met	CAA Gln	GCG Ala	499
GAT Asp	GGC Gly	AAG Lys	CCC Pro	AAA Lys	TGT Cys	TGC Cys	TTT Phe	TTT Phe	AAA Lys	TTT Phe	AGC Ser	TCT Ser	AAA Lys	ATA Ile	CAG Gln	547
TAC Tyr	AAC Asn	AAA Lys	GTA Val	GTA Val	AAA Lys	GCC Ala	CAA Gln	CTG Leu	TGG Trp	ATA Ile	TAT Tyr	CTC Leu	AGA Arg	CCC Pro	GTC Val	595
AAG Lys	ACT Thr	CCT Pro	ACA Thr	ACA Thr	GTG Val	TTT Phe	GTG Val	CAA Gln	ATC Ile	CTG Leu	AGA Arg	CTC Leu	ATC Ile	AAA Lys	CCC Pro	643
ATG Met	AAA Lys	GAC Asp	GGT Gly	ACA Thr	AGG Arg	TAT Tyr	ACT Thr	GGA Gly	ATC Ile	CGA Arg	TCT Ser	CTG Leu	AAA Lys	CTT Leu	GAC Asp	691
ATG Met	AGC Ser	CCA Pro	GGC Gly	ACT Thr	GGT Gly	ATT Ile	TGG Trp	CAG Gln	AGT Ser	ATT Ile	GAT Asp	GTG Val	AAG Lys	ACA Thr	GTG Val	739
TTG Leu	CAA Gln	AAT Asn	TGG Trp	CTC Leu	AAA Lys	CAG Gln	CCT Pro	GAA Glu	TCC Ser	AAC Asn	TTA Leu	GGC Gly	ATT Ile	GAA Glu	ATC Ile	787
AAA Lys	GCT Ala	TTG Leu	GAT Asp	GAG Glu	AAT Asn	GGC Gly	CAT His	GAT Asp	CTT Leu	GCT Ala	GTA Val	ACC Thr	TTC Phe	CCA Pro	GGA Gly	835
CCA Pro	GGA Gly	GAA Glu	GAT Asp	GGG Gly	CTG Leu	AAT Asn	CCC Pro	TTT Phe	TTA Leu	GAA Glu	GTC Val	AAG Lys	GTG Val	ACA Thr	GAC Asp	883
ACA Thr	CCC Pro	AAG Lys	AGG Arg	TCC Ser	CGG Arg	AGA Arg	GAC Asp	TTT Phe	GGG Gly	CTT Leu	GAC Asp	TGC Cys	GAT Asp	GAG Glu	CAC His	931
TCC Ser	ACG Thr	GAA Glu	TCC Ser	CGG Arg	TGC Cys	TGC Cys	CGC Arg	TAC Tyr	CCC Pro	CTC Leu	ACG Thr	GTC Val	GAT Asp	TTT Phe	GAA Glu	979
GCC Ala	TTT Phe	GGA Gly	TGG Trp	GAC Asp	TGG Trp	ATT Ile	ATC Ile	GCA Ala	CCC Pro	AAA Lys	AGA Arg	TAT Tyr	AAG Lys	GCC Ala	AAT Asn	1027
TAC Tyr	TGC Cys	TCA Ser	GGA Gly	GAG Glu	TGT Cys	GAA Glu	TTT Phe	GTG Val	TTT Phe	TTA Leu	CAA Gln	AAA Lys	TAT Tyr	CCG Pro	CAT His	1075
ACT Thr	CAT His	CTT Leu	GTG Val	CAC His	CAA Gln	GCA Ala	AAC Asn	CCC Pro	AGA Arg	GGC Gly	TCA Ser	GCA Ala	GGC Gly	CCT Pro	TGC Cys	1123

ES 2 547 858 T3

325		330		335		340	
TGC ACT CCG ACA AAA ATG TCT CCC ATT AAT ATG CTA TAT TTT AAT GGC							1171
Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly							
		345		350		355	
AAA GAA CAA ATA ATA TAT GGC AAA ATT CCA GCC ATG GTA GTA GAC CGC							1219
Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg							
		360		365		370	
TGT GGG TGC TCA TGAGCTTTGC ATTAGGTTAG AAACCTCCCA AGTCATGGAA							1271
Cys Gly Cys Ser							
		375					
GGTCTTCCCC TCAATTTCTGA AACTGTGAAT TCAAGCACCA CAGGCTGTAG GCCTTGAGTA							1331
TGCTCTACTA ACGTAAGCAC AAGCTACAGT GTATGAACTA AAAGAGAGAA TAGATGCAAT							1391
GGTTGGCATT CAACCACCAA AATAAAGCAT ACTATAGGAT GTTGTATGAT TTCCAGAGTT							1451
TTTGAAATAG ATGGAGATCA AATTACATTT ATGTCCATAT ATGTATATTA CAACTACAAT							1511
CTAGGCAAGG AAGTGAGAGC ACATCTTGTG GTCTGCTGAG TTAGGAGGGT ATGATTAATA							1571
GGTAAAGTCT TATTTCTCTAA CAGTTTCACT TAATATTTAC AGAACAATCT ATATGTAGCC							1631
TTTGTAAGT GTAGGATTGT TATCATTTAA AAACATCATG TACACTTATA TTTGTATTGT							1691
ATACTTGGTA AGATAAAATT CCACAAAGTA GGAATGGGGC CTCACATACA CATTGCCATT							1751
CCTATTATAA TTGGACAATC CACCACGGTG CTAATGCAGT GCTCAATGGC TCCTACTGGA							1811
CCTCTCGATA GAACACTCTA CAAAGTACGA GTCTCTCTCT CCCTTCCAGG TGCATCTCCA							1871
CACACACAGC ACTAAGTGTT CAATGCATTT TCTTTAAGGA AAGAAGAATC TTTTTTTETA							1931
GAGGTCAACT TTCAGTCAAC TCTAGCACAG CGGGAGTGAC TGCTGCATCT TAAAAGGCAG							1991
CCAAACAGTA TTCATTTTTT AATCTAAATT TCAAAATCAC TGTCTGCCTT TATCACATGG							2051
CAATTTTGTG GTAAAATAAT GGAAATGACT GGTCTATCA ATATTGTATA AAAGACTCTG							2111
AAACAATTAC ATTTATATAA TATGTATACA ATATTGTTTT GTAAATAAGT GTCTCCTTTT							2171
ATATTTACTT TGGTATATTT TTACACTAAT GAAATTTCAA ATCATTAAAG TACAAAGACA							2231
TGTCATGTAT CACAAAAAAG GTGACTGCTT CTATTTTCTA GTGAATTAGC AGATTCAATA							2291
GTGGTCTTAA AACTCTGTAT GTTAAGATTA GAAGGTTATA TTACAATCAA TTTATGTATT							2351
TTTTACATTA TCAACTTATG GTTTCATGGT GGCTGTATCT ATGAATGTGG CTCCCAGTCA							2411
AATTTCAATG CCCACCATTT TTAATAAATTA CAAGCATTAC TAAACATACC AACATGTATC							2471
TAAAGAAATA CAAATATGGT ATCTCAATAA CAGCTACTTT TTTATTTTAT AATTTGACAA							2531
TGAATACATT TCTTTTATTT ACTTCAGTTT TATAAATTGG AACTTTGTTT ATCAAATGTA							2591
TTGTAICTCAT AGCTAAATGA AATTATTTCT TACATAAAAA TGTGTAGAAA CTATAAATTA							2651
AAGTGTTTTT ACATTTTTTGA AAGGC							2676

