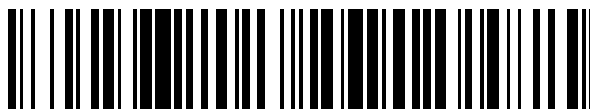


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 131**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06	(2006.01) A61K 38/05	(2006.01)
C07K 5/08	(2006.01) A61K 38/06	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	
A61P 3/04	(2006.01)	
C07K 5/062	(2006.01)	
C07K 5/083	(2006.01)	
C07K 5/087	(2006.01)	
C07K 5/09	(2006.01)	
C07K 5/065	(2006.01)	
C07K 5/072	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008** **E 08855879 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2225261**

54 Título: **Inhibidores boropéptidos de enteropeptidasa y sus usos en tratamientos de obesidad, sobrepeso y/o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de la grasa**

30 Prioridad:

03.12.2007 US 996732 P

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

24.06.2016

73 Titular/es:

OBE THERAPY BIOTECHNOLOGY (100.0%)
4 RUE PIERRE FONTAINE
91000 EVRY, FR

72 Inventor/es:

HAROSH, ITZIK y
BRAUD, SANDRINE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 575 131 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).

Inhibidores boropéptidos de enteropeptidasa y sus usos en tratamientos de obesidad, sobrepeso y/o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de la grasa.

Descripción

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a nuevos oligopéptidos no absorbibles en base a boroanálogos de aminoácidos que incorporan una función protonable en su cadena lateral, tales como boroarginina, borolisina, boroornitina, y compuestos relacionados, que modulan selectivamente, regulan y/o inhibir enteropeptidasa. Estos compuestos se utilizan de forma individual, en combinación o en asociación con otros compuestos conocidos para el tratamiento de exceso de peso, la obesidad y las enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de la grasa.

ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR RELACIONADA

[0002] La obesidad es una enfermedad crónica de múltiples facetas y es el problema nutricional más frecuente en los Estados Unidos hoy en día. La obesidad, una condición causada por un exceso de ingesta de energía en comparación con el gasto de energía, contribuye a la patogénesis de la hipertensión, diabetes no insulino dependiente mellitus de tipo II o, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, enfermedades del corazón, pancreatitis, y formas de cáncer comunes, como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero y cáncer de colon.

[0003] En la actualidad, sólo un número limitado de fármacos para el tratamiento de la obesidad están disponibles comercialmente. Por desgracia, mientras que algunos de estos medicamentos pueden traer alivio a corto plazo para el paciente, aún no se ha logrado un éxito del tratamiento a largo plazo. También se describen métodos ejemplares de tratamiento de la obesidad en la patente de EE.UU. N^{os}. 3.867.539; 4.446.138; 4.588.724; 4.745.122; 5.019.594; 5.300.298; 5.403.851; 5.567.714; 5.573.774; 5.578.613; y 5.900.411.

[0004] Uno de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la obesidad, desarrollado por Hoffman-LaRoche, es un inhibidor de la lipasa pancreática (PL). La lipasa pancreática es responsable de la degradación de los triglicéridos a monoglicéridos. Sin embargo, se ha asociado con efectos secundarios tales como diarrea grave que resulta en la inhibición de la absorción de una sola fracción específica de ácidos grasos y, ha sido conocido para inducir reacciones alérgicas. El tratamiento con inhibidores de la PL es por lo tanto muy desventajosa e incluso puede exponer al sujeto tratado a riesgos que amenazan la vida.

[0005] Recientemente, se ha sugerido que la absorción de grasa se puede reducir mediante la inhibición de la actividad de la proteína microsomal de triglicéridos de transferencia (MTP), que está implicado en la formación y secreción de lipoproteínas de densidad muy ligera (VLDL) y quilomicrones. Sharp et al, [Nature (1993) 365:65-69]. Y Wetterau et al, [Science (1994) 282:751-754,] demostraron que el gen de MTP es responsable de la enfermedad abetalipoproteinemia. EE.UU. N^{os}. 6.066.650, 6.121.283 y 6.369.075 describen composiciones que incluyen inhibidores de MTP, que tienen por objeto el tratamiento de diversas afecciones asociadas con la absorción de la grasa excesiva. Sin embargo, los pacientes tratados con inhibidores de MTP sufren efectos secundarios importantes, incluyendo la esteatosis hepática, que se atribuye a la actividad de MTP reducida tanto en el intestino como en el hígado. Esto no es sorprendente, ya que las personas naturalmente deficientes para la actividad MTP desarrollaron hígado graso [Kane y Havel (1989); Trastornos de la biogénesis y la secreción de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B. el pp 1139-1164 en: "La base metabólica de la enfermedad hereditaria" (Scriver et al., eds). McGraw-Hill, Nueva York]. De hecho, la compañía Bristol Myers Squibb, que desarrollaron inhibidores de MTP para el tratamiento de la obesidad, ha decidido recientemente abandonar este objetivo, debido a este efecto secundario de hígado graso.

[0006] Los objetivos conocidos en la actualidad para el tratamiento de la obesidad y trastornos relacionados se pueden dividir en cuatro clases principales: (i) bloqueadores del apetito, que incluyen por ejemplo, el NPY (neuropéptido Y); (ii) estimuladores de saciedad, que incluyen, por ejemplo, el producto de la *ob*, genes *db* y *aguti*; (iii) agentes de quema de ácido graso o de energía, que incluyen las UCP (proteínas de desacoplamiento); y (iv) inhibidores de absorción de grasa, tales como los que actúan en PL y MTP en el intestino, se ha descrito anteriormente.

[0007] Como se ha discutido en la presente memoria, el uso de estos objetivos es muy limitado por su redundancia, su orientación múltiple y/o su falta de especificidad de tejido.

[0008] Hay por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener composiciones y procedimientos para tratar la obesidad y enfermedades relacionadas y trastornos que carecen de las limitaciones anteriores.

[0009] Las proteasas de serina están implicadas en un gran número de procesos fisiológicos importantes. La inhibición selectiva de una proteasa de serina dada es una de las estrategias para el tratamiento de condiciones

patológicas asociadas con la actividad o la hiperactividad de estas proteasas de serina. A continuación se muestra una lista no exhaustiva de los inhibidores de la proteasa de serina descritas en la literatura:

- inhibidores basados en fósforo tales como el diisopropilfosforilato (DFP) (Jansen et al, (1952) Adv Enzymol 13: 321 a 343) o de análogos de difenilo de éster de fosfonato;
- proteasas de serina, tales como cetonas de trifluorometil (TFMKs) que contiene flúor;
- aldehídos basados en péptidos, cetonas clorometilo, fluorometilo, cetonas sales de dimetil sulfonio, α -ceto-ácidos y amidas, ésteres de α -ceto y α -ceto-aldehídos (glioxales);
- productos naturales, tales como los cicloteonamidas, derivados de la esponja marina *Theonella sp* japonesa.
- moléculas en base a estructura heterocíclica;
- heterociclos y compuestos relacionados N-hidroxisuccinimida;
- isocumarinas tales como 3,4-dichloroisocoumarin;
- inhibidores basados en lactámicos β ;
- compuestos potenciados por el metal;
- Aprotinina (Trasylol®), que se utiliza para reducir el sangrado; y
- las serpinas (inhibidores de la proteasa de serina) como la antitrombina y α -1-antitripsina que tiene un papel en la coagulación/trombosis y enfisema/A1AT, respectivamente.

[0010] El documento WO 95/09634 divulga análogos peptídicos electrófilos como inhibidores de proteasa de serinas similares a la tripsina. Los compuestos son dipéptidos en el que un derivado electrofílico de un α -aminoácido se conjuga con un α -aminoácido disustituido N-N. Los conjugados de α -aminoácido N,N desustituidos del análogo de aminoácido electrófilo son derivados de un aminoácido en el que el grupo α -amino es alquilado y acilado o diacilado para dar sustituyentes alicíclicos o cíclicos.

[0011] El documento EP 0 293 881 da a conocer péptidos que comprenden derivados de ácido borónico C-terminal de lisina, ornitina y arginina, homoarginina y los correspondientes análogos de isotiouonio de los mismos, que se describen como inhibidores reversibles de las proteasa de serinas similares a la tripsina, tales como trombina, calicreína plasmática y plasmina.

[0012] US 5 814 622 se refiere a compuestos derivados de ácido borónico y a su uso como inhibidores de los inhibidores de proteasa de serinas similares a la tripsina de las proteasa de serinas. Se ha informado que los compuestos tienen diferentes e incrementados tiempos de coagulación y la actividad a través de la vía oral.

[0013] WO 2006/050999 se refiere a un método para reducir la grasa corporal de un sujeto por medio de un agente capaz de regular hacia abajo la regulación de la actividad y/o expresión de al menos uno de los componentes que participan en la digestión de proteínas y/o absorción. Los agentes propuestos son un oligonucleótido dirigido a una secuencia de ácido nucleico endógena que expresa al menos un componente que participan en dicha digestión de proteínas y/o absorción o un inhibidor de la proteasa dirigida a al menos un componente que participa en la digestión de proteínas y/o absorción.

[0014] Sin embargo, pocos compuestos han sido descritos como inhibidores de proteasa de serina con una inhibición específica y selectiva de un objetivo único. Por otra parte, ningún compuesto se ha descrito ni sugerido, para inhibir selectivamente y específicamente la enteropeptidasa, y para ser utilizado en el tratamiento de la obesidad, el exceso de peso o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa.

[0015] La enteropeptidasa es una proteasa de serina situada en la superficie de las células intestinales epiteliales (enterocitos) (Lancet 1969 19 de abril; 1 (7599): 812-3; Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003 Dec; 285 (6): G1235-41; Proc Soc Exp Biol Med 1994 Jun; 206 (2): 114-8; Ciba Found Symp. 1979 Jan 16-18; (70): 169-87; Lancet 1982 Aug 28; 2(8296):504). El sustrato de la enteropeptidasa es tripsinógeno, un precursor de la tripsina. Enteropeptidasa convierte tripsinógeno en una molécula de tripsina. A su vez, la tripsina, que también es una proteasa de serina, convierte los precursores de una serie de enzimas digestivas, tales como procarboxipeptidasas A y B, quimotripsinógeno, prolipasa de páncreas y pro-elastasa, en las formas activas de las enzimas (carboxipeptidasas A y B, quimotripsina, lipasa pancreática y de la elastasa). Se requieren las últimas formas activas de tales enzimas digestivas para el procesamiento y la absorción final de proteína y materia grasa en el tracto gastrointestinal (GI).

[0016] Debido a que la enteropeptidasa se encuentra en la luz intestinal, la inhibición de esta enzima requiere que los compuestos inhiben selectivamente enteropeptidasa sin interferir con que circulan las proteasas de serinas, tales como trombina y calicreína.

[0017] Por lo tanto, hay una necesidad de compuestos para tratar la obesidad, el exceso de sobrepeso, así como enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa, sobre una base a largo plazo que tiene un objetivo específico.

[0018] Es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos que inhiben la enteropeptidasa, y más en

particular que inhiben selectivamente enteropeptidasa. En particular, estos compuestos no son absorbibles, es decir, que no pasan desde el intestino a la sangre.

[0019] Es otro objeto de la presente invención proporcionar compuestos que son derivados de boroanalogos de aminoácidos que incorporan una funcionalidad protonable en su cadena lateral, tales como borolisina, boroornitina y boroarginina, y son inhibidores fuertes, no absorbibles de enteropeptidasa.

[0020] Aún otro objeto de la invención, son composiciones, especialmente composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos uno de los compuestos descritos en la presente invención.

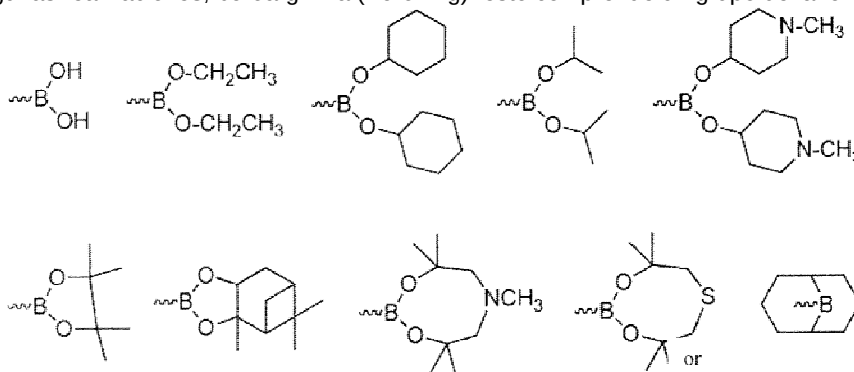
[0021] Aún otro objeto de la presente invención es el uso de al menos uno de los compuestos o de la composición según la invención, para el tratamiento de la obesidad, el exceso de peso y las enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa. Un compuesto o una composición de la invención para uso en el tratamiento de la obesidad, el exceso de peso y enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa, también se proporciona.

[0022] Estos y otros objetos se consiguen por la presente invención como se demuestra en el resumen de la invención, la descripción de las formas de realización preferidas y las reclamaciones.

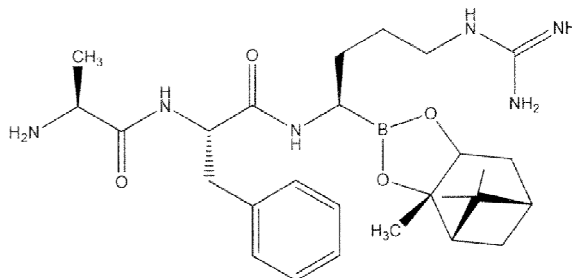
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0023] En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en Glu-Gly-Arg-Boro, Ala-Phe-Arg-Boro, Ac-Glu-Gly-Arg-Boro y Ac-Ala-Phe-Arg-Boro, donde Ac es acetilo.

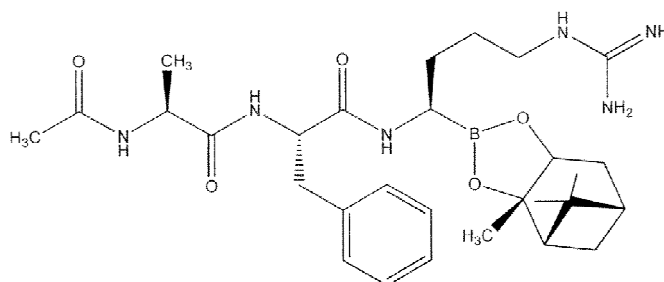
[0024] En algunas realizaciones, boroarginina (Boro-Arg) resto comprende un grupo de la fórmula:



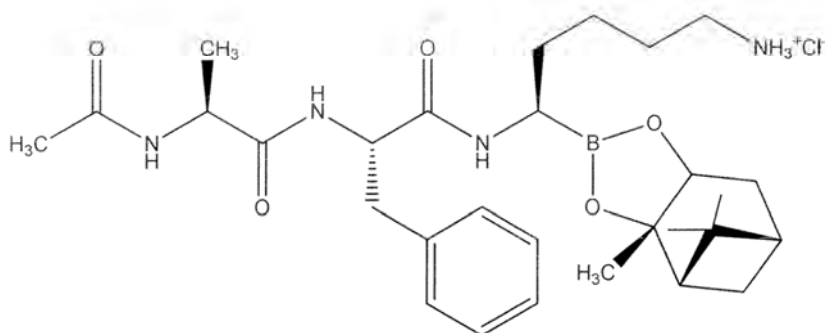
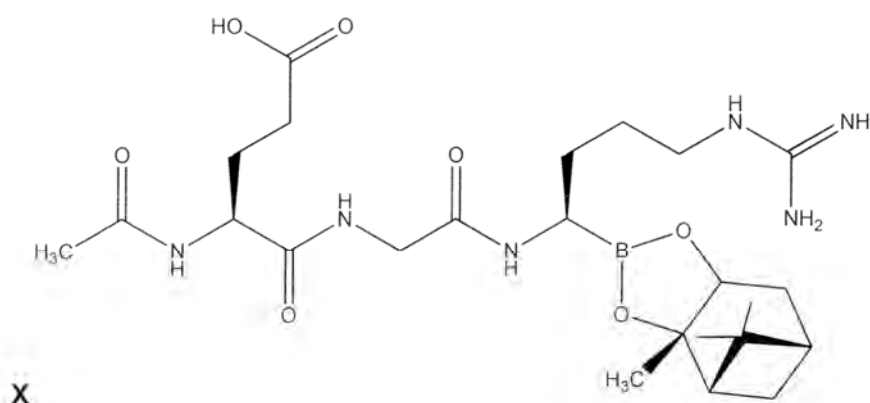
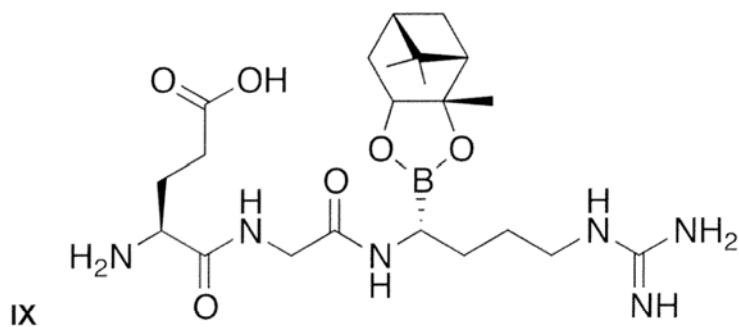
[0025] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



VII



VIII



[0026] Los compuestos de acuerdo con la presente invención inhiben la actividad enzimática de enteropeptidasa. Preferiblemente, estos compuestos inhiben selectivamente la actividad enzimática de la enteropeptidasa sobre otras proteasa de serinas. En alguna realización, los compuestos son no absorbible.

[0027] Los compuestos de la invención se pueden proporcionar en forma de base libre o como una sal farmacéuticamente aceptable.

[0028] En otro aspecto, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se describe anteriormente, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0029] En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la presente invención, o una composición que comprende dicho compuesto, para uso en el tratamiento de la obesidad en un mamífero, preferiblemente un ser humano.

[0030] En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la presente invención, o una composición que comprende dicho compuesto, para uso en el tratamiento del exceso de peso en un mamífero, preferiblemente un ser humano.

[0031] En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la presente invención, o una composición que comprende dicho compuesto, para su uso en el tratamiento, en un mamífero, preferiblemente un ser humano, de las enfermedades asociadas con el metabolismo anormal de la grasa, en el que dicha enfermedad

metabolismo de la grasa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en enfermedad gota, diabetes tipo II, la hiperglucemia, hiperinsulinemia, niveles elevados en sangre de ácidos grasos o glicerol, síndrome X, complicaciones diabéticas, síndrome dismetabólico y enfermedades relacionadas, la hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión, pancreatitis, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, accidente cerebrovascular, enfermedades coronarias del corazón, enfermedades vasculares periféricas, enfermedades arteriales periféricas, síndromes vasculares, trastornos relacionados con el colesterol y la lipodistrofia inducida por el fármaco.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0032]

Fig 1 es un gráfico que muestra la actividad de la enteropeptidasa de acuerdo con concentraciones crecientes de compuesto OBE 1999.

Fig 2 es un gráfico que muestra la actividad de la enteropeptidasa de acuerdo con concentraciones crecientes de compuesto OBE 2000.

Fig 3 es un gráfico que muestra la actividad de la enteropeptidasa de acuerdo con concentraciones crecientes de compuesto OBE 2001.

Fig 4 es un gráfico que muestra la actividad de la enteropeptidasa de acuerdo con concentraciones crecientes de compuesto OBE 2002.

Fig 5 es una tabla que muestra la IC₅₀ (en nM) de enteropeptidasa, diversas proteasas de serina y otras familias de enzimas, en presencia de compuestos OBE 1999, OBE 2000, OBE 2001 o OBE 2002.

Fig 6 son las secuencias de nucleótidos y de proteínas de la enteropeptidasa humana (PRSS7). La primera línea indica la secuencia de nucleótidos, agrupados por codones; la segunda línea indica la secuencia de aminoácidos que corresponde a los codones anteriores con el código de tres letras. El primer codón de traducción y el codón de parada están en negrita. Numeración del ácido nucleico está en el extremo derecho de la primera línea, y la numeración de los aminoácidos se indica bajo residuo de aminoácido (tercera línea).