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 376 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6

Met Met Gln Lys Leu Gln Met Tyr Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu
 1 5 10 15
 Ile Ala Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu
 20 25 30
 Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys
 50 55 60
 Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln
 65 70 75 80
 Leu Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp
 85 90 95
 Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr
 100 105 110
 His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe
 115 120 125
 Leu Met Gln Ala Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser
 130 135 140
 Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr
 145 150 155 160
 Leu Arg Pro Val Lys Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg
 165 170 175
 Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser
 180 185 190
 Leu Lys Leu Asp Met Ser Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp
 195 200 205
 Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu
 210 215 220
 Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val
 245 250 255
 Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp
 260 265 270
 Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr
 275 280 285
 Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg
 290 295 300
 Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln
 305 310 315 320
 Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser
 325 330 335

Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu
 340 345 350
 Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met
 355 360 365
 Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2215 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7

NGATTTTCTA ATGCAAGTGG ATGGAAAACC CAAATGTTGC TTCTTTAAAT TTAGCTCTAA	60
AATACAATAC AATAAAGTAG TAAAGGCCCA ACTATCCATA TATTTGAGAC CCGTCGAGAC	120
TCCTACAACA GTGTTTGTGC AAATCCTGAG ACTCATCAAA CCTATGAAAG ACGGTACAAG	180
GTATCTGGAA TCCGATCTCT GAAACTTGAC ATGAACCCAG GCACTGGTAT TTGGGCAGAN	240
ATTGATGTGA AGACACTGTT GCAAAATTGG CTCAAACAAC CTGAATCCAA CTTAGGCATT	300
GAAATAAAAG CTTTACATGA GAATGGTCAT GATCTTGCTG TAACCTTCCC AGGACCAGGA	360
AGAAGATGGG CTGAATCCCT TTTTAAAGAA GGTCAAGGTA ACAGACACAC CAAAAGATT	420
CCAGAAGGGA TTTTGGGTCT TGACTGGTGA TGAGCACTCA ACAGAATCAC GATCCTGTCC	480
TTACCCCTA ACTGGTGGAT TTTGAAGCCT TTGGGATGGG ATTGGATATC GNNNNNNNNN	540
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	600
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	660
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	720
NNNNNNNNNN NAGCGATGGT AGTAGACCGC TGTGGGTGCT CAGCGATGGT AGTAGACCGC	780
TGTGGGTGCT CTTTTCAAGC TGTGAAATTA AGTACCACAG GCTATAGGCC TAGAGTATGC	840
TACAGTCACT TAAGCATAAG CTACAGTATG TAAACTAAAA GGGGAANGG GAATATATGC	900
AATGGTTGGC ATTTAACCAT CCAAACAAAT CATAACAGAA AGTTTTATGA TTTCCANAGT	960
TTTTNAGGC NAGAAAGGAG GAGTCAAANT TTCANTCTTA TGGTNNNNNN NNNNNNNNNN	1020
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1080
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1140
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNATTTTCG GCACAGGTNA AACACTTGAA	1200
TTTATATTGT ATGGTAGTAT ACTTGGTAAG ATAAAATTCC ACAAATAG GGATGGTGCA	1260
GCATATGCAA TTTCCATTCC TATTATAATT GACACAGTAC ATTAACAATC CATGCCAACG	1320
GTGCTAATAC GATAGGCTGA NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1380
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1440
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1500

NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1560
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1620
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1680
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1740
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1800
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1860
NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	1920
TAAATCTCAA	CGTTCCTTA	TTTAACTACT	TGCAAAAACA	TTACTAAGTA	TACCAAAATA	1980
ATTGACTCTA	TTATCTGAAA	TGAAGAATAA	ACTGATGCTA	TCTCAACAAT	AACTGTTACT	2040
TTTATTTTAT	AATTTGATAA	TGAATATATT	TCTGCATTTA	TTTACTTCTG	TTTTGTAAAT	2100
TGGGATTTTG	TTAATCAAAT	TTATTGTACT	ATGACTAAAT	GAAATTATTT	CTTACATCTA	2160
ATTTGTAGAA	ACAGTATAAG	TTATATTAAG	GTGTTTTTAC	ATTTTTTTGA	AAGAC	2215

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 375 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9
 GGCCCAACTA TGGATATATT TG 22

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10
 GGTCTGGGA AGGTTACAGC A 21

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 11 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11
ATGAACACTC C 11
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 15 (A) LONGITUD: 26 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12
CAGCAAAGTC CTTAATGGTA ACAAGC 26
- 20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 25 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13
GGGTCACTGA AGAAAACGTC CTG 23
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 40 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14
CCCCATATTA TGGAGATGAA CCG 23
- 45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 15
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15
AGTTCAGGAT GGCAGAATTT CAG 23
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 16
- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 65 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleicos
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16
GCAAACTGGG YGGRAGCAAG ACC 23

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 24 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (Xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17
TTSTTCCTGG GCTTTTATTG AGAC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 26 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18
AAGCCWGAT TTCTGCTTYT TGGAAG 26

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19
TGCCMAGGCA HCCRCCRTAC TTGAA 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 19 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 20
GGTCGTCCTA CACCAGAAG 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 21

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 22 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(Xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 21
GGTTGACATT GTCAAGAACA AG 22

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 22

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 22
TCTCMAAAGT CGTCTGTGAC AATC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 23
TGYTCRTTTT CTTTCAGAGT TGC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 24
RCTGGTCCT CTTCACCTCA GAAC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 25
ACATTGTCVG TTCCAAAGCC AAG 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 26

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 26
AGGTTCGGGT GACDGTGCTK C 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 27

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 27
TGGRTACATG AGYTCCACCT TGC 23

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 28

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 28
AGCTGCARGT ATWCCTACAA YCT 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 29

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 29
GTCCRTTGC TCYTCTCRTT GYC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 30

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 30
AACTGTATAT TGAGAGCCTA CCATG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 31

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 24 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 31
CACACCTTAG CGACTAAACC ACCA 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 32

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 32
CTACCTAACA GAATGATTTT GTAAG 25

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 33

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 33
AGTGTCTTG CCTAGAGAAT CCCAG 25

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 34

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 34
ACATTCTCTC ACCAATATGA CATAC 25

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 35
TAAGTCACCA TTACATCCTT AGAAC 25

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 36

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 36
GCTGTAAGAA TCTTCATTAA GCACT 25

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 37

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 37
CCTGATACAT GCTAAGGTTA AAAAC 25

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 38

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60

65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 38
AGGCATACAT CTGGAGAGAA ACATG 25

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 39

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 39
CAGAGGAGCC TAGCAGGCTA CCGTC 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 40
CAGCAGGTCT GTTGAAGTGT ATCAG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 41

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 41
AGTGGTAGCA TTCACAGGTA GCCAG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 42

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 20 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 42
CAGTCCATGG CACCATAAAG 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 43

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 22 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 43
TCCGTTAGTA CTGGCTAATT GC 22

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 44

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 44
CTGAATTGGC TCCAAAGGCC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 45
AAACAGAAGT CCAGGGCTGC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 46

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 46
TCAGTCTCCA GGAGAGAAAA C 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 47

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 47
CTCTGCCCTG GGGATGATTG 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 48

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 48
AATGTATGTT TATATTTACC TGTTTCATG 28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 49

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 25 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 49
ACAGTGTGG TGCAAATCCT GAGAC 25

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 50
CAATGCCTAA GTTGGATTCA GGTTG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 51

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 25 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 51
CTTGCTGTAA CCTTCCCAGG ACCAG 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 52

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 23 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 52
TCCCATCCAA AGGCTTCAAA ATC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 53

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 24 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 53
ATACTCWAGG CCTAYAGCCT GTGGT

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 54

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 5790 pares de base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 54

GCGGCCGCC	GGGCAGGTAT	CGAAAGTTTC	ACATATAAAG	ATGAATAAGA	TCTAAGTGTA		60			
TATGTTATTG	TTAATAAAGT	TTTTAATTTT	TCGAATGTCA	CATACAGCCT	TTATTATTCA		120			
TAGATTTATT	CCTTTTAAGA	AGTAGTCAAA	TGAATCAGCT	CACCCTTGAC	TGTAACAAAA		180			
TACTGTTTGG	TGACTTGTGA	CAGACAGGGT	TTAACCTCT	GACAGCGAGA	TTCATTGTGG		240			
AGCAAGAGCC	AATCACAGAT	CCCGACGACA	CTTGTCTCAT	CAAAGTTGGA	ATATAAAAAG		300			
CCACTTGGA	TACAGTATAA	AAGATTCACT	GGTGTGGCAA	GTTGTCTCTA	GACTGGGCAG		360			
GCATTAACGT	TTGGCTTGGC	GTTACTCAAA	AGCAAAGAA	AAGTAAAAGG	AAGAAGTAAG		420			
AACAAGGAA	AAGATTGTAT	TGATTTTAAA	ACC ATG CAA	AAA CTG CAA	ATC TCT		474			
			Met	Gln	Lys	Leu	Gln	Ile	Ser	
			1				5			
GTT TAT ATT TAC CTA TTT ATG CTG ATT GTT GCT GGC CCA GTG GAT CTG										522
Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile Val Ala Gly Pro Val Asp Leu										
	10					15			20	
AAT GAG AAC AGC GAG CAG AAG GAA AAT GTG GAA AAA GAG GGG CTG TGT										570
Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys						30			35	
	25									
AAT GCA TGT TTG TGG AGG GAA AAC ACT ACA TCC TCA AGA CTA GAA GCC										618
Asn Ala Cys Leu Trp Arg Glu Asn Thr Thr Ser Ser Arg Leu Glu Ala										
	40			45				50		55
ATA AAA ATC CAA ATC CTC AGT AAA CTT CGC CTG GAA ACA GCT CCT AAC										666
Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn										
			60				65			70
ATC AGC AAA GAT GCT ATC AGA CAA CTT TTG CCC AAG GCT CCT CCA CTC										714
Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu										
			75			80				85
CTG GAA CTG ATT GAT CAG TTC GAT GTC CAG AGA GAT GCC AGC AGT GAC										762
Leu Glu Leu Ile Asp Gln Phe Asp Val Gln Arg Asp Ala Ser Ser Asp										
	90					95			100	
GGC TCC TTG GAA GAC GAT GAC TAC CAC GCC AGG ACG GAA ACG GTC ATT										810
Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Arg Thr Glu Thr Val Ile										
	105				110				115	
ACC ATG CCC ACG GAG T GTGAGTAGTC CTGCTGGTGC AAAGCAACGA CTCTGCTGAC										866
Thr Met Pro Thr Glu										
	120									
TGCTGTTCTA GTGTTTATGA AAAACCGATC TATTTTCAGG CTCTTTTAAAC AAGCTGCTGG										926
CTTGATATGTA AGGAGGAGGG GAAAGAGCTT TTTTCAAGAT TTCATGAGAA ATAGACCAAT										986
GAGACTGAAA GCTGCTACTT TATTTGTTTC CTTAGAGAGC TAAAAAGCTA AAAATCAAAA										1046
ATGAAATGCT TGCATAGCAT TCATGTTATA TAGTTTAGTA TGACAACATAT AACATGTTTA										1106
TGTTTTCACA GCTTAATGCT ACCAAGGTAA AGGATTGGGA AACAGTATCA GCAATGTGAA										1166
AAATTTACAT CAAATTTCTT AATTGCATTT GGTTGCCTGA AATATGCATT TATAATAACA										1226
GGTTTTTTTT TTTTCATTA TAAAAGAGAA AGGAAGAAAT CTGTAGAGGT TGAAGCCTAT										1286