Fig 7 representa ejemplos de procesos para sintetizar los compuestos de la invención. **(A)**: ejemplo de un procedimiento para la síntesis de la Acetil-Ala-Phe-BoroLisina (*pin: Grupo pinandiol); **(B y Cv)**: primer ejemplo de un procedimiento para la síntesis de la Acetil-Ala-Phe-Boroarginina; **(D)**: segundo ejemplo de un proceso para la síntesis de la Acetil-Ala-Phe-Boroarginina; este segundo proceso también permite la síntesis de la Acetil-Ala-Phe-BoroOrnitina (compuesto 8), ya que Acetil-Ala-Phe-BoroOrnithina es un compuesto intermedio en la síntesis de acetil-Ala-Phe-Boroarginina por este proceso; **(E)**: la síntesis del grupo Acetil-Ala-Phe-OH, que se inserta en el paso 10 del proceso en la figura 7C o en el paso 7 del proceso en la figura 7D.

Fig 8 es un gráfico que ilustra el seguimiento en día del peso (en gramos) de los ratones que han recibido agua (vehículo) en comparación con los ratones que han recibido OBE2001 a una concentración de 40 mg/kg/día (B).

Fig 9 es un gráfico que ilustra el seguimiento en minutos de los triglicéridos presentes en el plasma de ratones que tienen agua recibida (disolvente), una dosis de OBE2001 (OBE 25 mg/kg) o dos dosis de OBE2001 (OBE 25 + 25 mg/kg).

Fig 10 es un gráfico que ilustra el seguimiento de las horas de las proteínas marcadas en el plasma de ratones que tienen agua recibida (disolvente), una dosis de OBE2001 (OBE 5 mg/kg) o dos dosis de OBE2001 (OBE 50 mg/kg).

Fig 11 es una representación esquemática del proceso utilizado para obtener un alelo constitutiva knockout enteropeptidasa (KO) en ratones, usando la delección de los exones 23-28 del gen Prss7.

Fig 12 es una representación esquemática de un vector que comprende el alelo de knockout de enteropeptidasa constitutiva (KO), así como la secuencia de nucleótidos 17480 pb de este vector.

Fig 13 es el mapa de restricción AflIII del alelo de enteropeptidasa de tipo silvestre (arriba) y el knockout (KO) alelo enteropeptidasa (abajo).

Fig 14 es una Southern Blot con ADN genómico obtenido a partir de células madre embrionarias (ES) exitosamente transformadas con la enteropeptidasa KO alelo (A-D2 y A-E8) y se obtuvo con el ADN genómico de las células transformadas no (WT).

Fig 15 es una blot en la que los fragmentos de PCR se han ejecutado, a partir de una amplificación simultánea con cebadores 1260_1 y 1260_2, y 1472_23 y 1472_24. El ADN genómico se ha extraído de ratones heterólogos (115695, 115702, 115706, 115707 y 115708) o ratones de tipo silvestre (115696 o 115705). 585bp (c): fragmentos de control; 412 pb (conv): alelo KO.

Fig 16 es una mancha en la que los fragmentos de PCR, obtenidos a partir de una amplificación simultánea con el cebador 1472_23 y el cebador PRRS7 WT, y cebadores actina beta hacia adelante y beta actina hacia atrás, se han ejecutado. El ADN genómico se ha extraído de ratones heterólogos (115755 y 115648) o cachorros KO homólogos (1A, 2A, 3A, 4A y 5A); 533bp (c): WT alelo de enteropeptidasa; 300 pb: alelo de control (actina).

Fig 17 es una fotografía que muestra un ratón homocigoto para el alelo de enteropeptidasa KO (Ho) y un ratón heterocigoto para el alelo de enteropeptidasa KO (He), ambos de 7 días de edad.

Fig 18 es la secuencia de nucleótidos y proteínas de tripsina humana

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

[0033] La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de ácido o una sal básica que es adecuada o compatible con el tratamiento de la materia.

[0034] Por "inhibición de la actividad de la enteropeptidasa", se entiende que se obtiene una disminución del 50% de la actividad in vitro de la enteropeptidasa, con una concentración del compuesto de la invención que es de menos de 10 μ M, menos de 1 μ M, a menos de 100 nM, menos de 10 nM o menos de 1 nM, para 1 nM de enteropeptidasa. Dicha concentración se puede determinar cómo se describe en detalle en el punto 2.1. a continuación, y en particular el uso de Np tosilo Gly Pro Arg pNa como sustrato.

[0035] La expresión "inhibición específica de la proteasa de tipo tripsina serina" se refiere a la inhibición de las proteasas de la familia de proteasa de serina y más particularmente a proteasa de serina de sólo el subtipo de tipo tripsina. Por el contrario, la actividad de otras proteasas tales como peptidasas de cisteína, peptidasas aspartato, metalo-proteasas, lipasas y/o glucosidasas no se alteran por el compuesto de la invención. En otra forma de realización, en combinación con la anterior, la actividad de proteasa de serinas de tipo quimotripsina no se altera por el compuesto de la invención.

[0036] La expresión "inhibición selectiva de la enteropeptidasa" se refiere a la inhibición de la enteropeptidasa solamente (in vivo), mientras que la actividad de otras proteasas de la misma subtipo (subtipo de tipo tripsina) no resultan modificadas por los compuestos de la invención. Esta distinción entre la especificidad y la selectividad se ha hecho posible por el hecho de que los compuestos de la invención son no absorbibles y por lo tanto la inhibición se limita a la enteropeptidasa cuya ubicación es intestinal.

[0037] La determinación de la IC50 de los compuestos de la invención sobre enteropeptidasa o en otra proteasa de serina se puede ensayar in vitro como se describe en los ejemplos a continuación.

[0038] El término "tratamiento" tal como se utiliza aquí, se refiere no sólo a la pérdida de peso del mamífero después de la administración de al menos un compuesto o la composición de la invención, sino también para el mantenimiento del peso tal que hay un aumento de peso.

[0039] El término "mamífero" abarca cualquiera de los diversos animales de sangre caliente de vertebrados de la clase de los mamíferos, incluidos los humanos, caracterizados por una cubierta de pelo en la piel y, en las mujeres, las glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a las crías.

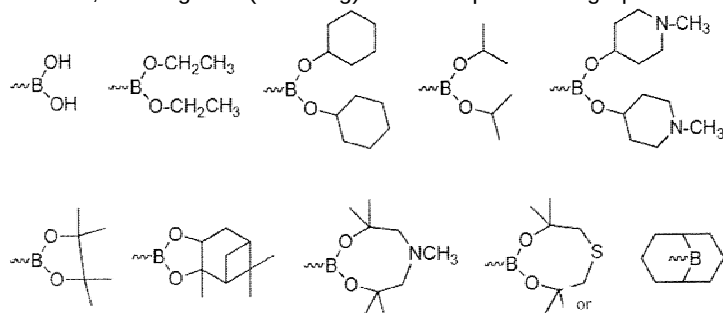
[0040] "Farmacéuticamente vehículos o portadores aceptables" abarca cualquier sustancia que permite la formulación de los compuestos de la invención dentro de una composición. Un vehículo es cualquier sustancia o combinación de sustancias fisiológica lógicamente aceptable es decir, apropiado para su uso en una composición en contacto con un mamífero, y por lo tanto no tóxico. Ejemplos de tales vehículos son soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua y diversos tipos de soluciones estériles de agentes humectantes.

[0041] "Obesidad", en general, se define en humano por lo menos 20% en el peso medio para la edad de la persona, el sexo y altura. La obesidad se define por un índice de masa corporal (IMC = kg/m²) superior a 30. La obesidad también puede definirse por la circunferencia de la cintura absoluta (> 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres) o la relación cintura-cadera (WHR-) (RHO más de 0,7 para las mujeres y más de 0,9 para los hombres). "El exceso de peso" se define por un índice de masa corporal que está comprendida entre 25 y 29,9.

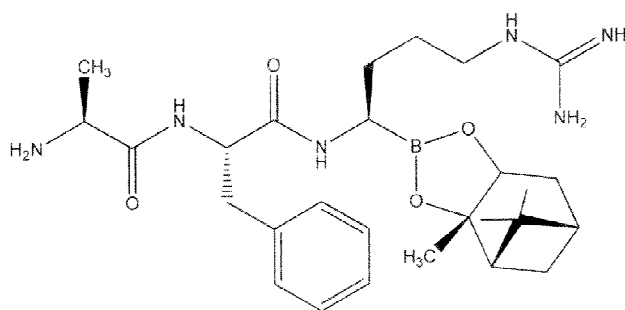
[0042] Más específicamente, en una primera realización, la presente invención se refiere a compuestos que tienen una actividad inhibidora sobre la actividad enzimática de enteropeptidasa. En otro aspecto, se proporcionan los compuestos siempre que tengan una actividad inhibidora selectiva de la actividad enzimática de enteropeptidasa.

[0043] Los compuestos de la invención se seleccionan del grupo que consiste en Glu-Gly-Arg-Boro, Ala-Phe-Boro-Arg, Ac-Glu-Gly- Boro-Arg y Ac-Ala-Phe- Boro-Arg, en el que Ac es acetilo.

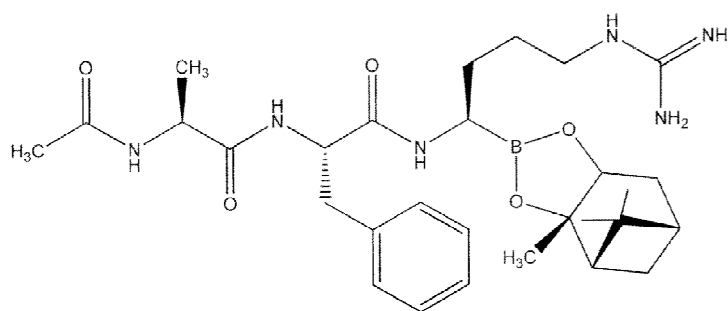
[0044] En algunas realizaciones, boroArginina (Boro-Arg) resto comprende un grupo de la fórmula:



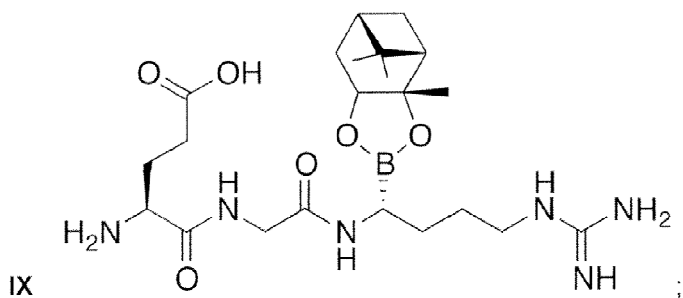
[0045] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



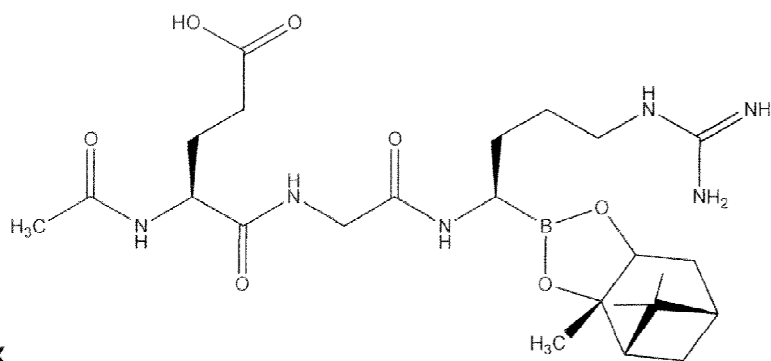
VII



VIII

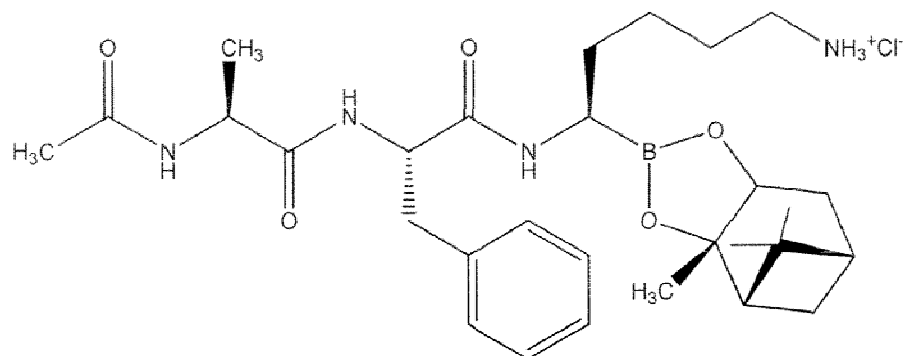


IX



X

y



[0046] Todos los compuestos de la invención descritos en la presente solicitud están bajo una forma de base libre o son sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0047] Los compuestos de la invención no son por lo menos uno de los siguientes:

- Ac-(D,L)Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA (ácido sulfónico de benzeno), Ac-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl, H-(D)Phe-Pro-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr.HCl, Boc-(D)Phe-Pro-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Ac-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Ac-Ala-Lys (Boc)-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Lys (Boc)-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-(D)Phe-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, H-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl, Boc-(D)Phe-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-(D)Phe-Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Lys (Boc)-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl, Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-OH.HCl, Boc-Leu-Gly-Leu-Ala-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-Leu-Gly-Leu-Ala-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-Leu-Gly-Leu-Ala-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Pro-Phe-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-Ala-Phe (D, L) borolrg-C₁₀H₁₂.HBr, Bz-Glu (OBu) Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Bz-Glu-Gly-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Glu(OBu)Gly-boroOrg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Glu (OBu) Gly-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Bz-Pro-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Z-Phe-Gly-Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, Boc-Ala-Phe (D, L) borohomolrg-C₁₀H₁₂.HBr, Bz-Pro-Phe-boroArg-OH.HCl, Bz-Pro-Phe-boroArg-F, H-(D)Phe-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.2HCl, H-(D)Phe-Phe-boroArg-C₁₀H₁₆.2HCl, Ac-Ala-Lys-boroArg-C₁₀H₁₆.2HCl, H-Leu-Gly-Leu-Ala-boroArg-C₁₀H₁₆.HCl.bsa, Boc-Ala-Phe(D,L)boroLys-C₁₀H₁₂.HCl, H-Ala-Phe- (D, L) boroLys-C₁₀H₁₂.2HCl, Boc-(D) Val-Leu-boroLys C₁₀H₁₂.HCl, Ac-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.HCl, Bz-Glu-Gly-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, H- (D)Phe-Phe-borolrg-C₁₀H₁₆.2HBr, H-Leu-Gly-Leu-Ala-borolrg - C₁₀H₁₆.2HBr, H-Ala-Phe- (D, L) borolrg-C₁₀H₁₂.2HBr, Bz-Glu-Gly-borolrg-C₁₀H₁₆.HBr, H-Ala-Phe- (D, L) boroHomolrg-C₁₀H₁₂.2HBr, Ac-Ala-Lys-borolrg-C₁₀H₁₆.2HBr, Bz-borolrg-C₁₀H₁₂.HBr, Bz-boroOrn-C₁₀H₁₂.BSA, Bz-boroArg-C₁₀H₁₂.BSA, Ac-Leu-Thr (OBu)-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Leu Thr (OBu) boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Leu-Thr-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Lys (Boc) -Pro-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Lys (Boc) -Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Lys-Pro-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Glu (OBu)-boroOrn-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Glu (OBu)-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Ac-Ala-Glu-boroArg-C₁₀H₁₆.BSA, Boc-Val-Val-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA, H- Val-Glu-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA.TFA, Boc-(D)Phe-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA, H-(D)Phe-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA.TFA, Boc-Glu-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA y piroGlu-Phe-boroLys-C₁₀H₁₂.BSA, se describe en US 5.187.157;
- Ac-boroArg-OH.HCl, da a conocer en Lebarbier et al.; letras (1998) Biorganic y Medicinal Química 8: 2573-2576;
- Ac-(D)Phe-Pro-boroArg-OH, se describe en la Quan et al. ; (1997) letras Biorganic y Medicinal Química 7 (13): 1595-1600;
- Ac-Ala-Lys-boroArg-OH₂, descrito en Holyoak et al. (2003); Bioquímica 42: 6709-6718.
- Pro-Phe-OH-boroArg, da a conocer en Stadnicki et al. (1998); El FASEB Journal 12: 325-333.
- Bz-Nle-Lys-Lys-boroArg-OH₂, da a conocer en Yien et al. (2006); Biorganic letras y Medicinal Chemistry 16:36-39.
- H-Phe-Pro-boroArg, descrito en Kettner et al. (1990); El Journal of Biological Chemistry 265 (30): 18289-18297.
- Pinanodiol Ac-Arg-Glu-Lys-boroArg, descrito en Komiyama et al. (2005); Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia 49 (9): 3875 a 3882.
- (BOC) Ala-Val-Lys-boronato, descrito en Katz et al. (1995); Biochemistry 34: 8264-8280.

[0048] Las moléculas de la invención se sintetizan usando procedimientos bien conocidos. A modo de ejemplo, la figura 7 da a conocer diversos procedimientos para sintetizar cualquier compuesto de la presente invención. Los ejemplos descritos se refieren a la síntesis de un tripéptido borolisina (7A), un tripéptido de bororarginina y un tripéptido de boroornitina (7B a 7E). Estos ejemplos pueden aplicarse fácilmente a la síntesis de otros compuestos descritos en el presente documento. Especialmente, la persona experta en la técnica puede sustituir a la naturaleza y el número de residuos de aminoácidos para ligarse a la boroArginina, borolisina o resto de boroornitina.

[0049] Además de su característica estructural, los compuestos de la invención tienen la capacidad de inhibir específicamente la actividad de las proteasas de serina y especialmente la actividad de proteasas de serina subtipo de tipo tripsina. En otra realización, los compuestos de la invención, y especialmente el tri o tetraboropeptidos, tienen la capacidad de inhibir selectivamente la actividad de enteropeptidasa, enteropeptidasas especialmente de mamífero, y más especialmente enteropeptidasa de humanos. La secuencia de la enteropeptidasa humana se divulga en la figura 6.

[0050] También se proporciona una composición que comprende uno o más de un compuesto de la invención, en especial 2, 3 o 4 compuestos.

[0051] Tal composición puede tomar la forma de una composición farmacéutica que se puede formular utilizando portadores farmacéuticamente cética aceptables bien conocidos en la técnica, en dosis adecuadas.

[0052] En una realización particular, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente adecuado o portador y/o vehículo, cuando se utiliza para la administración enteral o oral.

[0053] Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones.

[0054] Preparaciones farmacológicas para el uso oral se pueden hacer usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, maíz, trigo, arroz o almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil lulosa bración, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; polímeros y/o fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como pirrolidona de polivinilo reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

[0055] Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, las soluciones de azúcar concentradas pueden usarse, que pueden contener opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

[0056] Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

[0057] Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

[0058] Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden también contener portadores farmacéuticamente adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Para más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington Pharmaceutical Sciences (Maack Pubiishing Co., Easton, Pa.).

[0059] Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en combinación con al menos otro fármaco, para conseguir efectos mejorados, por ejemplo, con otros fármacos que se dirigen las enzimas diferentes de la enteropeptidasa. Como ejemplo, los compuestos de la invención se pueden combinar con el fármaco capaz de inhibir la adsorción o el metabolismo de los triglicéridos.

[0060] La presente invención se refiere al uso de cualquier compuesto como se define anteriormente, para el tratamiento de la obesidad, el exceso de peso y enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa. Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden usar en el tratamiento de la obesidad, el exceso de peso y/o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa, así como para la fabricación de un medicamento para tratar la obesidad, el exceso de peso y/o enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de la grasa.

[0061] se proporciona un método para tratar un mamífero que tiene obesidad, exceso de peso y/o que sufren de enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa, que comprende la administración de al menos un compuesto o una composición de la invención a un mamífero en necesidad del mismo.

[0062] Cualquier compuesto de la invención se puede utilizar para disminuir la absorción in vivo de las proteínas. En otra realización, cualquier compuesto de la invención puede utilizarse para disminuir la absorción in vivo de los triglicéridos. En una realización adicional, cualquier compuesto de la invención puede utilizarse para disminuir la absorción in vivo de las proteínas y la absorción in vivo de los triglicéridos.

[0063] En un aspecto adicional, independientemente o en combinación con el uso de los compuestos de la invención en la disminución de absorción, cualquier compuesto de la invención se pueden usar para disminuir la ingesta de alimentos, es decir; para disminuir el apetito (bloqueador de apetito).

[0064] El compuesto o la composición de la invención se puede usar en dosis que van de 10 mg a 10 g por día, o de 100 mg a 1 g por día, una o varias veces al día. La cantidad de compuesto o de la composición de la presente invención se puede administrar en dosis de acuerdo con la gravedad de la obesidad, la cantidad de exceso de peso, la edad del mamífero y/o la salud general del mamífero.