CTGGGCATTT GCTGAACACT TAGAATGACT TCTGTTATTC AAAACTATTT CTCATAGGGT	1346
TTTTATGGTC TTCACAGAGT ATCTAATTTT GAAAGCTATT AGAGTGGAAA GGATAAAAGA	1406
ATATTCTTAA TAAACTTAAT GTATTAGTAA GAGCAATAAG GAAGTAAACA CAGCATAGTG	1466
AAAAATCATG AGCTAATCAG CAGAAAATTC TAAGAAATAA ACATTTTAAT TACAAAGTTC	1526
CAC TTATACC CTGACCATGG TACTATTGTT GAGAGTACCT TGTCTGCACA TATCTAGGAG	1586
GCACATGCTT AATAACCTTC TAAAATATTA TTGTATTCCT CATAGGAGGG AGAACTATTA	1646
CCTATATGTA GTACCTATGT TGTTTCTGAA AGATAATATG TTTCATGTAT TTCTGTTGCA	1706
GTCAC TTCAA ACCTATACTC AAGGAAAGGG AGACAGGCAT CTCAACAGAG AAGGCATGAC	1766
CAGAAAGAGT TTTGTGCCAT GTGTCTGCGA TCTTGCTTTA TACAGGGCTC TACCCACTTT	1826
AAACTGGACT CAAAACAGTT TCAAAATACT GCTTTTTCTT ATTAAGTAAC TAGTTTATAA	1886
GGCAACAAAT AAATTTCTT TAAGACTGTG CTATCAGATA ATCCTGGAAT AGATTTGCCT	1946
TACTTATAAA CAATCTTGAG AAAACAAAAA GGCAAGAAAT TGCTAAGTGC TTCTGCTTAC	2006
AATGACAGCC TGGCCCTAAA GACAATGTTT TCTAAGTTTT GAAACAGCTT GAATACAACA	2066
TCTAAGTTTT GGTGCTAATT ACCTGCTAGT TTTTTATTT TTTTCCTTTA AAAGGCTGTC	2126
CCAGCGTCTT AACATAACAG ATGCACTATA TTTTCTGCTA ATTCCCGAGG CTCAGTTAGT	2186
TGCTCACTGT GTCTTGTCCT CAGGTAATTC AGGCCTGGGG GAAGGGTTCC TTCCTCCAGA	2246
CTGATTGGTA CAGCTGCTCA GTAAGTGTA CTACTCAGAT TCCCAAAGAA TTCTAAGTGG	2306
ATGTTCTTCC ACAGTGCTC TTGTTCTCTC TAATCATCAT CATTTTAAAA TTTCATCCAC	2366
TTTTCATTCC TTAATAGAAT TTTCTTAGT CCACAGTTCT CTGGAAAGGA AGTAGGCTTC	2426
TCATAACAGC TGAAAAACA TATACCTAAA AGATTCTGAA AAGCTGTAAT AACTGTTATA	2486
CTTGATATTT TGCTGTTATG AATGAAATGC TACATATTTT TCCATTTTAA AAGACTAAAT	2546
ATGCACACAT TATTCCAATT AAAAAATGTT CATAGATTGA TATGGAGGTG TTCGTTTATT	2606
TTTCATAAAA ATGATCTTAG TAACTTTTTT TCTTATTCAT TTATAG CT GAT CTT CTA	2663
	Ser Asp Leu Leu 125
ACG CAA GTG GAA GGA AAA CCC AAA TGT TGC TTC TTT AAA TTT AGC TCT	2711
Thr Gln Val Glu Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser	
130 135 140	
AAG ATA CAA TAC AAT AAA CTA GTA AAG GCC CAA CTG TGG ATA TAT CTG	2759
Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Leu Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu	
145 150 155 160	
AGG CCT GTC AAG ACT CCT GCG ACA GTG TTT GTG CAA ATC CTG AGA CTC	2807
Arg Pro Val Lys Thr Pro Ala Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu	
165 170 175	
ATC AAA CCC ATG AAA GAC GGT ACA AGG TAT ACT GGA ATC CGA TCT CTG	2855
Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu	
180 185 190	
AAA CTT GAC ATG AAC CCA GGC ACT GGT ATT TGG CAG AGC ATT GAT GTG	2903
Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val	
195 200 205	

ES 2 547 858 T3

AAG ACA GTG TTG CAG AAC TGG CTC AAA CAA CCT GAA TCC AAC TTA GGC Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly 210 215 220	2951
ATT GAA ATC AAA GCT TTA GAT GAG AAT GGC CAT GAT CTT GCT GTA ACC Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr 225 230 235 240	2999
TTC CCA GAA CCA GGA GAA GAT GGA CTG GTAAGTGATT ACTGAAAATA Phe Pro Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu 245	3046
ACATGCTAAA AACCTTGTTA TGTGTTTATT CATAATGTGA ATGAATAGTA GTGAAAAATA	3106
ACTACCAGTT TCCTGTGCTT ATAAGCCAGA CAAAGGCACC TTACCCAGT GGTAGCCCTG	3166
TACTCAATAA AAGTAGGTGT CCCATTTAC ATCCTATGAA ACACTCTCTT GATACTTTGA	3226
CTTTGCATGA GGATTTAAAA GAAAAAAGT TATACCATGG TCCTTAAGTT TTTAGGGAAT	3286
TCTTTGGAAT TGAGAATGAA ATATAAAATG CTTTCCGTTG ATGTGCTACA TGATTATATA	3346
AATAAAAACA TGAAGTCTTC ACAGTGGATT CTAGTACTCA CCCAACACA CATTTTTTCC	3406
CCCAGAAGAG TGACCAATTT GTTAAAATTC TTTTGCTTAA TAAGGCAGAA AAATGAACTC	3466
TACAAGTTAT AATTAATAA AAATGCTTTT ACTTATAGAA ATTAAGTAGA TATATGTTCA	3526
GGTTTATATA CTATTAATA TACTATATTT AAGATCTCTC ATGATAAATA TGTTCCCTGT	3586
TTTATAGACT ATTGATGCAC TGATGTATAT GTGGACTACT TTGTGAATTA CCCCTGGTAA	3646
AATTAATAAAT TTCAGGCTAG TTAACCTGTA CTAAGTACT ATTTTCTGAA CTGTCTTACT	3706
GTTCTTTAAC AGGAGTTAAC TTAGGTAATG TCAACTAATT TAATATAAAG TCAAACAGAA	3766
AATAATGCCT TATATATTAT AAAAATTAAT AAAAACCAT TTTAAAATCT AGTATAAGTT	3826
TAGAGCTACT CACTCTTCTG GCTTATCTAT GCTTGTATTT ACTTCTGTTT TCAAAAAATT	3886
TTTTAATGTG ACCATACCTT TTATTTCCAG TTATTGATAT AATTTACAAC AAAAGATTAT	3946
ACTTGCAAGC TTTATAGTTT TTAATGGTC TTATTTGTAG TGAATATCAT ATCTAAATGA	4006
TATCTAAATG TAAAGTAAAT CATACTAAA TGAAAACATA TTCTTTAAGT CATTATAAAA	4066
TTTTCCAGGT GATCAATTTT TCTTTAAATA TACTACATAA AATGTTATTG ACTCCCAAAA	4126
TGATGTTATT TTGTATAATC TTAATACCA ATAATTACCA GGTCTATTTT GGTTTTAGTG	4186
TAGGATAAAA AAGAATGTGT TCTTTTTTCT AGGTAGCATT TTAATGATCA AAGTTGGTGA	4246
CGTGACAGAG GTCTTAAGTA TTATTAACA GATGATTAAT AAGATGTATT CCTCAGACTT	4306
TTCCATATAA AAGGAAAAAT GTCTCAAAT CATGAAAAGA TTGGTACAGG AGGAGGATTA	4366
GCAAATTGTA GTTTAAATAT CTGAATGGAA ACACTTTTTA GTGAAAGAAT AAAGGGAATA	4426
TCATTGTATC TTCTTCTGAG TCTGTGCCTC TCTCTCTGG AGTTAGTCTT TCCAACCCTA	4486
TATACTTACC ACTATCTTCA TCCCTCTACC TCCCTTTTTT CCATTACATC TGTGCAGTAC	4546
TGGGTGGCAA CTATTGTGTT TCGGTGTAA TATCCAAGTT TCCCTGAATA AGACCAAGTG	4606
AATGGAGGAT GAATGAGTAT ACCTATCCCT CCAGGGGTCA TCAGACATAT TTAGCCACCA	4666
TATTTAATCA ATAAGCAGGA AGACATAAGC TAGCCTTGTC CTTCTTCTTT CCTCCCTGCT	4726
CCTTCTCTT CTCTTCCCC TCTCCCTTTA CTGTCATCCA TCAGTATTTT CAGAGCATCT	4786