[0065] Los compuestos o composiciones de la invención son adecuados para el tratamiento de diversas formas de obesidad y, en particular la obesidad resultante de causas ambientales (ingesta excesiva de nutrientes y/o un estilo de vida sedentario), como resultado de alteraciones genéticas (tales como gen FTO), resultando de una enfermedad médica (tales como hipotiroidismo, síndrome de Cushing, deficiencia de la hormona del crecimiento), como resultado de dejar de fumar, como resultado de medicamentos (como esteroides, antipsicóticos atípicos o alguna medicación para la fertilidad), y como resultado de trastornos neurológicos.

[0066] También se contempla el tratamiento por al menos uno de los compuestos o por las composiciones de la invención de enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de grasa. Tales enfermedades son las siguientes: la enfermedad de gota (artritis metabólica), diabetes tipo II, la hiperglucemia, hiperinsulinemia, niveles elevados en sangre de ácidos grasos o glicerol, síndrome X, complicaciones diabéticas, síndrome dismetabólico y enfermedades relacionadas, la hipercolesterolemia, la aterosclerosis, la hipertensión, pancreatitis creatitis, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, accidente cerebrovascular, enfermedades coronarias del corazón, enfermedades vasculares periféricas, enfermedades arteriales periféricas, síndromes vasculares, trastornos relacionados con el colesterol (por ejemplo, LDL-patrón B y LDL-patrón L) y la lipodistrofia inducida por fármacos.

[0067] También se proporciona un modelo animal en el que el gen de enteropeptidasa ha sido inactivado. Este modelo comprende un modelo de mamífero (no humano) o un modelo murino (por ejemplo, un ratón). Por "inactivado", se quiere decir que un gen de enteropeptidasa incorporado de este modelo codifica una proteína que tiene actividad de enteropeptidasa menos de 50% en comparación con la enteropeptidasa de tipo silvestre. En una realización, la enteropeptidasa inactivada tiene menos de 40% de actividad de enteropeptidasa en comparación con la enteropeptidasa de tipo silvestre. En otra realización, la enteropeptidasa del modelo animal con menos de 30% de actividad de enteropeptidasa en comparación con la enteropeptidasa de tipo silvestre. En aún otra realización, la enteropeptidasa del modelo animal con menos de 20% o menos de 10% de actividad de enteropeptidasa en comparación con la enteropeptidasa de tipo silvestre. En aún otra realización, la enteropeptidasa inactivada no tiene actividad peptidasa en absoluto. En otro aspecto, el porcentaje de actividad de enteropeptidasa se define de acuerdo a la conversión de tripsinógeno en tripsina.

[0068] El modelo de animal que tiene un gen de enteropeptidasa inactivado se puede obtener por cualquiera de las técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica para obtener un modelo animal knockout (KO), tal como mediante la inserción de una o más sustituciones de aminoácido que afecta la actividad peptidasa de la enteropeptidasa o mediante la supresión de uno o varios exones del gen de enteropeptidasa. Cuando el modelo animal es un roedor, tal como un ratón, las mutaciones pueden ser, por ejemplo, una delección de los exones 23-28 del gen prss7 es decir, el homólogo murino de enteropeptidasa humana.

[0069] También se proporciona el uso de este modelo animal en el desarrollo de fármacos, por ejemplo, en la selección de fármacos o moléculas que tienen efectos sobre el peso. Por lo tanto, el modelo se puede utilizar en un proceso para determinar el efecto de un fármaco o una molécula en el peso que comprende (a) la administración de un fármaco para el modelo y (b) medir el peso del animal. El efecto de la droga se determina comparando el peso del animal administrado con dicho fármaco con los animales de control (que se administran con moléculas conocidas o con un placebo).

[0070] La expresión "efecto sobre el peso" significa que el fármaco o la molécula es capaz de aumentar el peso del modelo animal en comparación con un placebo, o, por el contrario, para disminuir el peso del modelo animal en comparación con un placebo. El efecto de la molécula se puede observar bajo un régimen calórico bajo, normal o alto.

[0071] La administración del medicamento o la molécula para el modelo animal puede llevarse a cabo por vía oral por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o mediante sistemas de liberación sostenida.

EJEMPLOS

A. Los experimentos in vitro**1. Materiales****1.1. Amortiguación:****[0072]**

- **TN:** Tris 50 mM pH = 7,5 NaCl 150 mM (Tris: Euromedex Ref 26-128-3097; NaCl: Euromedex Ref 1112);
- **TCN:** Tris 50 mM pH = 7,5 NaCl 150 mM CaCl₂ 10 mM;
- **TCNB:** Tris 50 mM pH = 7,5 NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,05% de Brij 35 (Brij: sigma Ref B4184);
- Tris 25 mM pH 8;
- **Amortiguación pancreática de lipasa:** 25 mM Tris pH 9,2 - 0,1 mM CaCl₂ - 20 mM sodio;
- Desoxicolato;
- Termolisina (Sigma, ref T7902);
- Sal disódica de fosforamidón (Sigma, ref R7385);
- Ácido acético (Sigma ref A0808)

1.2. Placas**[0073]**

- Microplacas 384 pequeño volumen, clara (Greiner, ref 784101)
- Microplacas 384 negro de fondo plano (Corning, ref 3573)
- Placa 96 Nunc negro (VWR, ref 13.634,01)
- Placa 96 - 1/2 área (Corning, Ref 3695)
- Microplacas de 96 pocillos 800 µl unifiltro (Whatman, Ref 7700-1804)

1.3. Compuestos**[0074]** La Tabla I siguiente enumera cuatro compuestos de la invención (triboropectides) y sus nombres.**Tabla I**

Nombre	Compuesto/composición	Protección
Obe 1999	Ala-Phe-BoroArg 10 mM DMSO	No
Obe 2000	Glu-Gly-BoroArg 10 mM DMSO	No
Obe 2001	Acetilo-Ala-Phe-BoroArg 10 mM DMSO	Si (acetilo en el primer Ala)
Obe 2002	Acetilo-Glu-Gly-BoroArg 10 mM DMSO	Si (acetilo en el primer Glu)

1.4. Enzimas:**[0075]** La Tabla II siguiente muestra las enzimas ensayadas para la inhibición por los compuestos de la invención, así como los proveedores y las referencias comerciales asociadas.**Tabla II**

Enzima	Proveedor, referencia
Enteropeptidasa humana recombinante	Sistema de RD, ref 1585SE
Tripsina de páncreas humano	SIGMA, ref T6424
Trombina de plasma humano	SIGMA, ref T1063
Caliceína del plasma humano	SIGMA, ref K2638
Plasmina de plasma humano	SIGMA, ref P1867
Elastasa	Calbiochem, ref 324682
Quimotripsina	Sigma, C8946 ref
DPP-IV (peptidasa de dipeptidil IV)	Sistema de RD, ref 1180-SE
Carboxipeptidasa recombinante humana A1	Sistema de RD, ref 2856-ZN
Carboxipeptidasa recombinante humana B1	Sistema de RD, ref 2897-ZN
Amilasa alfa de páncreas humano	Sigma, ref A9972
Lipasa	Sigma, ref L0382

1.5. Sustratos:

[0076] La Tabla III a continuación enumera los sustratos usados para el ensayo de la inhibición de las enzimas anteriores por los compuestos de la invención, así como los proveedores y las referencias comerciales asociadas.

Tabla III

Sustrato	Proveedor, referencia	Enzima correspondiente
N-p-Tosil-Gly-Pro-Arg-pNA	SIGMA, ref T1637	Enteropeptidasa, tripsina y trombina
H-D-Pro-Phe-Arg-pNA	Chromogenix, ref S-2302	Calicreína
D-Ile-Phe-Lys-pNa	SIGMA, ref I6886	Plasmina
N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Sigma, ref S7388	Quimotripsina
Suc-Ala-Ala-Pro-Abu-pNA	Calbiochem, ref 324699	Elastasa
Ala-Pro-7-amido-4-trifluorometilcumarina	Calbiochem, ref 125510	DPPIV
N-(4-Metoxifenilazoformilo)Phe-OH sal de potasio	Bachem, ref M2245	Carboxipeptidasa A1
N-(4-Metoxifenilazoformilo)-Arg-OH HCl	Bachem, ref M2525	Carboxipeptidasa B1
6,8-difluoro-metilumbeliferil octanoato (DIFMu)	InVitrogen, ref D12200	Lipasa
Almidón Azul	Sigma, ref S7629	Alfa-amilasa

2. Protocolos**2.1. Ensayo de enteropeptidasa****- Activación de la enteropeptidasa**

[0077] Una mezcla de enteropeptidasa en 58.8nM (final) y termolisina en 1,58 ng/l (final) en tampón TCN se preparó; la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos para la activación. Se añadió fosforamidón (10 µM final) para detener la activación por termolisina.

- Medición de la actividad de enteropeptidasa sin inhibidor (control positivo)

[0078] En 17 µl de TCN, 1 µl de enzima activa (2,9 nm final) y 2 µl Np Tosyl Gly Pro Arg pNA (1 mM final) se mezclaron, justo antes de la lectura. La absorbancia se midió a 405 nm en EnVision (Perkin Elmer).

- Inhibición de placa de 384 pocillos pequeño volumen (20 µl final)

[0079] En 15 µl de TCN, 1 µl de enzima activa y 2 µl de inhibidor (compuesto de la invención) a diferentes concentraciones se mezclaron, y se incubaron a RT (temperatura ambiente) durante 30 minutos; Se añadió 2 µl Np Tosyl Gly Pro Arg PNA (1 mM final) justo antes de la lectura. La absorbancia se midió a 405 nm en EnVision (Perkin Elmer).

2.2. Trombina, tripsina, calicreína, plasmina, quimotripsina y ensayo de elastasa

[0080] La Tabla IV siguiente muestra las concentraciones finales de las enzimas ensayadas y los correspondientes sustratos, en la determinación de la IC50 sin inhibidor (control positivo) y en los protocolos de inhibición:

Tabla IV

Enzima	Sustrato
Tripsina 10 nM	N-p-tosil-Gly-Pro-Arg-pNA 1 mM
Trombina 10 nM	N-p-tosil-Gly-Pro-Arg-PNA 0,75 mM
Plasmina 50 nM	D-Ile-Phe-Lys-pNa 1 mM
Calicreína 10 nM	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA 1 mM
Quimotripsina 50 nM	N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 0,5 mM
Elastasa 25 nM	Suc-Ala-Ala-Pro-Abu-pNA 0,5 mM

Medición sin inhibidor (control positivo)

[0081] En 17 µl de TN, 1 ml de enzima y 2 µl de sustrato se mezcló, justo antes de la lectura; La absorbancia se midió a 405 nm en EnVision (Perkin Elmer).

- Inhibición de placa de 384 pocillos pequeño volumen (20 µl final)

[0082] En 15 µl de TN, 1 ml de enzima y 2 µl de inhibidor (compuesto de la invención) a diferentes concentraciones se mezclaron y se incubaron a RT durante 30 minutos; Se añadió 2 µl de sustrato, justo antes de la lectura; La absorbancia se midió a 405 nm en EnVision (Perkin Elmer).

2.3 Ensayo de carboxipeptidasa A1 y B1- Activación de la carboxipeptidasa A1

[0083] En 20 µl de TCNB, carboxipeptidasa A1 (100 µg/ml final) y tripsina (1 µg/ml final) se mezclaron y se incubaron a RT durante 2 horas.

- Activación de la carboxipeptidasa B1

[0084] En 20 µl de TCNB, carboxipeptidasa B1 (100 µg/ml final) y tripsina (1 µg/ml final) se mezclaron y se incubaron a RT durante 1 hora.

[0085] La Tabla V a continuación se enumeran las concentraciones finales de las enzimas ensayadas y el sustrato correspondiente, en la determinación de la IC₅₀ sin inhibidor (control positivo) y en los protocolos de inhibición:

Tabla V

Enzima	Sustrato
Carboxipeptidasa A1, 20 nM	N-(4 - Matoxifenilazoformilo)-Phe-OH, sal de potasio 100 µM
Carboxipeptidasa B1, 20 nM	N-(4 - Matoxifenilazoformilo)-Arg-OH, HCl 100 µM

- Medición sin inhibidor (control positivo)

[0086] En 17 µl de TN, 1 µl de enzima activada y 2 µl sustrato se mezclaron, justo antes de la lectura; La absorbancia se midió a 355 nm en EnVision (Perkin Elmer).

- Inhibición de placa de 384 pocillos pequeño volumen (20 µl final)

[0087] En 15 µl de TN, 1 µl de enzima activada y 2 µl de inhibidor (compuestos de la invención) a diferentes concentraciones, se mezclaron y se incubaron a TA durante 30 minutos; Se añadió 2 µl de sustrato, justo antes de la lectura; La absorbancia se midió a 355 nm en EnVision (Perkin Elmer).

2.4. Ensayo de DPPIV- Medición sin inhibidor (control positivo)

[0088] En 17 µl de Tris 25 mM pH 8, 1 µl de enzima (1 nM final) y 2 µl de sustrato (Ala-Pro-7-amido-4-trifluorometilcoumarina, a 100 µM final) se mezclaron, justo antes de la lectura. La absorbancia se midió en EnVision (Perkin Elmer) (Excitación 400 nm/emisión 505 nm).

- Inhibición de 384 pocillos negro placa (20 µl final)

[0089] En 15 µl de Tris 25 mM pH 8, 1 µl de enzima (1 nM final) y 2 µl de inhibidor (compuestos de la invención) a diferentes concentraciones se mezclaron, y se incubaron a TA durante 30 minutos. Se añadió 2 µl de sustrato (omethylcoumarin Ala-Pro-7-amido-4-trifluor-, a 100 mM final), justo antes de la lectura. La absorbancia se midió en EnVision (Perkin Elmer) (excitación 400 nm/emisión 505 nm).

2.5. Ensayo de amilasa pancreática- Medición sin inhibidor (control positivo)

[0090] En 50 µl, 5 ml de amilasa (a una concentración de partida de 0,25 mg/ml) y 45 µl de almidón Azur (a una concentración de partida de 2% en NaH₂PO₄ 20 mM/50 mM Na Cl pH 7) se mezclaron y se incubaron 1 h a 37°C con agitación. 20 µl solución de ácido acético (concentración inicial de 2,75 M) se añadió, y la suspensión se filtró.

La absorbancia se midió en microplacas de 96 pocillos Whatman UNIFILTER a 595 nm.

- Inhibición de placa negra de 96 pocillos

5 **[0091]** En 35.5 µl de tampón (NaH₂PO₄/NaCl 50 mM pH 7 a 37°C), 5 µl de amilasa (0,25 mg/ml) y 5 µl de inhibidor (compuestos de la invención) a diferentes concentraciones, se mezclaron y se incubaron 30 minutos a RT. 4,5 µl de sustrato (almidón Azur 20% en tampón) se añadieron y se incubaron 1 hora a 37°C con agitación. Después, se añadieron 20 µl de solución de ácido acético (2,75 M) y la suspensión se filtró en una microplaca de 96 pocillos UNIFILTER Whatman. Se leyó la absorbancia a 595 nm en EnVision (PerkinElmer).

10 **2.6. Ensayo de lipasa**

- Medición sin inhibidor (control positivo)

15 **[0092]** En 85 µl de tampón de lipasa, 5 µl de lipasa (56 U/ml final) y 10 µl de sustrato (DiFMu en 10 mM final) se mezclaron, justo antes de la lectura. La fluorescencia se midió en EnVision (Perkin Elmer) (excitación 358 nm/emisión 452nm).

- Inhibición de 96 pocillos negro placa (20 µl final)

20 **[0093]** En 80 µl de tampón de lipasa, 5 µl de lipasa (56 U/ml final) y 5 µl de inhibidor (compuestos de la invención) a diferentes concentraciones, se mezclaron y se incubaron a RT durante 30 minutos. Añadir 10 µl de sustrato (DiFMu a 10 µM final) justo antes de la lectura. La fluorescencia se midió en EnVision (Perkin Elmer) (excitación 358 nm/emisión 452nm).

25 **3. Resultados**

30 **[0094]** Como se muestra en las figuras 1 a 4, los 4 compuestos (OBE1999 a OBE2000), pertenecientes a la familia boropéptido, son particularmente eficaces in vitro contra enteropeptidasa e inhiben la actividad de enteropeptidasa, la máxima inhibición IC₅₀ constante, a una nanomolar intervalo de 7 a 63 nM. Además, estos cuatro compuestos son específicos de las proteasas de serina, de tipo sub similar a la tripsina, y en contraste no inhiben las proteasas de serina de tipo quimotripsina, metalo-proteasas o glucosidasas (Figura 5).

35 **[0095]** Más específicamente, OBE1999 es un muy buen inhibidor de enteropeptidasa (IC₅₀ de 33 nM). Sin embargo, también inhibe con una buena IC₅₀ (7,5 a 29,8 nM) otras enzimas tales como la tripsina, la calicreína y la plasmina. Desde la enteropeptidasa se encuentra específicamente en el intestino luminal y este compuesto es no absorbible, este compuesto es un excelente molécula para inhibir selectivamente la enteropeptidasa, y por lo tanto no se espera para inhibir in vivo otra proteasa de serina (cuya ubicación es no-intestinal) . En lo que se refiere a OBE2001, estas acciones de compuesto comparten el mismo perfil que el de OBE 1999 y por lo tanto cumple los mismos criterios de especificidad y selectividad.

45 **[0096]** OBE2000 es más específica para enteropeptidasa y tripsina que los compuestos OBE1999 y OBE2001, con un bajo valor de IC₅₀ para enteropeptidasa, y el alto valor de IC₅₀ no sólo para la trombina, sino también para la plasmina (7100 nM) y Calicreína (260 nm). OBE2002 presenta el mismo perfil que OBE2000, a excepción del bajo valor IC₅₀ contra la calicreína y plasmina en comparación con OBE2000.

50 **[0097]** En consecuencia, estos resultados también muestran claramente que todos los compuestos ensayados tienen una notable eficacia en la inhibición in vitro de enteropeptidasa, y pueden considerarse como moléculas prometedoras para futuros experimentos in vivo en animales y/o en los seres humanos. Estos compuestos se ha demostrado que cumplen al menos dos requisitos necesarios para el tratamiento: la especificidad de la inhibición de proteasas de serina de subtipo de tipo tripsina, y la selectividad de la inhibición de la enteropeptidasa.

55 **B. EXPERIMENTOS IN VIVO**

1. Efecto de OBE2001 en el peso

60 **[0098]** El objetivo de este primer experimento in vivo es determinar el efecto anti-obesidad de OBE2001 en un modelo de obesidad inducida por una dieta hiperlipídica en ratones.

[0099] OBE2001 (Acetil-Ala-Phe-BoroArg) se proporciona bajo la forma de sal (peso molecular de 568,3 g/mol). ratones machos suizos, 4 semanas de edad, se dividieron en 2 grupos de 10 animales cada uno, recibiendo el siguiente:

Número de grupo	Dieta	Dosis
1	Grasa alta, <i>ad libitum</i>	Vehículo (agua)
2	Grasa alta, <i>ad libitum</i>	OBE2001 (40mg/kg/día)

[0100] La administración de OBE2001 se llevó a cabo como una solución en agua. Tanto OBE2001 o vehículo (agua utiliza un control negativo) fueron administrados a los animales a diario por vía oral en una administración de peso corporal de 5 ml/kg.

[0101] En cuanto a la alimentación de los animales, antes de los experimentos (período de aclimatación), la dieta normal (referencia No. 824050 comida SDSIDIETEX) estaba disponible *ad libitum* durante el periodo de aclimatación. 7 días antes del comienzo del estudio, una dieta hipercalórica rica en grasas (45% de proteínas, 4,73 Kcal/g; referencia 824053 SDSIDIETEX) fue dado a los grupos 1 y 2.

[0102] Los animales se pesaron todos los días de D-8 (8 días antes del inicio del experimento), entonces a partir de D-5 hasta el final del estudio. De D1 (primer día del experimento), se dio comida *ad libitum*.

Resultados

[0103] El peso corporal inicial (en g) de los ratones de los grupos 1 y 2 en D-1 (un día antes del experimento), así como la ganancia o pérdida de peso en función del peso inicial (de D1 a D13) se resumen en la siguiente tabla y representado en la fig. 8.