ATTATGTGTC	AGGCATT	CAG	ATACTCAAAC	GGAGGAAAAC	AAGAATAAAC	AAGACAAAGA	4846									
TCTGACCACA	GGGGAATCCC	TATGGCTACT	GTAGACTTTT	GAGCCATAAA	GGAAGAATCA	4906										
AGCCTAGTGT	AAATGAAAAT	TCCTTAATGC	TGTGCCTTTT	AAAAAGAAAT	GTGACATAAG	4966										
CAAAATGATT	AGTTTCTTTC	TTTAATAATG	AGTCCTTGAG	GTAGGAGAGT	GTTTTGGGAT	5026										
CTATTATTAA	CTCTTCTTTC	CTTTCCATAC	AG	ACT Thr 250	CCT Pro	TTT Phe	TTA Leu	GAA Glu	GTC Val 255	AAG Lys	5079					
GTA	ACA	GAC	ACA	CCA	AAA	AGA	TCT	AGG	AGA	GAT	TTT	GGG	CTT	GAT	TGT	5127
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	
			260					265					270			
GAT	GAA	CAC	TCC	ACA	GAA	TCT	CGA	TGC	TGT	CGT	TAC	CCT	CTA	ACT	GTG	5175
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	
		275					280					285				
GAT	TTT	GAA	GCT	TTT	GGA	TGG	GAT	TGG	ATT	ATT	GCA	CCT	AAA	AGA	TAT	5223
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	
		290				295					300					
AAG	GCC	AAT	TAC	TGC	TCT	GGA	GAA	TGT	GAA	TTT	GTA	TTT	TTG	CAA	AAG	5271
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys	
					310					315					320	
TAT	CCT	CAT	ACC	CAT	CTT	GTG	CAC	CAA	GCA	AAC	CCC	AGA	GGT	TCA	GCC	5319
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	
				325				330						335		
GGC	CCC	TGC	TGT	ACT	CCT	ACA	AAG	ATG	TCT	CCA	ATT	AAT	ATG	CTA	TAT	5367
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	
			340					345					350			
TTT	AAT	GGC	GAA	GGA	CAA	ATA	ATA	TAC	GGG	AAG	ATT	CCA	GCC	ATG	GTA	5415
Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Ala	Met	Val	
		355				360						365				
GTA	GAT	CGC	TGT	GGG	TGT	TCA	TGAGGTCTAT	ATTTGGTTCA	TAGCTTCCTC							5466
Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser										
		370				375										
AAACATGGAA	GGTCTTCCC	TCAACAATTT	TGAAACTGTG	AAATTATGTA	CCACAGGCTA	5526										
TAAGCCTAGA	GTATGCTACA	GTCACCTAAG	CACAAGCTAC	AGTATATGAG	CTAAAAAGAG	5586										
AGAATATATG	CAATGGTTGG	CATTTAACCA	TCCAAACAAA	TCGTATAATA	AAAAGTTTTA	5646										
TGATTTCCAG	AGTTTTTGAA	CTAGGAGATC	AAATTCCATT	TATGTTGAAA	TATATTACAA	5706										
CACATGCAGG	TGAATGAAAG	CAATTCTCCT	TGCTTCTGG	TGAATTAAG	GAGTATGCTT	5766										
TAAAACTAT	TTCTCTACAG	TTTC				5790										

REIVINDICACIONES

1. Un kit de diagnóstico, para determinar el genotipo de una muestra de material genético de mamífero, comprendiendo el kit:

5 un par de cebadores, en donde un primero de los cebadores incluye una secuencia nucleotídica de suficiente longitud y suficientemente complementaria a una mutación de la SEC ID N° 1 y que se une en condiciones de alta rigurosidad a una secuencia de ácido nucleico que contiene dicha mutación, seleccionándose la mutación entre el grupo de mutaciones resultantes de:

- 10 (a) delección de 11 nucleótidos empezando en el nucleótido 821 de la parte codificante de la SEC ID N° 1;
 (b) delección de 7 nucleótidos empezando en el nucleótido 419 de la secuencia codificante e inserción de la secuencia AAGCATACAA en su lugar;
 15 (c) delección del nucleótido 610 de la secuencia codificante e inserción de T en su lugar;
 (d) delección del nucleótido 676 de la secuencia codificante e inserción de T en su lugar; y
 (e) combinaciones de las mutaciones (a) a (d).

2. El kit de diagnóstico de la reivindicación 1 en el que un segundo del par de cebadores está localizado completamente cadena arriba o completamente cadena abajo de la mutación o de las mutaciones seleccionadas.

20 3. El kit de diagnóstico de la reivindicación 2 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (a) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia nucleotídica identificada como SEC ID N° 11 para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la SEC ID N° 11.

25 4. El kit de diagnóstico de la reivindicación 2 en el que un dicho primer cebador es suficientemente complementario a la secuencia insertada de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la mutación (b) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia correspondiente a la delección de 7 nucleótidos de la mutación (b) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que contiene la delección de 7 nucleótidos de la mutación (b).

30 5. El kit de diagnóstico de la reivindicación 2 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (c) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la región correspondiente que carece de la mutación (c) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (c).

35 6. El kit de diagnóstico de la reivindicación 2 en el que un dicho primer cebador abarca la mutación (d) y que comprende adicionalmente un tercer cebador que es suficientemente complementario a la secuencia que abarca la región correspondiente que carece de la mutación (d) para cebar la amplificación de una molécula de ácido nucleico que carece de la mutación (d).