Grupo		D-1	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1	Medio	28,3	-2,8	-0,3	1,0	2,3	2,7	3,2	3,9
	SEM	0,7	0,2	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5
2	Medio	28,5	-2,7	-1,2	-0,8	0,2	0,7	1,0	0,9
	SEM	0,7	0,2	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,0
	p	NS	NS	NS	NS	*	*	*	*

Grupo		D8	D9	D10	D11	D12	D13
1	Medio	4,4	4,7	5,1	5,4	5,9	6,3
	SEM	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
2	Medio	1,3	1,0	1,1	0,5	1,8	2,0
	SEM	1,3	1,3	1,4	1,5	1,0	1,1
	p	**	**	**	**	**	**

Medio: Peso medio de los 10 ratones por grupo; SEM: error estándar del medio; NS: ninguna diferencia significativa entre los dos grupos ($p > 0,05$); *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

[0104] Como se muestra en la Figura 8, este experimento mostró que el peso de los ratones que han recibido el compuesto OBE2001 es significativamente menor que el peso de los ratones del grupo control. Esta diferencia es significativa desde el día 4 y altamente significativa desde el día 8 (véase la tabla). En consecuencia, la administración de OBE2001 en ratones da como resultado la disminución del peso tan pronto como el día 4.

2. Efecto de OBE2001 en la absorción de triglicéridos

[0105] El alcance de este segundo experimento in vivo era analizar los efectos del compuesto OBE2001 sobre la absorción de triglicéridos. Para tal fin, los ratones fueron inyectados con OBE2001, antes y/o después de alimentación forzada con una solución enriquecida con colesterol y ácidos grasos libres (clinoleic a 20%).

[0106] En este estudio, ratones machos Swiss CD1 de 7 semanas de edad se pesaron y se asignaron al azar para el peso corporal; 3 grupos de 5 ratones fueron constituidos por:

- Grupo 1 (solvent): grupo de control. Vehículo (H_2O + 2% de DMSO) en t-5min + solución A (clinoleic 20% + colesterol) en t0.
- Grupo 2 (OBE 25+25): OBE2001 25mg/kg (antes y después de alimentación forzada). OBE2001 25 mg/kg (solución B) en t-5min + OBE2001 25 mg/kg en la solución A (solución C) en t0.
- Grupo 3 (OBE 25): OBE2001 25 mg/kg (antes de sonda). Vehículo (H_2O + 2% de DMSO) en t-5min + OBE2001 25 mg/kg en solución A (solución C) en el instante t0.

[0107] 30 minutos antes del tratamiento (con solución A, B o C) se recogió sangre por punción orbital retro después de una ligera anestesia (isoflurano), para determinar niveles triglicéridos basales (t0). Todas las soluciones se

administraron por sonda oral a continuación en t-5 (vehículo o solución B) o t0 (solución A o C). Después de la administración de la solución A o C (que contiene ácidos grasos + colesterol), se recogió sangre de nuevo por punción orbital retro después de una ligera anestesia (isoflurano) en el tiempo 60, 120, 180, 300 y 360 minutos para la medición de los niveles de triglicéridos. En el tiempo de 360 minutos, los ratones fueron sacrificados.

[0108] Resultados: Los siguientes valores fueron obtenidos en diferentes momentos después de la administración de la solución:

			% de valor basal			
Tiempo (min)	0	60	120	180	300	360
Grupo 1	100,0	227,30	298,72	203,76	109,67	89,41
Grupo 2	100,0	243,39	202,34	127,81	62,35	56,71
Grupo 3	100,0	293,17	269,24	126,45	70,22	60,92

[0109] Sonda oral con una solución de clinoleico a 20% condujo a un aumento en los niveles de triglicéridos en la sangre en todos los grupos de estudio de las tres primeras horas. Los ratones tratados con OBE2001 en 25 mg/kg en el grupo 2 y 3 muestran una disminución en la absorción de triglicéridos en comparación con el grupo de control 1 (Figura 9).

[0110] Además, para cada grupo, el área debajo de la curva se calculó de acuerdo a los valores de la tabla anterior.

	Área debajo de la curva		% de disminución
Grupo 1	65453		
Grupo 2	48559	Grupo 2/grupo 1	26%
Grupo 3	56273	Grupo 3/grupo 1	14%

[0111] Este cálculo demuestra que la absorción general de triglicéridos se reduce en un 26% en el grupo 2 en comparación al grupo 1, y de 14% en el grupo 3 en comparación con el grupo 1. En consecuencia, estos resultados demuestran que OBE2001 es capaz de inhibir la enteropeptidasa y reduce significativamente la absorción de los triglicéridos en los animales tratados.

3. Efecto de OBE2001 sobre la absorción de proteínas

[0112] Este tercer experimento in vivo se diseñó para obtener información sobre la absorción de ^{14}C -proteínas en ausencia o en presencia de OBE2001 a dos dosis diferentes (5 mg/kg o 50 mg/Kg) después de una administración oral a ratones machos Swiss.

[0113] 15-suizos (1 CD), los ratones machos de 5 semanas de edad y con un peso corporal medio de 0.021 6 0.002 kg se dividieron en 3 grupos:

- Grupo de control (G1; solvent) que contiene 5 ratones, recibió agua a 5 ml/Kg en t-5min y ^{14}C -proteínas a 10 ml/Kg a T = 0min;
- Grupo 2 (G2) que contiene 5 ratones (OBE 5 mg/kg), recibió OBE2001 a 5 mg/Kg en t-5min y ^{14}C -proteínas a 10 ml/Kg a T = 0min;
- Grupo 3 (G3) que contiene 5² ratones (OBE 50 mg/kg), recibió OBE2001 a 50 mg/Kg en t-5min y ^{14}C -proteínas a 10 ml/Kg a T = 0 min.

[0114] Una preparación que contiene 5 ml de Clinoleico 20 (Baxter Ref DDB9500) con 1 g de glucosa (Sigma; ref: G8270); se preparó y 1 g de caseína (C3400 ref Sigma). Se añadió agua hasta que la solución alcanzó los 10 ml. Después de la concentración de la solución radiactiva que contiene ^{14}C proteínas (GE Healthcare; ref: CFA626) (x10), se añadieron 200 μl de esta solución radiactiva a 2,8 ml de la preparación, con el fin de alcanzar una concentración de ca 3,3 $\mu\text{Ci/ml}$. Los animales se mantuvieron en ayunas antes de la administración de este preparado radioactivo. La preparación radiactivo se administró oralmente mediante sonda intragástrica con una sola dosis (aproximadamente 33,3 $\mu\text{Ci/kg}$) en un volumen de ca 10 ml/kg de peso corporal.

[0115] OBE2001 se proporcionó en una mezcla de dos sales (HCl y TFA) con una pureza del 90%. OBE2001 se administra por vía oral mediante sonda intragástrica con una sola dosis de 5 mg/Kg para G2 y 50 mg/Kg para G3 en un volumen de ca 5 ml/kg de peso corporal.

[0116] Alícuotas de plasma se retiran y se colocan en 6 ml viales de plástico pesado previamente, en t+15, t+30, t+60, t+120 y t+240 min. Se añadieron aproximadamente 4 ml *Pico-fluor 40* y después de agitar, la radiactividad total contenida dentro de las diferentes muestras se determinó por centelleo líquido usando un espectrómetro de Packard

1900 CA equipado con un sistema estándar externo (análisis espectral). Una curva de enfriamiento para fines de calibración se creó utilizando un conjunto ^{14}C suministrado por Packard Instruments.

[0117] El recuento de Centelleo líquido (LS) se llevó a cabo con 2 sigma = 2%, y para una duración máxima de 5 minutos (de acuerdo con el método creado en el software 1900CA®). Valores dpm (desintegración por minuto) de menos de dos veces el nivel de fondo del medio biológico blanco fueron reportados como BLQ (por debajo del límite de cuantificación).

Resultados:

[0118] Durante este experimento con animales, ningún rastro de la morbilidad o la mortalidad se produjo, y no se observó ningún efecto particular en relación con el régimen de dosificación.

[0119] Una dosis/g Cmax de $0,9\% \pm 0,27$ administrada, produciéndose en 15 min se observó para el grupo 1 (control), mientras que la Cmax para los grupos tratados tendió a ser menor. De hecho, para los grupos tratados (5 mg/kg y 50 mg/kg), la Cmax eran $0,58\% \pm 0,54$, y $0,54\% \pm 0,24$ de la dosis/g administrada respectivamente. Los datos cinéticos tendían a una meseta a las concentraciones de 1h a 4h post-administración alcanzando respectivamente 0,5% dosis/g administrada para el grupo 1 y 0,4% administraron dosis/g para los grupos 2 y 3 (Figura 10).

[0120] La media AUC para el grupo 1 fue $2.214 \pm 0,1875\%$ dosis.h.g-1. AUC media significa para otros dos grupos fue respectivamente 1,8416 0,6402% dose.h.g-1 y $1.718 \pm 0,4366\%$ dose.h.g-1.

[0121] Este resultado demuestra que la absorción de proteína se reduce en gran medida en ratones que han recibido OBE2001 en comparación con los ratones de control, en los primeros 30 minutos después de la administración de proteínas, y que esta disminución se mantiene durante al menos 4 horas.

C. Generación de un ratón Constitutivo Knock Out (KO) para enteropeptidasa

[0122] Con el fin de comprobar que la enteropeptidasa es una proteína diana correcta en la lucha contra la obesidad, un ratón knockout (KO) que imita la deficiencia de enteropeptidasa se ha producido para validar primero el objetivo y para su uso como un modelo animal para el desarrollo de fármacos.

[0123] La generación de ratones knock out constitutivos consta de los siguientes pasos:

1. Orientación del vector de diseño y construcción;
2. Células madre de orientación C57BL/6 embrionarias (ES);
3. Generación de ratones heterocigotos para la Knock Out Constitutivo;
4. Generación de ratones homocigotos para el Knock Out Constitutivo.

1. Orientación del vector de diseño y la construcción

[0124] El homólogo murino de enteropeptidasa humana es llamado Prss7 y está situado en el cromosoma de ratón 16.

[0125] Con el fin de inactivar el gen de enteropeptidasa, exones 23-28, que codifican el dominio catalítico, han sido sustituido por un casete de NeoR FRT-flanqueado. El alelo KO constitutivo (exones 1-22) codifica una proteína C-terminal truncada que carece del dominio catalítico. El NeoR se ha extirpado a través de la recombinación mediada por FLP in vivo. La interferencia con la expresión del gen cola-a-cola posicionado (Chodl) a través de esta modificación del gen Prss7 no se puede excluir por completo. La sustitución de los exones 23-28 (aproximadamente 15kb) con un casete FRT-Neo (aproximadamente 2 kb) disminuye la eficiencia de la recombinación homóloga. Una revisión de la construcción de alelo KO se da a conocer en la Figura 11.

[0126] Esta estrategia de selección permitió la construcción de un vector que comprende una enteropeptidasa constitutiva de alelo KO (secuencia y el esquema representado en la Figura 12).

2. Células madre dirigidas C57BL/6 embrionarias (ES)

[0127] En un segundo paso, las células madre C57BL/6N embrionarias (ES) fueron transfectadas por el vector que comprende la enteropeptidasa constitutiva de alelo KO por electroporación. Se seleccionaron las células transformadas por su resistencia a G418 y ganciclovir. Hasta clones individuales 251 ES fueron recogidos y 2 ES clones positivos se obtuvieron (A-D2 y A-E8). En este paso, todas las células ES (CES) se cultivaron en células alimentadoras embrionarias resistentes a múltiples fármacos sin antibióticos y se controlaron regularmente por PCR y ensayos luminométricos de la ausencia de contaminación de bacterias y micoplasmas. El control de calidad (QC) cariotipo también se incluye (número de cromosomas) de todos los clones y líneas embrionarias expandidas (para un ejemplo de una publicación, informando de la generación de ratones KO, ver Roberds et al. Genética Molecular

Humana, 2001, Vol 10, No12, 1317 -1324).

[0128] Antes de que se inyecta en blastocistos, los clones de células ES fueron ampliamente validados por análisis de Southern Blot Analysis con varias sondas. Por lo tanto, el ADN genómico de las células WT y clones A-D2 o A-E8 se digirió con AflII, se ejecutan en un gel y la membrana de transferencia se hibridó con una de estas sondas, la sonda 5E2 (secuencia: GCCGCACTATTTGCAGCATG) (Figura 13). La delección de los exones 23-28 de Prss7 resultó en un fragmento de 11,7 kb AflII (de la posición 5373 a la posición 17.180) en lugar del alelo de tipo silvestre (WT) de 18,8 kb (desde la posición 5.373 a la posición 24.211).

[0129] Como se muestra en la Figura 14, AD-2 y A-E8 clones tienen un alelo de tipo silvestre (18,8 kb), así como un alelo KO (11,7 kb). Por el contrario, el tipo silvestre (WT) las células tienen dos WT (no eliminado) alelos (18,8 kb).

[0130] Estos resultados confirman que los clones AD-2 y A-E8 han incorporado con éxito al alelo KO.

3. Generación de ratones heterocigotos para Knock Out Constitutivo

[0131] En una tercera etapa, 2 clones de células ES se inyectaron en blastocistos de acogida diploides, y el blastocisto inyectado transfirieron en receptores pseudopreñadas (microoperación en condiciones libres de patógenos específicos (SPF)). Por lo tanto, heterocigoto (> 50%) quimeras color del pelaje se generaron y se criaron a heterocigotidad.

[0132] Para controlar el éxito de esta tercera etapa, la descendencia se genotipo mediante el siguiente protocolo de PCR. ADN genómico, extraído de la cola del ratón, se amplificó simultáneamente con un primer conjunto de cebadores (cebadores 1472_23 con secuencia: CGTTACTATCCATCACCTAAGC y el cebador con la secuencia 1472_24 GGGAATTCAGCTGTGTCTGAAC) correspondientes a la enteropeptidasa alelo de KO, y un segundo conjunto de cebadores (cebador 1260_1: GAGACTCTGGCTACTCATCC y el cebador 1260_2: CCTTCAGCAAGAGCTGGGGAC) que corresponde a un control interno. El tamaño de la enteropeptidasa de alelo KO era 412 pb (conv), y el tamaño del control interno fue 585 pb (c).

[0133] Tal como se esperaba, la amplificación de ADN genómico de ratones WT (115696 y 115705) dio una única banda de 585 pb. Por el contrario, la amplificación de ADN genómico de ratones heterocigotos (115695, 115702, 115706, 115707 y 115708) dio dos bandas, una para el alelo de control (585 pb) y uno para el alelo KO (412 pb) (Figura 15).

4. Generación de cachorros homocigotos para enteropeptidasa

[0134] En una última etapa, se generaron crías homocigotos para enteropeptidasa KO. Heterocigotos de enteropeptidasa KO se cruzaron y se obtuvieron 46 crías. Entre los recién nacidos, el 30% (14 cachorros) eran homocigotos para la enteropeptidasa KO, el 50% eran heterocigotos (22 cachorros) y el 20% eran de tipo silvestre (homocigoto dominante para el gen de enteropeptidasa).

[0135] La presencia de la enteropeptidasa KO en una cepa homocigótica se comprobó por análisis de PCR, a partir de ADN genómico, extraído de la cola del ratón. El ADN genómico se amplificó simultáneamente con un primer conjunto de cebadores (cebador 1472_23 con la secuencia: CGTTACTATCCATCACCTAAGC y cebador PRRS7 con la secuencia ATCAAGGAATCTTGGGAGCA) correspondientes al alelo de enteropeptidasa WT, y un segundo conjunto de cebadores (actina cebador directo: CGGAACCGCYCATTTGGC y actina cebador inversa: ACCCAGCTGTGCCATCTA) correspondiente al control de actina. El tamaño del alelo de enteropeptidasa era 533 pb, y el tamaño del control de actina de 300 pb.

[0136] Como se puede ver en la figura 16, los fragmentos amplificados de los ratones heterocigotos, en los carriles denominados 115.755 y 115.648, presentan dos bandas, una correspondiente a la de control de actina (300 pb) y una a la enteropeptidasa de alelo WT (533 bp). En contraste, los fragmentos amplificados de los recién nacidos 1A, 2A, 3A, 4A y 5A tiene un tamaño de 300 pb y por lo tanto corresponden al solo control de actina, lo que demuestra que carecen de una enteropeptidasa de alelo WT.

5. Observaciones fenotípicas

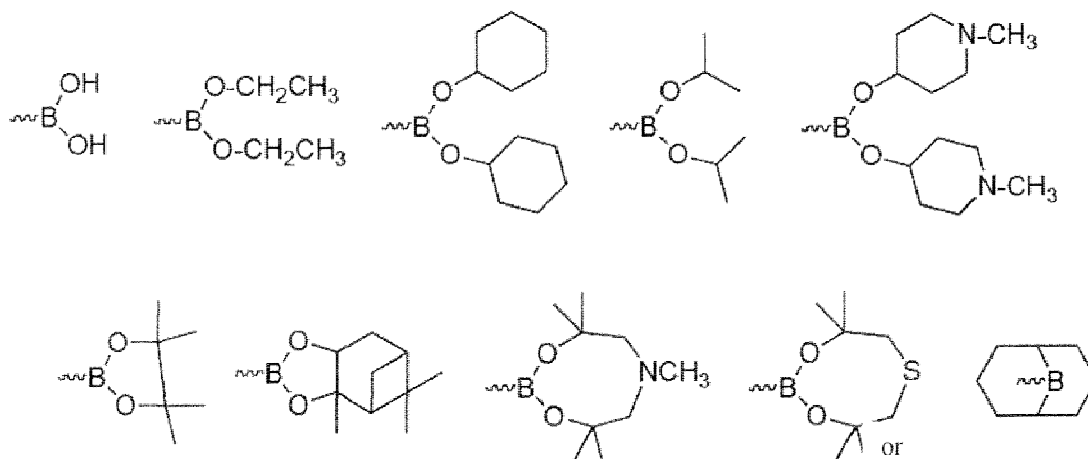
[0137] Los recién nacidos, obtenidos a partir del cruce de heterocigotos de knockout (KO) de enteropeptidasa, se cultivaron durante 7 días y se comparó su tamaño.

[0138] Como se puede mostrar en la Figura 17, los homocigotos de ratón para la enteropeptidasa KO (Ho) es dos veces más pequeña que el heterocigoto de ratón para la enteropeptidasa KO (He).

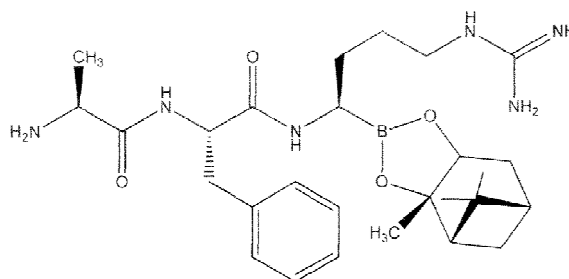
[0139] Estos resultados demostraron que la enteropeptidasa es un buen objetivo para combatir la obesidad, ya que sus resultados de inhibición completos específicos en una disminución significativa del tamaño.