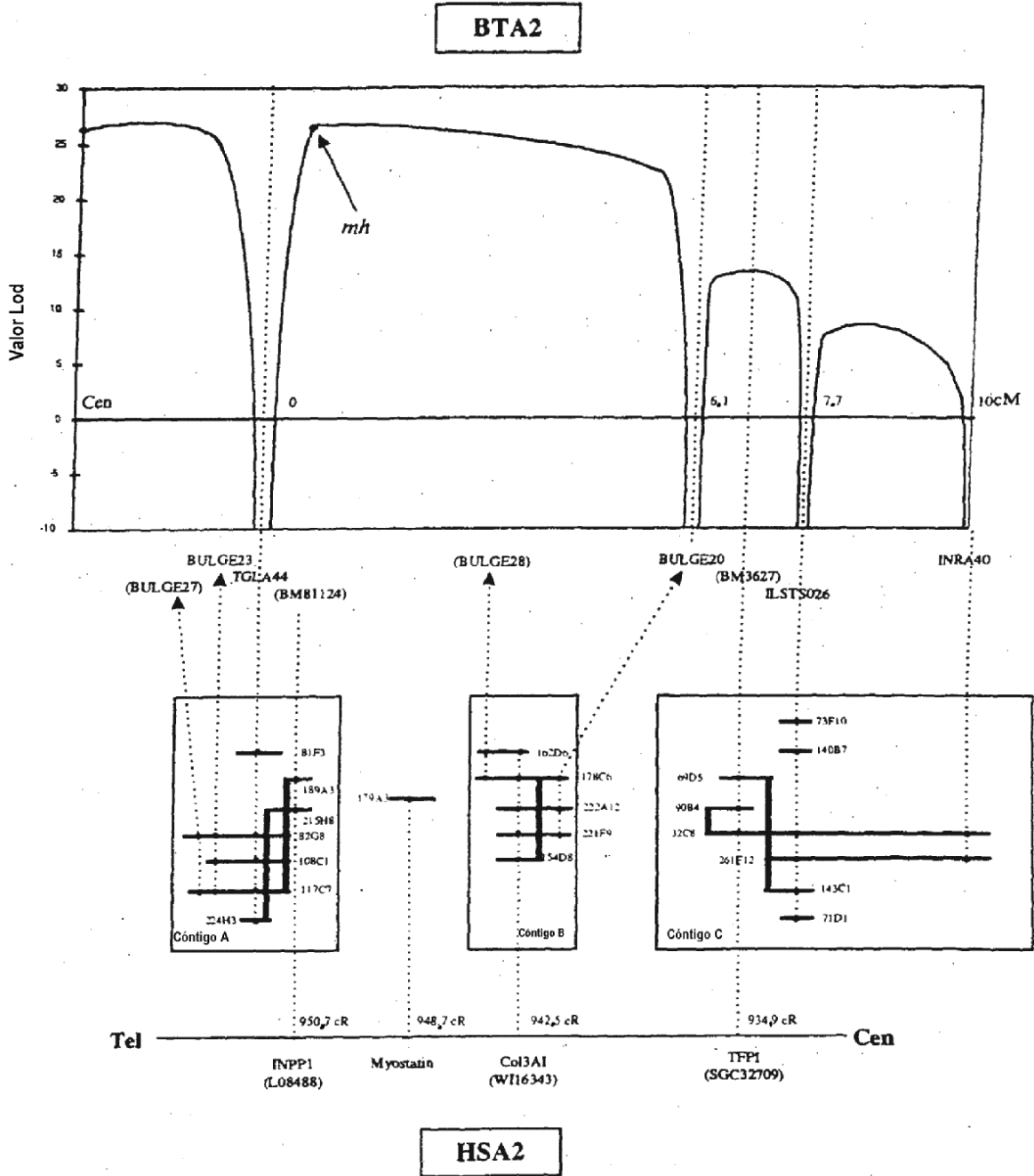
7. Un procedimiento para determinar la presencia de hiperplasia muscular en un animal bovino, comprendiendo el procedimiento:

45 averiguar si está presente ADN que tiene una mutación definida en la reivindicación 1 en una muestra de material que contiene ADN de dicho animal usando cebadores definidos en la reivindicación 1 o una sonda de longitud suficiente y suficientemente complementaria a una molécula de ácido nucleico que contiene dicha mutación y que se une en condiciones de alta rigurosidad a una secuencia de ácido nucleico que contiene dicha mutación; y averiguar si está presente ADN que tiene una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene actividad biológica de miostatina, en donde la ausencia de ADN que tiene dicha secuencia nucleotídica y la presencia de dicha mutación indican la presencia de hiperplasia muscular en el animal.

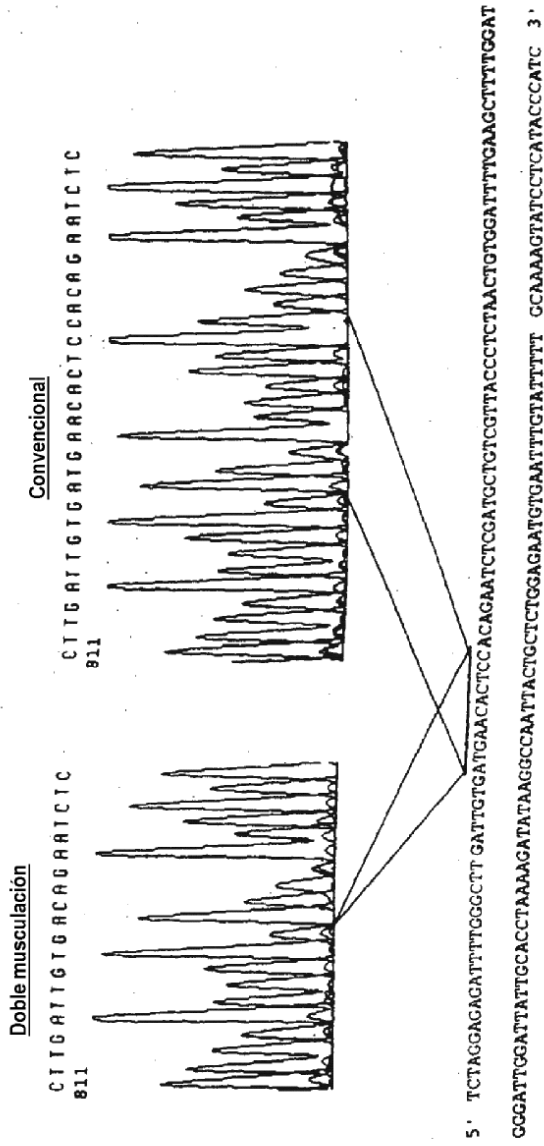
50 8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el animal es una raza seleccionada entre Azul Belga, Asturiana, Parthenaise y Rubia Gallega.

55

Fig 1



A.



B.

100
MMQKIQMYY IYLFMLIAAG PVDLNEGSEER EENVEKEGLC NACAMRQNR YSRLEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLRE LIDQYDVQRD
----- --DLNENSEQ KENVEKEGLC NACLWRENTT SSRLEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLLE LIDQYDVQRD
----- PVDLNEGSEER EENVEKEGLC NACLWRENTT SSRLEAIKIQ ILSKLRLETA PNISKDAIRQ LLPRAPPLLE LIDQYDVQRD

150
DSSDGSLEDD DYHATTEVII TPTESDFELM QADGPKKCCF KFSSKIQYN KVVKAQMIY LRPVKTPTTV FVQILRLIKP MKDGTTRYTGI RSLKLDMSPG
ASSDGSLEDD DYHARTETVI TPTESDLIT QVEGPKKCCF KFSSKIQYN KVVKAQMIY LRPVKTPTTV FVQILRLIKP MKDGTTRYTGI RSLKLDMSPG
ASSDGSLEDD DYHARTETVI TPTESDLIT QVEGPKKCCF KFSSKIQYN KVVKAQMIY LRPVKTPTTV FVQILRLIKP MKDGTTRYTGI RSLKLDMSPG