Reivindicaciones

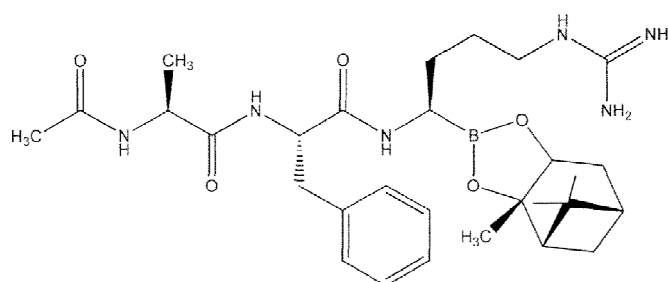
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en Glu-Gly-Boro-Arg, Ala-Phe-Boro-Arg, Ac-Glu-Gly-Boro-Arg y Ac-Ala-Phe-Boro-Arg, en el que Ac es acetilo.
2. El compuesto de acuerdo con la reclamación 1, en la que el resto de boroarginina comprende un grupo de la fórmula:



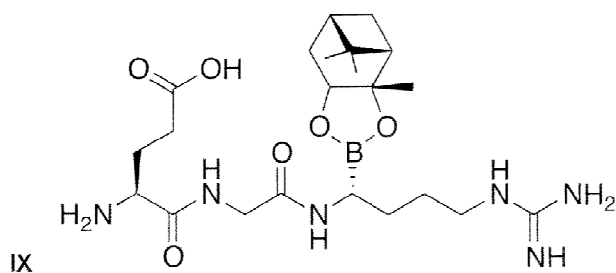
3. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



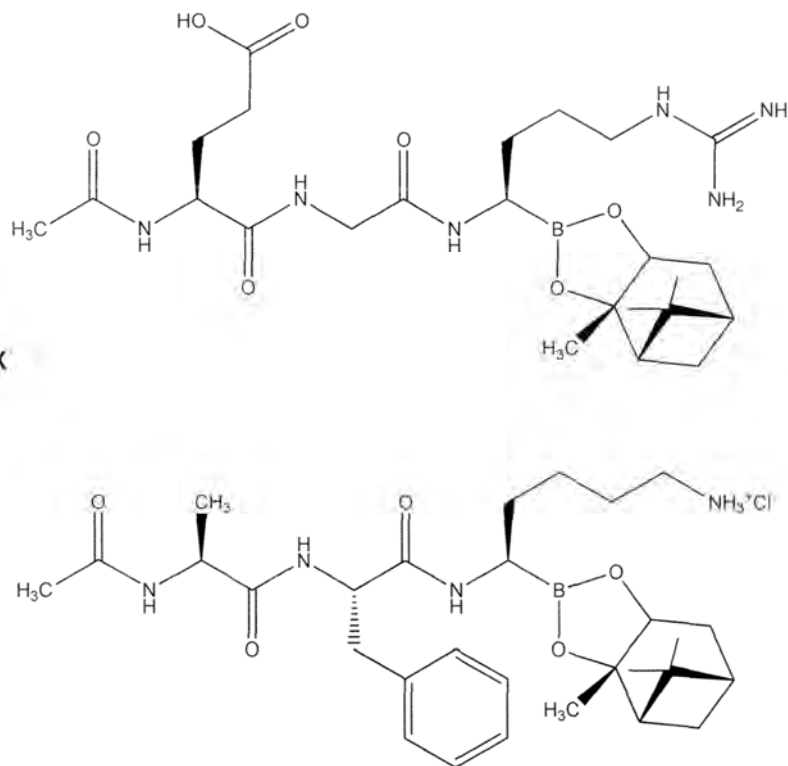
VII



VIII



IX



4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 3, que inhibe la actividad enzimática de la enteropeptidasa, preferiblemente que inhibe selectivamente la actividad enzimática de la enteropeptidasa sobre otras proteasas de serina.
5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 4, que es no absorbible.
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 5, que es en una base libre o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
7. Una composición que comprende al menos un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 6, que comprende además opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reclamación 7, para uso en el tratamiento de la obesidad en un mamífero, preferiblemente un ser humano.
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reclamación 7, para uso en el tratamiento del exceso de peso en un mamífero, preferiblemente un ser humano.
10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reclamación 7, para su uso en el tratamiento, en un mamífero, preferiblemente un ser humano, de las enfermedades asociadas con el metabolismo anormal de la grasa, en el que dicha enfermedad de metabolismo de grasa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en enfermedad gota, diabetes de tipo II, hiperglucemia, hiperinsulinemia, niveles elevados en sangre de ácidos grasos o glicerol, síndrome X, complicaciones diabéticas, síndrome dismetabólico y enfermedades relacionadas, la hipercolesterolemia, la aterosclerosis, la hipertensión, pancreatitis, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, accidente cerebrovascular, enfermedades coronarias del corazón, enfermedades vasculares periféricas, enfermedades arteriales periféricas, síndromes vasculares, de colesterol y trastornos relacionados con la lipodistrofia inducida por fármacos.

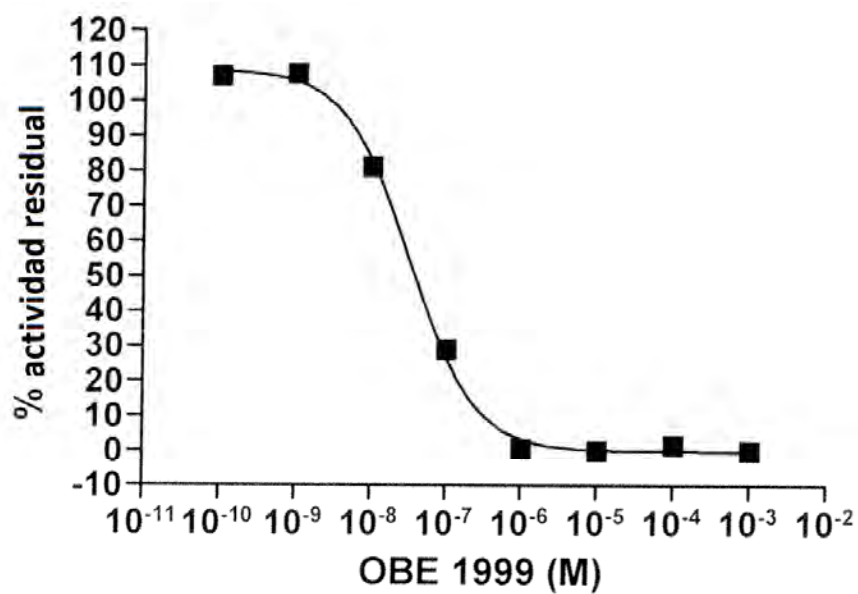


Fig. 1

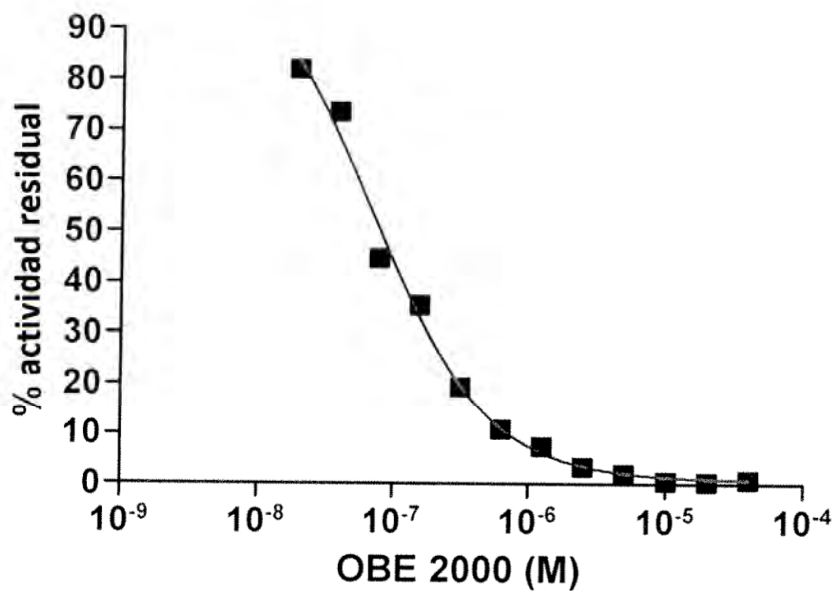


Fig. 2

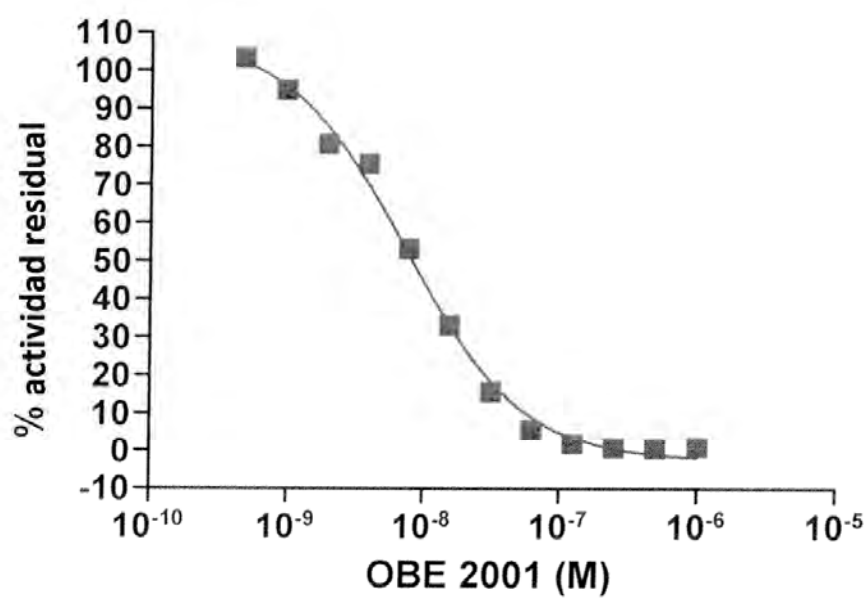


Fig. 3

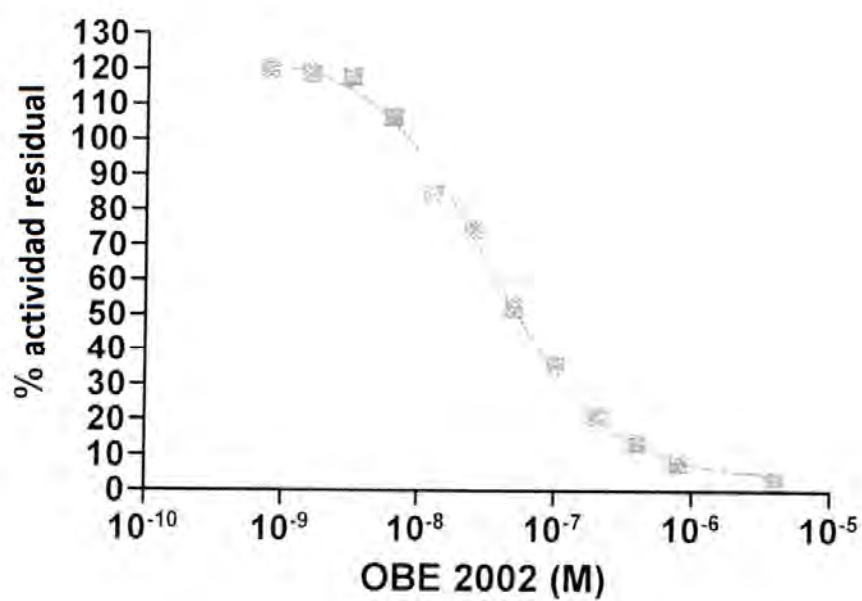


Fig. 4

Enzima	IC 50 (nM)			
	OBE 1999	OBE 2000	OBE 2001	OBE 2002
Enteropeptidasa	33.2	68	7.3	33.6
Tripsina	10.8	10.6	157	10.5
Trombina	6400	3220	4000	4000
Plasmina	29.8	7100	21.7	3800
Calicreína	7.5	260	6.9	81.4
Quimotripsina	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición
Elastasa	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición
Carboxipeptidasa A1	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición
Carboxipeptidasa B1	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición
α -amilasa	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición
DPPIV	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición	Sin Inhibición

Fig. 5

ES 2 575 131 T3

accagacagt tottaaatta gcaagccttc aaaacccaaaa atg ggg tgc aaa aga	55
Met Gly Ser Lys Arg	
1 5	
ggc ata tct tct agg cat cat tct ctc agc tcc tat gaa atc atg ttt	103
Gly Ile Ser Ser Arg His His Ser Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Met Phe	
10 15 20	
gca gct ctc ttt gcc ata ttg gta gtg ctc tgt gct gga tta att gca	151
Ala Ala Leu Phe Ala Ile Leu Val Val Leu Cys Ala Gly Leu Ile Ala	
25 30 35	
gta tcc tgc ctg aca atc aag gaa tcc caa cga ggt gca gca ctt gga	199
Val Ser Cys Leu Thr Ile Lys Glu Ser Gln Arg Gly Ala Ala Leu Gly	
40 45 50	
cag agt cat gaa gcc aga gcg aca ttt aaa ata aca tcc gga gtt aca	247
Gln Ser His Glu Ala Arg Ala Thr Phe Lys Ile Thr Ser Gly Val Thr	
55 60 65	
tat aat cct aat ttg caa gac aaa ctc tca gtg gat ttc aaa gtt ctt	295
Tyr Asn Pro Asn Leu Gln Asp Lys Leu Ser Val Asp Phe Lys Val Leu	
70 75 80 85	
gct ttt gac ctt cag caa atg ata gat gag atc ttt cta tca agc aat	343
Ala Phe Asp Leu Gln Gln Met Ile Asp Glu Ile Phe Leu Ser Ser Asn	
90 95 100	
ctg aag aat gaa tat aag aac tca aga gtt tta caa ttt gaa aat ggc	391
Leu Lys Asn Glu Tyr Lys Asn Ser Arg Val Leu Gln Phe Glu Asn Gly	
105 110 115	
agc att ata gtc gta ttt gac ctt ttc ttt gcc cag tgg gtg tca gat	439
Ser Ile Ile Val Val Phe Asp Leu Phe Phe Ala Gln Trp Val Ser Asp	
120 125 130	
caa aat gta aaa gaa gaa ctg att caa ggc ctt gaa gca aat aaa tcc	487
Gln Asn Val Lys Glu Glu Leu Ile Gln Gly Leu Glu Ala Asn Lys Ser	
135 140 145	
agc caa ctg gtc act ttc cat att gat ttg aac agc gtt gat atc cta	535
Ser Gln Leu Val Thr Phe His Ile Asp Leu Asn Ser Val Asp Ile Leu	
150 155 160 165	
gac aag cta aca acc acc agt cat ctg gca act cca gga aat gtc tca	583
Asp Lys Leu Thr Thr Thr Ser His Leu Ala Thr Pro Gly Asn Val Ser	
170 175 180	
ata gag tgc ctg cct ggt tca agt cct tgt act gat gct cta acg tgt	631
Ile Glu Cys Leu Pro Gly Ser Ser Pro Cys Thr Asp Ala Leu Thr Cys	
185 190 195	
ata aaa gct gat tta ttt tgt gat gga gaa gta aac tgt cca gat ggt	679
Ile Lys Ala Asp Leu Phe Cys Asp Gly Glu Val Asn Cys Pro Asp Gly	
200 205 210	

Fig. 6A

ES 2 575 131 T3

tct gac gaa gac aat aaa atg tgt gcc aca gtt tgt gat gga aga ttt	727
Ser Asp Glu Asp Asn Lys Met Cys Ala Thr Val Cys Asp Gly Arg Phe	
215 220 225	
ttg tta act gga tca tct ggg tct ttc cag gct act cat tat cca aaa	775
Leu Leu Thr Gly Ser Ser Gly Ser Phe Gln Ala Thr His Tyr Pro Lys	
230 235 240 245	
cct tct gaa aca agt gtt gtc tgc cag tgg atc ata cgt gta aac caa	823
Pro Ser Glu Thr Ser Val Val Cys Gln Trp Ile Ile Arg Val Asn Gln	
250 255 260	
gga ctt tcc att aaa ctg agc ttc gat gat ttt aat aca tat tat aca	871
Gly Leu Ser Ile Lys Leu Ser Phe Asp Asp Phe Asn Thr Tyr Tyr Thr	
265 270 275	
gat ata tta gat att tat gaa ggt gta gga tca agc aag att tta aga	919
Asp Ile Leu Asp Ile Tyr Glu Gly Val Gly Ser Ser Lys Ile Leu Arg	
280 285 290	
gct tct att tgg gaa act aat cct gcc aca ata aga att ttt tcc aac	967
Ala Ser Ile Trp Glu Thr Asn Pro Gly Thr Ile Arg Ile Phe Ser Asn	
295 300 305	
caa gtt act gcc acc ttt ctt ata gaa tct gat gaa agt gat tat gtt	1015
Gln Val Thr Ala Thr Phe Leu Ile Glu Ser Asp Glu Ser Asp Tyr Val	
310 315 320 325	
ggc ttt aat gca aca tat act gca ttt aac agc agt gag ctt aat aat	1063
Gly Phe Asn Ala Thr Tyr Thr Ala Phe Asn Ser Ser Glu Leu Asn Asn	
330 335 340	
tat gag aaa att aat tgt aac ttt gag gat gcc ttt tgt ttc tgg gtc	1111
Tyr Glu Lys Ile Asn Cys Asn Phe Glu Asp Gly Phe Cys Phe Trp Val	
345 350 355	
cag gat cta aat gat gat aat gaa tgg gaa agg att cag gga agc acc	1159
Gln Asp Leu Asn Asp Asp Asn Glu Trp Glu Arg Ile Gln Gly Ser Thr	
360 365 370	
ttt tot cct ttt act gga ccc aat ttt gac cac act ttt gcc aat gct	1207
Phe Ser Pro Phe Thr Gly Pro Asn Phe Asp His Thr Phe Gly Asn Ala	
375 380 385	
tca gga ttt tac att tct acc cca act gga cca gga ggg aga caa gaa	1255
Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Thr Gly Pro Gly Gly Arg Gln Glu	
390 395 400 405	
cga gtg ggg ctt tta agc ctc cct ttg gac ccc act ttg gag cca gct	1303
Arg Val Gly Leu Leu Ser Leu Pro Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Ala	
410 415 420	
tgc ctt agt ttc tgg tat cat atg tat ggt gaa aat gtc cat aaa tta	1351
Cys Leu Ser Phe Trp Tyr His Met Tyr Gly Glu Asn Val His Lys Leu	
425 430 435	

Fig. 6B

ES 2 575 131 T3

agc att aat atc agc aat gac caa aat atg gag aag aca gtt ttc caa Ser Ile Asn Ile Ser Asn Asp Gln Asn Met Glu Lys Thr Val Phe Gln 440 445 450	1399
aag gaa gga aat tat gga gac aat tgg aat tat gga caa gta acc cta Lys Glu Gly Asn Tyr Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Gly Gln Val Thr Leu 455 460 465	1447
aat gaa aca gtt aaa ttt aag gtt gct ttt aat gct ttt aaa aac aag Asn Glu Thr Val Lys Phe Lys Val Ala Phe Asn Ala Phe Lys Asn Lys 470 475 480 485	1495
atc ctg agt gat att gcg ttg gat gac att agc cta aca tat ggg att Ile Leu Ser Asp Ile Ala Leu Asp Asp Ile Ser Leu Thr Tyr Gly Ile 490 495 500	1543
tgc aat ggg agt ctt tat cca gaa cca act ttg gtg cca act cct cca Cys Asn Gly Ser Leu Tyr Pro Glu Pro Thr Leu Val Pro Thr Pro Pro 505 510 515	1591
cca gaa ctt cct acg gac tgt gga gga cct ttt gag ctg tgg gag cca Pro Glu Leu Pro Thr Asp Cys Gly Gly Pro Phe Glu Leu Trp Glu Pro 520 525 530	1639
aat aca aca ttc agt tct acg aac ttt cca aac agc tac cct aat ctg Asn Thr Thr Phe Ser Ser Thr Asn Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Asn Leu 535 540 545	1687
gct ttc tgt gtt tgg att tta aat gca caa aaa gga aag aat ata caa Ala Phe Cys Val Trp Ile Leu Asn Ala Gln Lys Gly Lys Asn Ile Gln 550 555 560 565	1735
ctt cat ttt caa gaa ttt gac tta gaa aat att aac gat gta gtt gaa Leu His Phe Gln Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ile Asn Asp Val Val Glu 570 575 580	1783
ata aga gat ggt gaa gaa gct gat tcc ttg ctc tta gct gtg tac aca Ile Arg Asp Gly Glu Glu Ala Asp Ser Leu Leu Leu Ala Val Tyr Thr 585 590 595	1831
ggg cct ggc cca gta aag gat gtg ttc tct acc acc aac aga atg act Gly Pro Gly Pro Val Lys Asp Val Phe Ser Thr Thr Asn Arg Met Thr 600 605 610	1879
gtg ctt ctc atc act aac gat gtg ttg gca aga gga ggg ttt aaa gca Val Leu Leu Ile Thr Asn Asp Val Leu Ala Arg Gly Gly Phe Lys Ala 615 620 625	1927
aac ttt act act ggc tat cac ttg ggg att cca gag cca tgc aag gca Asn Phe Thr Thr Gly Tyr His Leu Gly Ile Pro Glu Pro Cys Lys Ala 630 635 640 645	1975
gac cat ttt caa tgt aaa aat gga gag tgt gtt cca ctg gtg aat ctc Asp His Phe Gln Cys Lys Asn Gly Glu Cys Val Pro Leu Val Asn Leu 650 655 660	2023