201
TGIWQSIDVK TVLQNLKQP ESNLQIEIKA LDENGHDILAV TFPQGEDGL NPELEKVTVD TPMSRRDFG LD QDEHSTES RCGRYPLTVD FEAFGMDWII
TGIWQSIDVK TV QNLKQP ESNLQIEIKA LDENGHDILAV TFPQGEDGL TPELEKVTVD TPMSRRDFG LD QDEHSTES RCGRYPLTVD FEAFGMDWII
TGIWQSIDVK TVLQNLKQP ESNLQIEIKA LDENGHDILAV TFPQGEDGL TPELEKVTVD TPMSRRDFG LD QDEHSTES RCGRYPLTVD FEAFGMDWII

300
APRYKANYC SGECEYVPLQ KYPTHLVHQ ANPRGSAGP C CTPTKMSPIN MLYFNCKEQI IYKIPAMVV DR CCGCS*
APRYKANYC SGECEYVPLQ KYPTHLVHQ ANPRGSAGP C CTPTKMSPIN MLYFNCKEQI IYKIPAMVV DR CCGCS*
APRYKANYC SGECEYVPLQ KYPTHLVHQ ANPRGSAGP C CTPTKMSPIN MLYFNCKEQI IYKIPAMVV DR CCGCS*

376

Fig 2

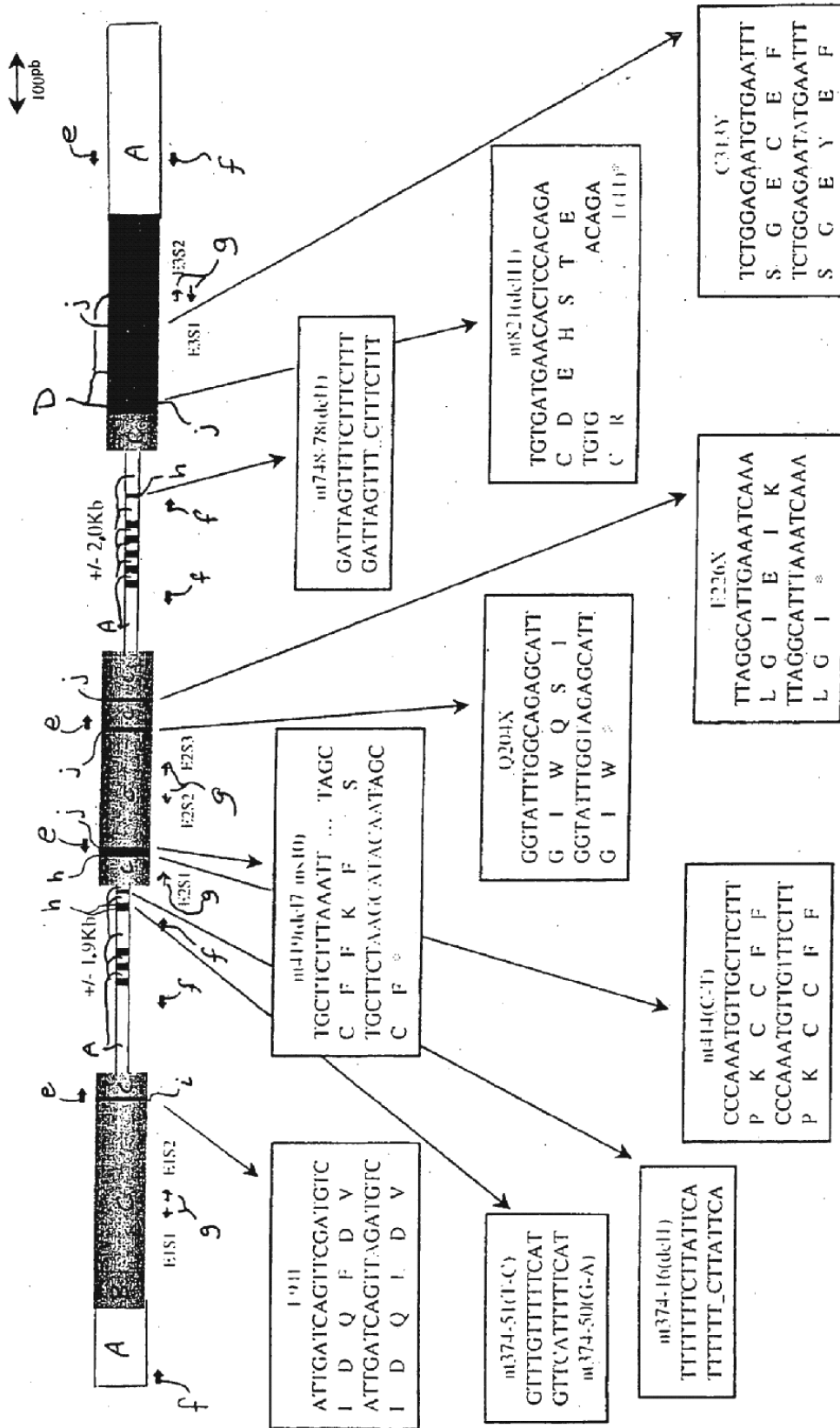


Fig 3

+	+	+	+	+	+	+
				8		
			8	9		
4						
					4	
1			1			8
	3	5				
			6			
			4			
			4			
					4	

F94L
n374-51(T-C)
n374-50(G-A)
n374-6(2d1)
n414(C-T)
n419(dcl7-am10)
Q204X
E226X
n748-78(dcl1)
n821(dcl1)
C313Y

Hols.-Jersey
BBCB
Bl.Aqui.
Charolais
Gasconne
Limous.
Maine-Anj.
Parthen.
Asturiana
Rub.Gal.
Piedmont.

Fig 4