Fig. 6C

ES 2 575 131 T3

tgt gac ggt cat ctg cac tgt gag gat ggc tca gat gaa gca gat tgt Cys Asp Gly His Leu His Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Asp Cys 665 670 675	2071
gtg cgt ttt ttc aat ggc aca acg aac aac aat ggt tta gtg cgg ttc Val Arg Phe Phe Asn Gly Thr Thr Asn Asn Asn Gly Leu Val Arg Phe 680 685 690	2119
aga atc cag agc ata tgg cat aca gct tgt gct gag aac tgg acc acc Arg Ile Gln Ser Ile Trp His Thr Ala Cys Ala Glu Asn Trp Thr Thr 695 700 705	2167
cag att tca aat gat gtt tgt caa ctg ctg gga cta ggg agt gga aac Gln Ile Ser Asn Asp Val Cys Gln Leu Leu Gly Leu Gly Ser Gly Asn 710 715 720 725	2215
tca tca aag cca atc ttc tct acc gat ggt gga cca ttt gtc aaa tta Ser Ser Lys Pro Ile Phe Ser Thr Asp Gly Gly Pro Phe Val Lys Leu 730 735 740	2263
aac aca gca cct gat ggc cac tta ata cta aca ccc agt caa cag tgt Asn Thr Ala Pro Asp Gly His Leu Ile Leu Thr Pro Ser Gln Gln Cys 745 750 755	2311
tta cag gat tcc ttg att cgg tta cag tgt aac cat aaa tct tgt gga Leu Gln Asp Ser Leu Ile Arg Leu Gln Cys Asn His Lys Ser Cys Gly 760 765 770	2359
aaa aaa ctg gca gct caa gac atc acc cca aag att gtt gga gga agt Lys Lys Leu Ala Ala Gln Asp Ile Thr Pro Lys Ile Val Gly Gly Ser 775 780 785	2407
aat gcc aaa gaa ggg gcc tgg ccc tgg gtt gtg ggt ctg tat tat ggc Asn Ala Lys Glu Gly Ala Trp Pro Trp Val Val Gly Leu Tyr Tyr Gly 790 795 800 805	2455
ggc cga ctg ctc tgc ggc gca tct ctc gtc agc agt gac tgg ctg gtg Gly Arg Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Val Ser Ser Asp Trp Leu Val 810 815 820	2503
tcc gcc gca cac tgc gtg tat ggg aga aac tta gag cca tcc aag tgg Ser Ala Ala His Cys Val Tyr Gly Arg Asn Leu Glu Pro Ser Lys Trp 825 830 835	2551
aca gca atc cta ggc ctg cat atg aaa tca aat ctg acc tct cct caa Thr Ala Ile Leu Gly Leu His Met Lys Ser Asn Leu Thr Ser Pro Gln 840 845 850	2599
aca gtc cct cga tta ata gat gaa att gtc ata aac cct cat tac aat Thr Val Pro Arg Leu Ile Asp Glu Ile Val Ile Asn Pro His Tyr Asn 855 860 865	2647
agg cga aga aag gac aac gac att gcc atg atg cat ctg gaa ttt aaa Arg Arg Arg Lys Asp Asn Asp Ile Ala Met Met His Leu Glu Phe Lys 870 875 880 885	2695

Fig. 6D

ES 2 575 131 T3

gtg aat tac aca gat tac ata caa cct att tgt tta ccg gaa gaa aat	2743
Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Glu Asn	
890 895 900	
caa gtt ttt cct cca gga aga aat tgt tct att gct ggt tgg ggg acg	2791
Gln Val Phe Pro Pro Gly Arg Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Gly Thr	
905 910 915	
gtt gta tat caa ggt act act gca aac ata ttg caa gaa gct gat gtt	2839
Val Val Tyr Gln Gly Thr Thr Ala Asn Ile Leu Gln Glu Ala Asp Val	
920 925 930	
cct ctt cta tca aat gag aga tgc caa cag cag atg cca gaa tat aac	2887
Pro Leu Leu Ser Asn Glu Arg Cys Gln Gln Gln Met Pro Glu Tyr Asn	
935 940 945	
att act gaa aat atg ata tgt gca ggc tat gaa gaa gga gga ata gat	2935
Ile Thr Glu Asn Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu Glu Gly Gly Ile Asp	
950 955 960 965	
tct tgt cag ggg gat tca gga gga cca tta atg tgc caa gaa aac aac	2983
Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Glu Asn Asn	
970 975 980	
agg tgg ttc ctt gct ggt gtg acc tca ttt gga tac aag tgt gcc ctg	3031
Arg Trp Phe Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly Tyr Lys Cys Ala Leu	
985 990 995	
cct aat cgc ccc gga gtg tat gcc agg gtc tca agg ttt acc gaa	3076
Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Ser Arg Phe Thr Glu	
1000 1005 1010	
tgg ata caa agt ttt cta cat tag cgcatttctt aaactaaaca ggaaagtcgc	3130
Trp Ile Gln Ser Phe Leu His	
1015	
attattttcc cattctactc tagaaagcat ggaaattaag tgtttcgtac aaaaatttta	3190
aaaagttacc aaaggttttt attctttacct atgtcaatga aatgctaggg ggccagggaa	3250
acaaaaatttt aaaaaataata aaattcacca tagcaataca gaataacttt aaaataccat	3310
taaatacatt tgtatttcat tgtgaacagg tattttcttca cagatctcat ttttaaaatt	3370
cttaatgatt attttttatta cttactgttg ttttaaaggga tgttatttta aagcatatac	3430
catacactta agaaatttga gcagaattta aaaaagaaag aaaataaatt gtttttccca	3490
aagtatgtca ctggttgaaa taaactgcc aaaaattttct agttccagtt tagtttgctg	3550
ctattagcag aaactcaatt gtttctctgt cttttctatc aaaaattttca acatatgcat	3610
aaccttagta tttttccaac caatagaaac tattttattgt aagcttatgt cacaggcctg	3670
gactaaaattg attttacgth cctctt	3696

Fig. 6E

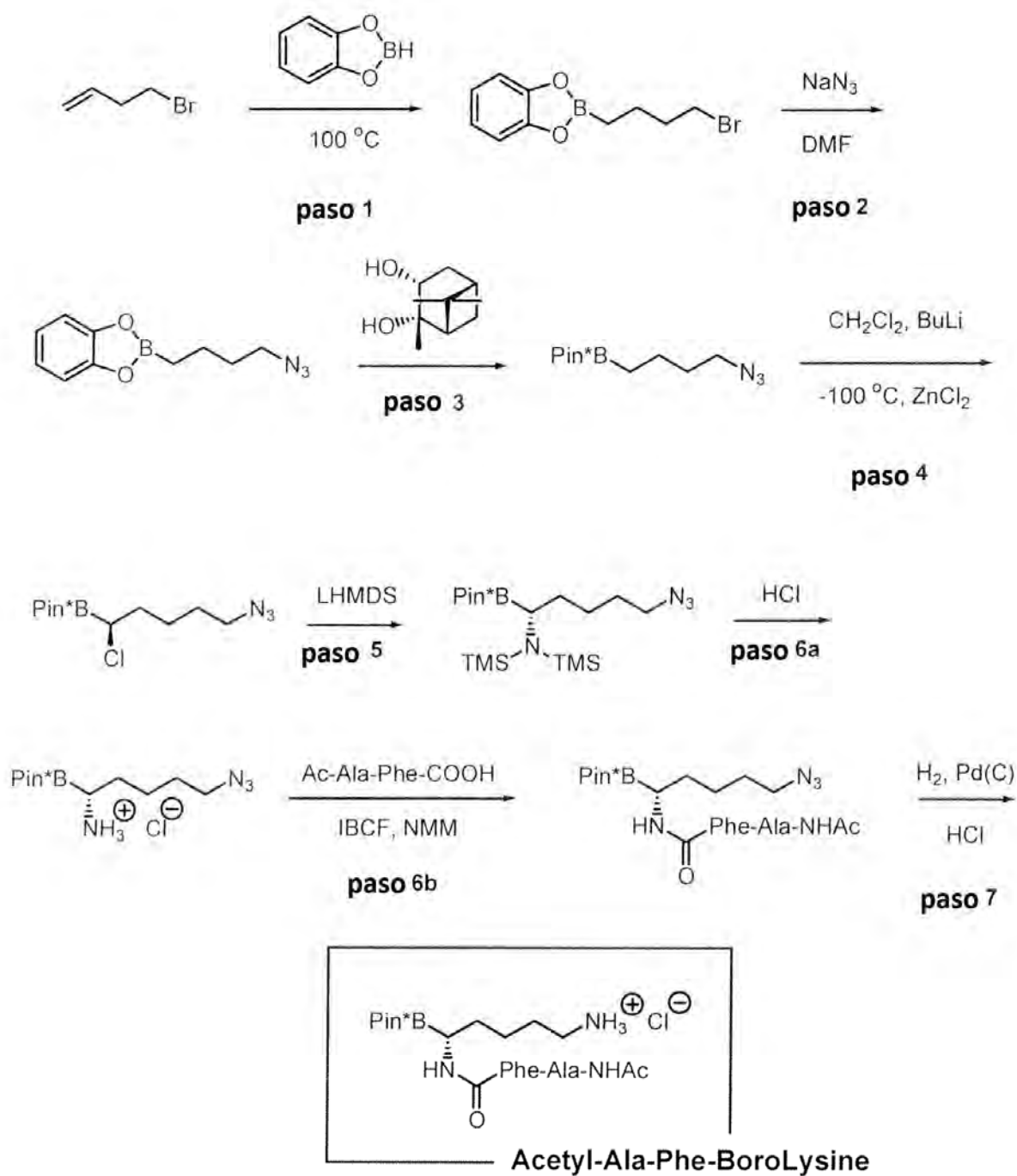
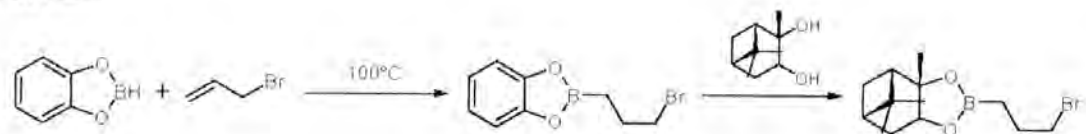
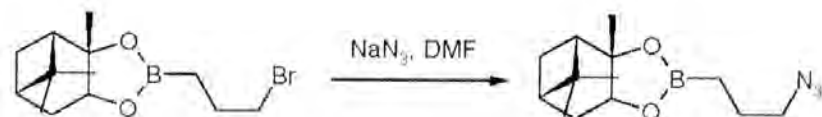
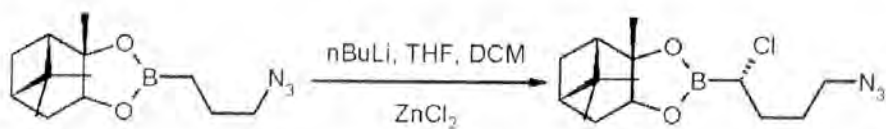
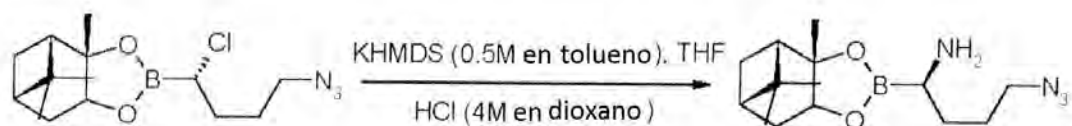
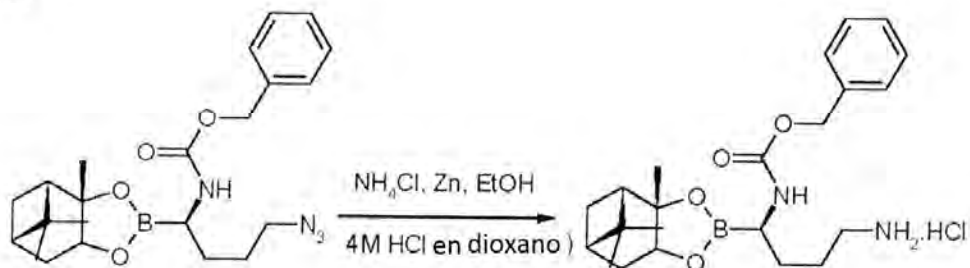
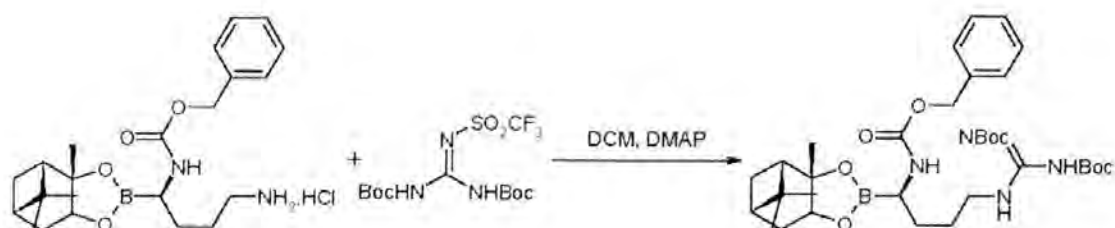
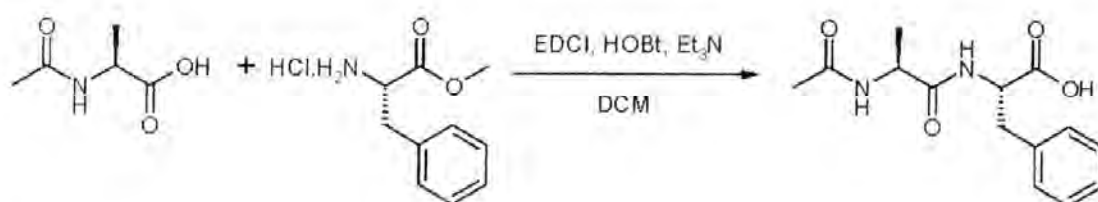


Fig. 7A

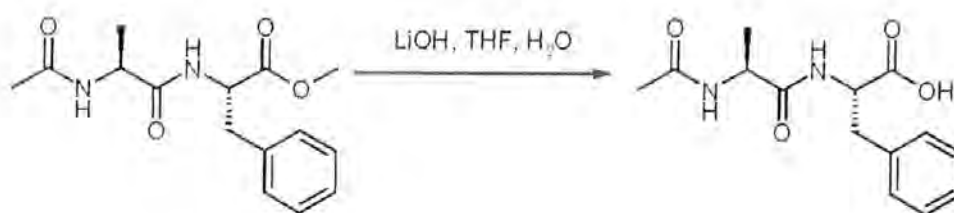
Paso 1:Paso 2:Paso 3:Paso 4:Paso 5:Paso 6:Paso 7:**Fig. 7B**



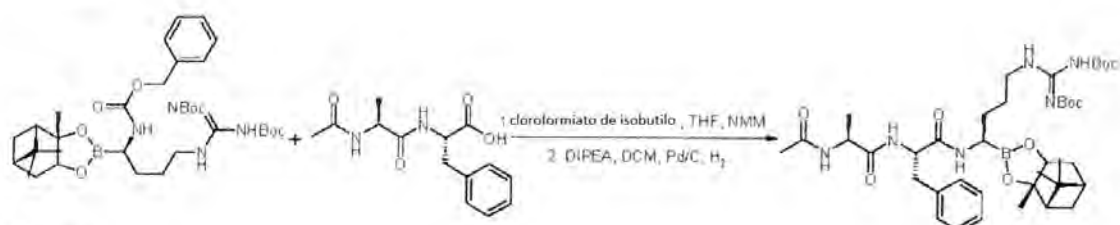
Paso 8:



Paso 9:



Paso 10:



Paso 11:

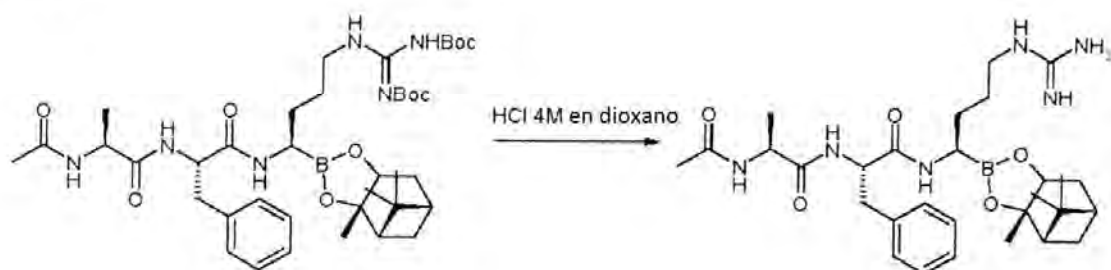


Fig. 7C

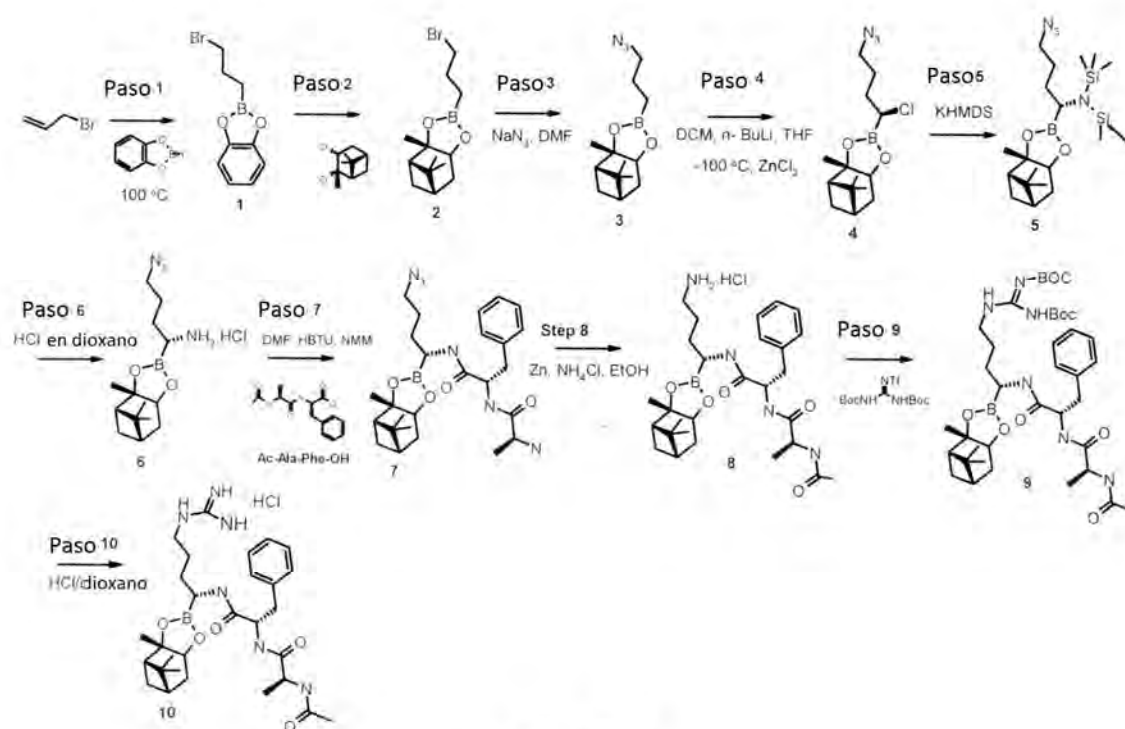


Fig. 7D

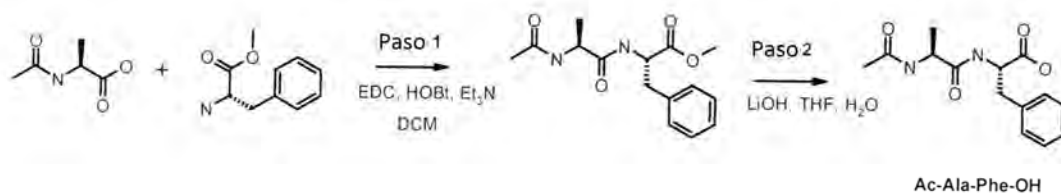


Fig. 7E

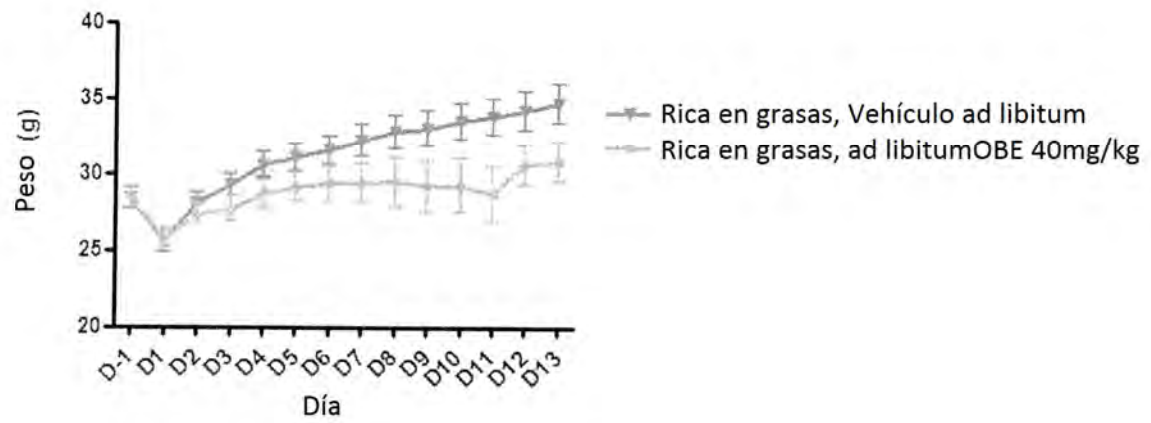


Fig. 8

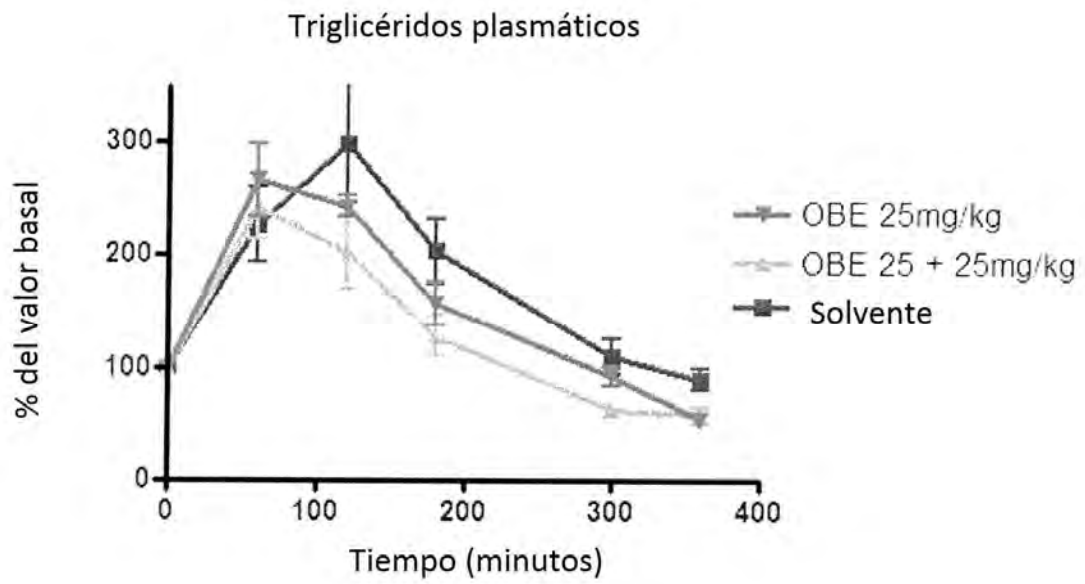


Fig. 9

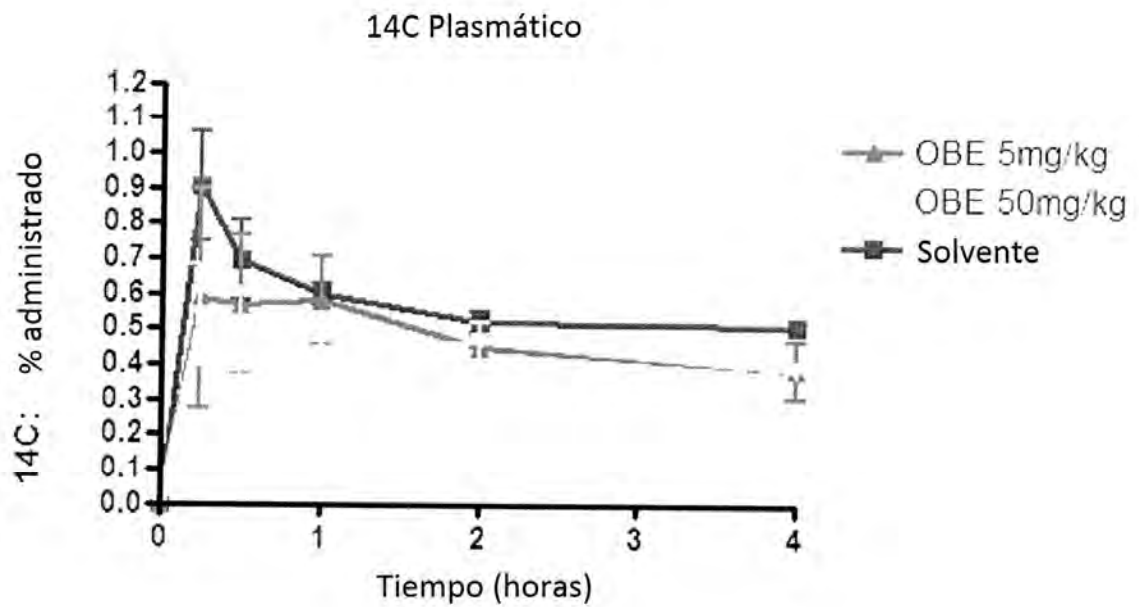


Fig. 10

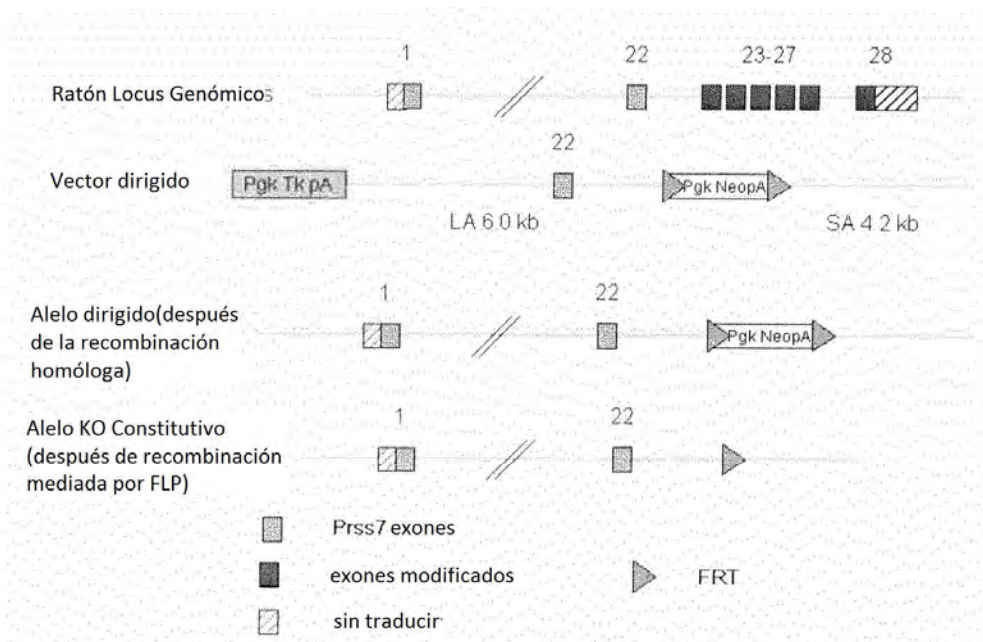


Fig. 11

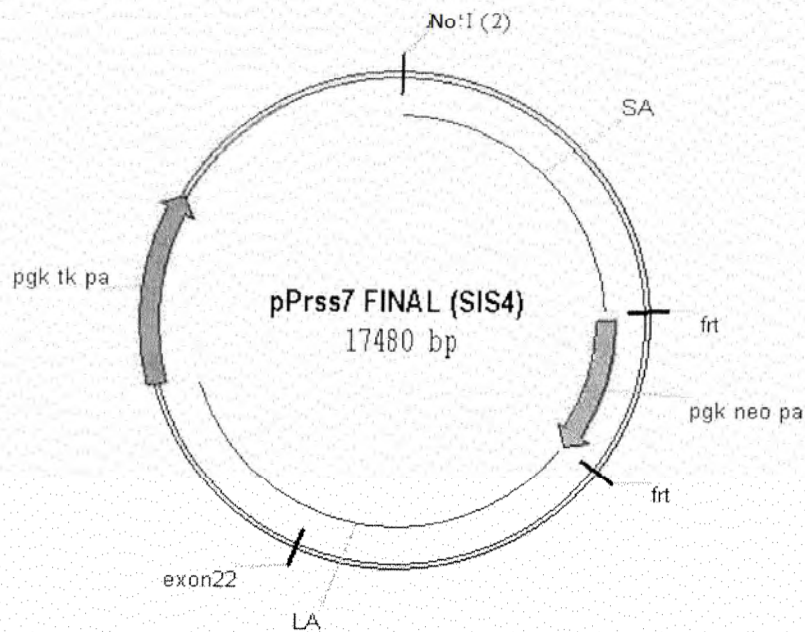


Fig. 12A

eggccgccccctgtcagttgccgggatgagcttaagtcctttgtccatcattcttagatcc
 tcccccttttcccttttccaggaagcaaggagacacttcatcaaagactccactccatt
 atcatctgagtgcccttgcagaaagttaaattccaatctggtacacatggcgggttctct
 cattccataaccatttccaaaataactctccttcccttaactagtagaacatttttttagtg
 aatgattaaagcacaattgagggccacatggatatcttaactacttttcttaccatttaaaa
 tcccttcccttccataaaactttgcctgacttactttctcttccatgctggatatacctggg
 aacattatgttgatcttattgattagaaggaatatccatagaatgtgtaatttggaaatt
 tatttatccaccacaacactcaaattgatatgaagcaagtgttttgcacataatgctca
 aggcctttagaagtagatctttttgtctttaaagagttctgcaaactcgacaggatgggtgga
 atgttgcaaaggtgtatctgtgagtgggggccaaaagctattaggggttgaaactgtggga
 accttggggccacataaggactaaacatagggggctgtggatagaccaagtgaagatta
 tttccaggaaacgaaggcaaaagaatgcagatcttgacatttgatcttggggatacttac
 aggcactttttaccgtagccagaacaatgactactatgggaaagaacaaactgaatccag
 gcacaatcccataagggcctagggtctcgttctaggggaatggaacttacatgtcagacct
 tcttggaggaagaactcacaagcccccgagtcctgtgaatgtgcacatctgcttggacatac
 attgattcgagagagaggcacaatgaacctttcagtagacaaaaggacttaaatccagttt
 aggaagactaaagggaacaaaaaaacaatagatgggttacttgcacctaggactggagcat
 gtgtttgggaacgattggacactaattgtatcaacaattatatcagagtgcccataaagc
 gagattcagaacacctggccaaagaaaacaaggtttattgggggaggggggaatgggaggt
 ttttagtactctgctgggcactgttgccacatgcgtgtttgagctctatgggttagtgaaaag
 atacaaatatgcaaatatgcttgtctgttctcaacacttataagaactgtttgccatttt
 tacatcttggaaataatctagactttttttttagtaggaatggaaagtattctcaggaggga
 agaagaactcataatatctgtctgactgtctccatttggaccgagacacatttagtttga
 tacgactcaagaactgaattttatttcttcttatgtttttttccagtaaaaggaagatcaa
 aaactagcccgaatcagctacactgtggatttcaaaaagcacgaggaaggaaagtggca
 tggaggtataataatgaactggcattgttctggaaaaataaaatagttttgtaatcgttg
 atcaatgtaaggaatggcatcatcccttggaaatggcttgaaatctcaaaggatctgcaa
 gatggactgaagctccccccttgaggcaaatgtcaaaaataatttttagaagtttatagtt
 tcaacttacaacatatgtctgagtgagacctgggttactctcctaaaggatacacctaaatt
 catgtaaaagaaatggaccatgcggatataaattctgtggaccaatctggaatacctgtg
 ttgggagtagttactcttgcctctctttctttttccatcttcataaaattttgatctatgtc
 atgtaatatataaattgtatttcaatttacgggtgtgcagaaacattctacctttgcaaaagt
 gtttgatgaaaatagagtggtctgatatttatattatgacatttgatttttacatatat
 agtggttttcatataaaactgaattcacacagacacaaaagaatccttgcatagggaaaac
 atttcttttggttaggatagttcatgtttgttctgtttctttgtcttgggttcgataaagtt
 taggaagtatcttcagaaataagaaactatttcattgactgtgctgttaatctgctgaaa
 cactttacttagaggcaagaactgtctaaactcaattgtgcaagacacgtgccttacaat
 tattcttaatttaaaattaaacagatttttgaataaaagtatctttaataataacttgtat
 agacaccaatagagtttaaccttgaaaaaaatggcatctgcagtacaaatcacaggctctc
 acatgttgcctatagaattgcaaatagctccccagagtgtcaggaatcaatgtggctcct
 ccttttcaatcaaacagagtaactatttgaaggctttggagtcagacagttgctgtttgg
 ctgaggttctcctaaactgaatttagcctgtataatatataaagctcaatgggttccagca
 gtgtgatgctaagcagaacacactgatattaatgattaaaagaagaagaagaagaaaaac
 aaaactacaaatcacatcatttaattgggccagggaactcgaggttgctgatgtttgcttat
 ctttgatgagtggtgtttgtggtgtggaactgtggcttctctctgtctgatggagtttcc
 tcaacacgtagcacttgttctctcaagagagttgtaactattttgtcttcaaatgtccc
 tgtgtcacttttagccaaaataaagagttcttgtttctgaagaatgatctttgggtgtgtc
 tacattcttaagggaaccaaggccagatgtgtttcatcattacctgaggatgaaatcaaa
 cattgcatgtgaagagcccagacagcggcagatctgaaggaaacagggatgtttcttcttt
 ctctgtcagctctgttcagttagacagtccttaagtagacttggtttttccaaacaagag
 gcaaaaatgggctctcagatcttttctgtccttgagactgaatggacaactgcattc
 taagctcagctgccccacttagctccatccttttgggtcaaatgggaggccagctgtt
 ggatctatgttttgcctgtatgccaaactccactcgtttctccatttagctatccagaact
 ctaacagctgaaggatggaagcacaacactgaaaggggaaggctgggtgtttcttttattat
 caaggtcaggaaagcatccagtggttaattggcaaacctccatctgtgacaagggtgggaaaa
 caattctctgtcctcttaaaagatgggtgatgataccatctttgaaaagggtttgtaaagt
 ttagctggcccttgcaaaaccggtacatgatgtaactgctctgtatttttcagaacata

Fig. 12B

gtgttaatatatgtttgggaatgatccattcaagtalttcacaaacaaacacacacactcgc
tctctctctcttattttcccttctaggttgaggttatttggaagggttttctctgagaagagt
gtgcagagacctttgattattagtgtcagtgcttgtgggaacatgcagtcacctatcatc
tgggcgaatcttcttttattgaaatgttttccatgctctgactgtcttcaggttagaacat
gattgtctcgaaacctctgtctccattttcagggtcactgtcacctgtagagttgtctc
tagtgtctcttaaacgcacatgaattgtaattatcccatctaaagcatagctcaagctttc
tcccttccccaaagcaaatatttagcagttgcttttttaaaaaaaatttttaaatacaact
catttgaacctattcattcttgcattggattaattcatgaaagaaaaatgaaaacaatg
aatgtgttttatgttgatgaaatatgtctgtgtcagtggttagtgtgtgtgtgtgtgtgt
gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtattgtgtcaagttagcatggattttcagcagattt
gtgtgataaaactgaaactgacattttgcattttctcttgaaaataatccaagagattaaagaa
gtggagcaaatttaatttattacacattttttgcttttagtggggaattcagctgtgtctg
aacaatttttcacatgttcaggatagttctctaaactgtacaatttttcgcgggtcgcgc
ctaggggttaaccgaagttcctatactttctagagaataggaacttcggaataggaacttc
ttataatctagaactagtggatcgatccacgatttcgaggggccctgcaggtcaattctac
cgggttaggggagggcgttttcccaaggcagttctggagcatgcgttttagcagcccgctg
ggcacttggcgctacacaagtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccggtagg
cgccaaccggctccgttcttttgggtggcccttcgcgcacacttctactcctccctagtc
aggaagtcccccccgcccgagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagttagca
cgtctcactagttctcgtgcagatggacagcacgcctgagcaatggaagcgggttaggcctt
tggggcagcggccaatagcagctttgtctcttcgtcttctgggctcagaggtcgggaagg
gttgggttcggggcggggtcaggggcggggtcaggggcgggggcgccgaaggtcc
tcgggagggccgggtattctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgcgcgctgttctctct
tctcatctccgggcctttcgacctgcagccaatatgggatcgggcattgaacaagatgg
attgcacgcaggttctccggcgcgttgggtggagaggctattcggctatgactgggcaca
acagacaatcggctgtctgatgcgcgcgtgttccggctgtcagcgcagggggcgccgggt
tctttttgtcaagaccgacctgtccgggtgcctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcg
gctatcgtggctggccacgaacgggcgttcccttgccgcagctgtgtctgcacgttgtcactga
agcgggaagggaactggctgtctattgggggaagtgcgggggcaggatctcctgtcatctca
ccttgtctcctgcgagaaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgt
tgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgcagcgtac
tcggatggaagcgggtcttctgcacaggtatgcttgagcgaagagcatcaggggctcgc
gcagcgcgaactgttcgcagagctcaaggcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
gaaccttgggcgatgcctgcttgcgaatatcatgggtggaaaatggcgcgttttctggatt
catcgactgtggcgggtgggtgtggcggaacgctatcaggacatagcgttggctaccgc
tgatatgtctgaagagcttggcgggcgaatgggctgaccgcttctctcgtgctttacgggtat
cgccgctccgattcgcagcgcacgccttctatcgcttctttgacgagttcttctgagg
ggatcgatccgctgtaagtctgcagaaattgatgatctattaaacaataaagatgtccac
taaaatggaagtttttctgtcatactttgttaagaagggtgagaacagagttacctacat
tttgaatggaaggataggagctacgggggtgggggtgggggtgggattagataaatgcctg
ctctttactgaaggctctttactattgtctttatgataatgtttcatagttggatatcata
atttaaacaagcaaaaccaaattaaagggcagctcattctctccactcatgatctataga
tctatagatctctcgtgggatacttgttttctcttgattcccaactttgtgggtctaaagt
actgtggtttccaaatgtgtcagttttcatagcctgaagaacagagatcagcagcctctgtt
ccacatacacttcatctcagttattgttttgcgaagttctaattccatcagaagctgact
ctagatcctgcaggaatttaattcatatgaagttcctatactttctagagaataggaactt
cggaataggaacttcaaaatgtcgcggcgcccatgtcttgtgggttctctgaagactgtg
agaaatgtttgcttttgattacttttatcacgaattattttgatttcagcaaacatggat
ttcactactttctcatttctagggaaatatgtttcaattactctagtctatatctaaaacc
acttacagtgtctaaacctgtgttcaacatgggtctctttcaatcaagttacttgtgacaca
tcacgggtgttaaatcctgaattttgggcttaggtgatggatagtaacgcaaatgattat
ttttctctctctacttttttttttttttttgggtgaatagataacacatgctaattgccaggct
gtaatttttaagcaatatttagcatatgaactttctttctctcttactaagtagaaaaact
tttacttaaaagaaacagctcttctgtagtctggtaacttcttgggcaaaagcatggctta
cgtggagaaaagaaactgaacgctgcgaagtaactttgggaattaaatttctgaagga
tcagcggaaaggtaacgcagctgtttgttcttgccacaacaagagattggttactccggac
tcagtgaagattgcctagtgtctccgcagattggtaataactgaagctaatgaactgcta

Fig. 12C

gtatggattttaccctttaatacttttagactatgattggccattttggtgacagacgtagt
 agaaaacaaactgtaagaaaaagatgaactgatgaagaccgcttccagttctcatctactt
 cagggctgttcagtgacaagcccttctatgaggtgtgaaattcatttctggaaaagcaaat
 gggcttacgctggtaaaagaggcagacatgtgctgtagcgactataaaaataacgactacgc
 gtaaaactactgaaatcacatcgcttatagttttgaaatttggtttttccaaagccaggaa
 aacttacattaaaaaataaaattgtttacgaggttttatacaatttgaccagcagagggc
 aatgttacaccaggaatcataacactgccactattctgctctcggtatccccacacat
 taaatatttgtatatgtgtgcccacacatagaattaaatgctctacacttatgtacttac
 ttaaatgacgtgtgcatgttgcttgagtactcttacttttgaaaaaggataaaaagaaaa
 aaaaaaacacaaaacaaagctatgtgctcactaaaagcaactccatagttttagaacacg
 aatggtaagcttattttaaaaagaacgtacgacattctattatcaacattctcttttaat
 atataagacaacttcaatagaaatataagaaaatgtactttgtgaatgatcagtatctt
 atatacctctctataaaaatgctcgaaaatctcaattaatttcccttttgatgctcaggt
 gtgtttgaaagaaaagtaggctacaggatgcattgtaggatactttcaagtctcacaat
 ggccttttcaaactctacagtgctcattaataaaaatccatattcagaatggctcctggga
 cagtggtactggccttagaaagggcaaacagtgcttaaatatttttaatacaagcacataa
 gcagttaatagctcattggcatctcacaagaaatttcacattttctccgataacttcttc
 ctatttttggttacagcttttagaagaaggataccctccaaagcactatttttccatctt
 acactaaatgccacaattatataacattaattaactaagggaactgaataaatcaatagt
 ctcaattttgctgctcagttataatagggccaaattaaagaaaaggattgaagacatttagc
 taactggcttttttgggtgtaaatgagcataaaagggtacatctataaaaagtcttctttt
 ttcaactaccatgaatataagataaatcgtggcactaatattagttgaaactgtcacctg
 actcctacaactttgtagcagatgctcagctgggtcttcatgtgggtccctgacaattg
 tagcaggcactgtctctgaatctattgctgaacctggatcccttctctagctgaact
 gcttggttgggctcagtggaaggggtgcacttagtctgcaacagttgatctgcttgg
 gcagggttggtaccggatgtgtgtgaggccttctctatctcaggagggatagttggggagg
 ggctggggaggatgagcctgggaggagaggaggagggtgctgcaatcagggatgtaaag
 tgaataaataaatttaagaaaaaagaaaaaaaggaaataatacgggttttctctgaaaga
 ggcattcaatttaatttgaatggctttaactttgttttctcttcttactaatatttaca
 tctaggaaacctgaataggtagaattctcagcataccggagaacctgggtctcagaac
 gccttatttagaaaggaagttgtgaaacctgtgtgaaaacttccaggtggattggctcaa
 ccactgggatcgctatctgtcaacactgacagacagtgctaaaccccaagattctctcg
 cagatactaaatgtagagcttacaaatttggttttattgcttgagctttggggagtgctga
 ctttctctgagcagtggaataagctgatgctgttttaacgtcaagtctgttaagtaagtg
 tactggtaacaggatgctaactgttaagagtgcaattctgatgtctcttgcagtcattt
 ctcatcccgagtttatctgtagtggaatatgagattcagaggccaatttctcagtcctc
 aaacaaaaatcactactaatgtctaaataggagaaattacataatactatgacagaat
 ttttgaatagaggaaggatgctgatttttaatacttcacaaaaaagggtataagagaaga
 tctagcttaaaatagcaaaaaaagatacaaatataggactaattatattttttaaatt
 atattcatattttgtttgctaagaaagataaaccccttgattctcagctaacccttgtctt
 ttgatggttgtctgagggctatttatctctatattattctaaaacttacaatttattttcat
 gatatttagagcttttagagtatgagactaagaacagttatttggtatatcatcttctct
 ctgtatgtcataacagcaatggcttaaaacagtaaattagactgtcttatacaaatgaag
 atcaaacatctctatcaggaaaaaacacacccatagtttgggtgacattacacaaataaa
 agccaggcagtggtggcacatacctttaatccagcacttgggaggcagaggcaggcga
 tttctgagtttgagaccagcctggtctacagagtgagttccaggacagccagggtacac
 agagaaacctgtctcaaaaacaaaaaagcaagcaagcaagcaagcaagcaagcaacc
 aacaagcaaaagaaattgaaaaaaaatttcaaatgtatgtgggtcaatgtgtgggtggcact
 gacacattaatggctata
 tatt
 cctatgtaccaataaaaaataaaacatcctggcaccacccataggagtttagtatcaagctt
 ccattaggggcttggtttactctcacaatgggtccacctccggtagatgatattggcatt
 gatgagtttgactcctaaggtagaataaacgacatatgaacaggagataaaattacca
 cattaatgctacattttcattattggatgagacataattggaagtaaatattgttaatac
 ttgggaaaagtggagggcagagaaactgggcaggatctattgtataagggaagaatccat
 tttcaatagatataaatcaaacataattatagaccggttagcaaaattattacttaggac
 attaaatattgtcagtttttgggaaagccttttagtacacggtttgaatatcgtacattata

Fig. 12D

ttacaaggtegtacacattttctctcgaggatctgattttctgttctgttctgttttcccc
 ttttcaatgctgttgagaggatgtgaatagtttaatggatcagctcatataaaatttgaa
 ttaagtttgatgagaaaaataaacacacgattataatttaagcctttctttaaggagg
 tataactcatctttcaagaaaatcaaatcgccataagaactacacagagtagttctagctt
 tagtagttcggagtttagctttctagtttttttttggcttttgttatctcattaaattta
 aagtcaaagcagtcaccaatccaaggacgaagacaagcgggttgctccgagggcctccata
 acctccatctgcagttgccaaactgggtgagccaccgcagggtgacaaaagacacctccatg
 taacacagcatccaatcctctagggctacaacctgtggcatctgcaccatctgctgtgagg
 cttagtgaaggtttctcttaatttaattttactttttatttttaaaatttaactaaatttagt
 taaattaaaaatctgaccctttttaaaaataattcttttactcaatcaatatcttagtatta
 atataaaactatgcttttaaatgtgaaagtcagtgggctgaacctgcaaaggggaaaagt
 gatgggttaaaagtatacaatatgcatgtgggaaatcgtagcagttaaatcaccatcac
 catcaccatcatcatcaccatcaccatcaccatcatcaccatcaccatcaccacctcac
 cctcaccctcaccctcacactcaccctcaccctcaccctcaccatcatcattaccatcac
 cagtttgcctctggattctaggtatattaattttactgttctctatggttggttaggaga
 caatgtaacctctagctactgaaataacaagttgagtggtgcttggtgcctctccagaata
 tttaatgtctctcctggatgatagcaacaataacaatgtgtttaggtgcacgggaaatg
 gaccaggagcaccocaaaattcttatgagcagtgaaaaagaaaaacaaatgttcaaggagg
 agttcctctcctttccaaagccttcgtcagacttagcctttatttgcctgcctccagcca
 ctgaacattatgttgggaaaaatagatgctctgtctaatgtcccaatatttgggtatatttc
 acttccacttgataagcaaacaaatgcaatgaaagaacacaaagccattaatcttctctt
 aacaaaatatcaaatagattttccgaatcaaagagaagtccttgctgttggtatttttggga
 tttgatactatcttctccaaccacatgagcagaagagttatttcattttaaatagctctat
 gcaatgtatttgcgaagcttaggggaaaaaaagggggggggcagaagtggatgtagaag
 cttagggatgcttgagtcatagaacttctaccgatataaactagtcacaggtgaagaac
 cacacatttttgtgagagcaaatgtagatcaaggcctctatgttttatcaggggtgaggc
 ttctggtagatcgcatcaacgcaccacaggtaaagtatcaggcctcctgaatgttggtctc
 aggtctcagttctggaattgggttagtgcaacctgcagtcggggggcgcggggtgggggtggg
 gtaagtcacacagtgatgattactctctaatctctcttcagacagcgttctctctgtt
 tactcgagttacagttccttattctgcctacgggttgagccttgaggacacttttctacg
 tagctctctaaagtctcttattcttccaggagacattgtcacagtgcctgtcaacagtacg
 ggcggtcgctccagaagattaaaaattaaaacgataaactaccagagccacttttagatc
 aaatgggatttggaagtcagggtgcccattccagcgtgctacagtaagaaaccttcaaat
 gatcctaatatttgctatagaaaaggaaacgaggtcgggccggccaagcttaaggaattc
 gctagcatgcatgttaacggatccttaattaatgtacaggggtcccggtttaaacagtaacg
 ctagggtataacagggtaatataatcgagctgcaggattcgagggcccgccaggtcaatt
 ctaccgggtaggggagggcgttttcccaaggcagctctggagcatgcgctttagcagccc
 gctgggacttgggcgtacacaagtggcctctggcctcgacacattccacatccacggg
 tagggcccaaccgggtcgggtcttttgggtggcccttcgcgcacacttctactcctccct
 agtcagggaagttcccccccgcccgagctcgctcgtgcaggacgtgacaaatggaagt
 agcagctctcactagttctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtagg
 cctttggggcagcggccaatagcagctttgctccttcgctttctgggctcagaggctggg
 aaggggtgggtccgggggagggtcaggggcgggctcaggggcggggcgggcgccgaag
 gtctccggagggcccgcatcttgacgcttcaaaagcgacgtctgcgcgctgttctc
 ctcttctcatctccgggcttctgacctgcagccaatgcaccgtccttgccatcatggc
 ctctgtaacccggccatcaaacgcgctctgcttgcaccaggctgcgcgttctcgcgccca
 tagcaaccgcagtaacggcgttgccgctcgcggcgagcaagaagccacggaagtccgccc
 ggagcagaaaatgcccacgctactgcggtttatatagacggtccccacgggatggggaa
 aaccaccaccacgcaactgctgggtggccctgggttcgcgcgacgatctgctacgtacc
 cgagccgatgacttactggcggtgctgggggcttcgagacaatcggaacatctacac
 cacacaacaccgctcgaccagggtgagatatcgccggggacgcggcggtggtaatgac
 aagcgccagataacaatgggcatgccttatgccgtgaccgagccgttctggctcctca
 tatcgggggggaggtgggagctcacatgccccgccccggccctcaccctcatcttga
 ccgcatcccatcgccgctcctgtgctaccggcccgcgcggtaccttatgggcagcat
 gacccccaggcggtgctggcggttcgtggcctcatcccgccgaccttgccggcaccaa
 catcgtgcttggggcccttcgggaggacagacacatcgaccgctggccaaacggcagcg
 ccccggcgagcggctggacctggtatgctggctgcgattcgccgctttacgggctact

Fig. 12E

tgcgaatacgggtgcgggtatctgcagtgccggcgggtcggtggcggggaggactggggacagct
 ttccggggacggccgtgcgcggccaggggtgcgcagcggccagagcaacggggggccacgacc
 ccataatcggggacacgttatttaccctgtttcgggggcccgagttgctggcccccaacgg
 cgacctgtataacgtgtttgcctgggccttggacgtcttggccaaacgcctccgttccat
 gcacgtctttatccctggattacgaccaatgcgcgcgggtgcgggacgcctgctgca
 acttacctccgggatgggtccagacccacgtcaccaccccggtccataccgacgatatg
 cgacctggcgcgcacgtttgcccgggagatgggggaggctaactgaggggatcgatccgt
 cctgtaagtctgcagaaattgatgatctattaaacaataaagatgtccactaaaatggaa
 gtttttccctgtcatactttgttaagaagggtgagaacagagtagctacattttgaaatgga
 aggattggagctacgggggtgggggtgggggtgggattagataaatgcctgctctttactg
 aaggctctttactattgctttatgataatgtttcatagttggatatacataatttaaaaca
 gcaaaaccaaatttaagggccagctcattccctccactcatgatctatagatctatagatc
 tctcgtgggatcattgtttttctcttgattcccaactttgtggttctaagtactgtggttt
 ccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgttccacatacac
 ttcatctcagttattgttttgcgaagttctaattccatcagaagctgactctaggccgga
 cgcgcgggagcgcggcgagctccaattgcgcctatagttagtgcgtattacaattcactg
 gcctgcgtttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcggttaccacacttaatgcctt
 gcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgacccgatcgccct
 tcccaacagttgcgagcctgaatggcgaatgggacgcgcctctgtagcggcgcattaagc
 gcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccttagcgcgc
 gctcctttcgctttctcccttcccttctgcgcagcttgcgcggctttcccgctcaagct
 ctaaatcgggggctcccttttaggggtccgatattagtgtttacggcacctcgaccccaaa
 aaacttgatttaggggtgatgggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggtttttcgc
 cttttgacgttggagtcacagttcttttaatagtggactcttgttccaaactggaacaaca
 ctcaacctatctcgggtctattcttttgatttataagggattttgcccatttcggcctat
 tgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacg
 cttaacaatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttt
 tctaaatacatccaatatgtatccgtcatgagacaataaccctgataaatgcttcaat
 aatattgaaaaaggaagagtatgagttatcaacatttccgtgtgcgccttattccctttt
 ttgcggcattttgccttccgtgtttttgctcaccacagaaaacgctgggtgaaagttaaagatg
 ctgaagatcagttgggtgcacagagtggtttacatcgaaactggatctcaacagcggtaaga
 tccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgc
 tatgtggcgggtattatcccgatttgacgcggggcaagagcaactcggtcgccgcatac
 actattctcagaatgacttgggttagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatg
 gcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaacactgcggcca
 acttaactctgcacaacgatcggaggacccaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgg
 gggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaaacg
 acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacatttaactg
 gcgaactacttaactctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaag
 ttgcaggaccactctcgcgtcggcccttcgggctggctgggtttattgctgataaatctg
 gagccgggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccct
 cccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagac
 agatcgctgagataggtgcctcactgattaaagcattggtaactgtcagaccaagtttact
 catataacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaaga
 tcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgt
 cagaccccgtagaaaaagatcaaaggatcttcttgagatcccttttttctgcgcgtaatct
 gctgcttgcaaacaaaaaaaccacgcctaccagcgggtgggtttgtttgcccggatcaagagc
 taccactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtcc
 ttctagtgtagccgtagtttaggcccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacc
 tcgctctgcttaactctgtttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccg
 ggttggaactcaagacgatagttaccggataaaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggt
 cgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtg
 agctatgagaaagcgccacgcttccgaaggggagaaaggcggacaggtatccggtaagcg
 gcagggtcggaacaggagagcgcacaggggagcttccagggggaaacgcctggatcttt
 atagtcctgtcgggttttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgatgctcgtcag
 gggggcggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacgggttccctggcctttt
 gctggccttttgcctcacatgttctttcctgcgttatccctgattctgtggataaccgta

Fig. 12F

ttaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagt
cagtgagcggaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggc
cgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgca
acgcaattaatgtgagttagctcactcattagggaccccaggctttacactttatgcttc
cggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatg
accatgattacgccaagctcgaaattaaccctcactaaagggaacaaaagctgtcgagat
ctagatatcgatggccatag

Fig. 12G

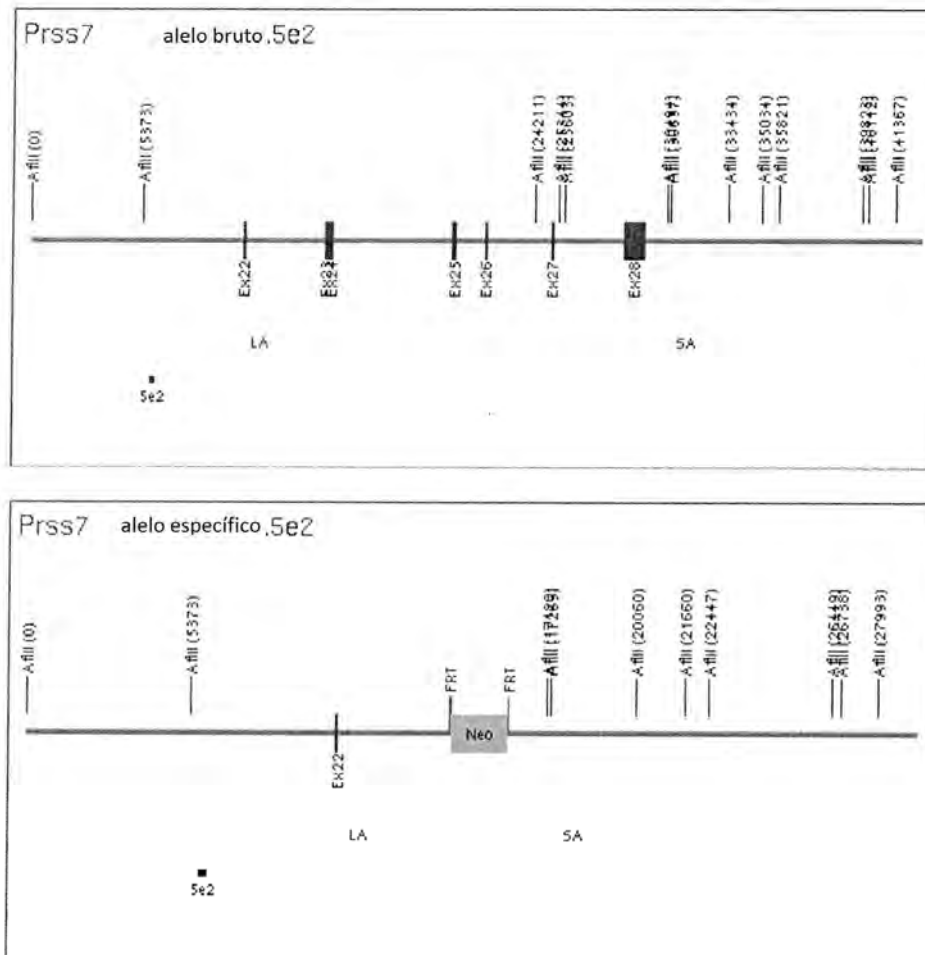


Fig. 13

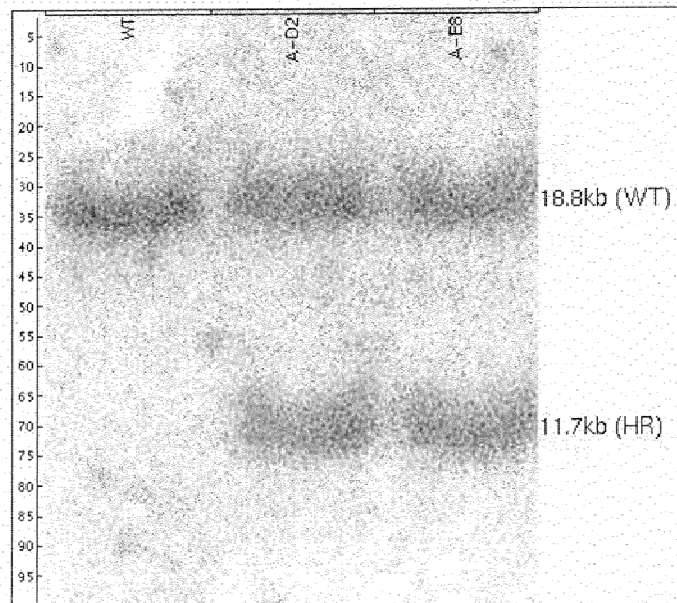


Fig. 14

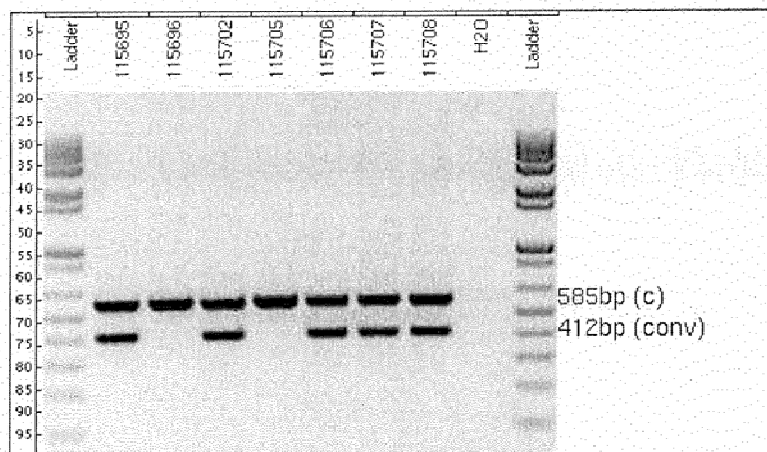


Fig. 15

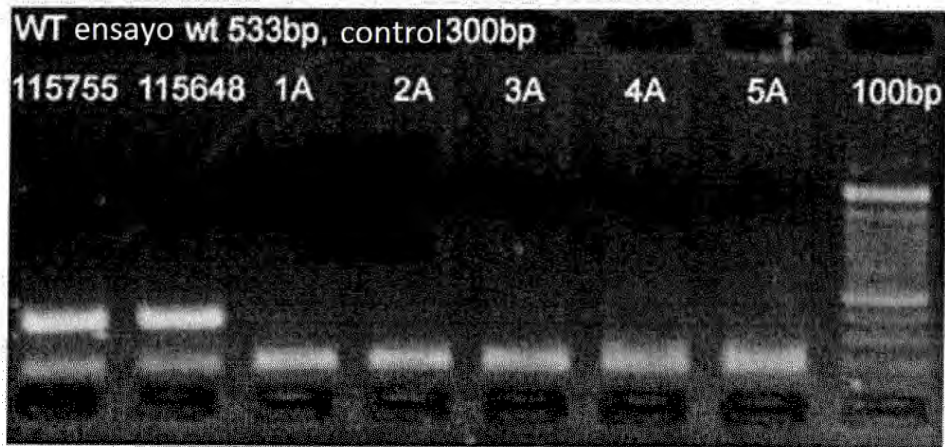


Fig. 16

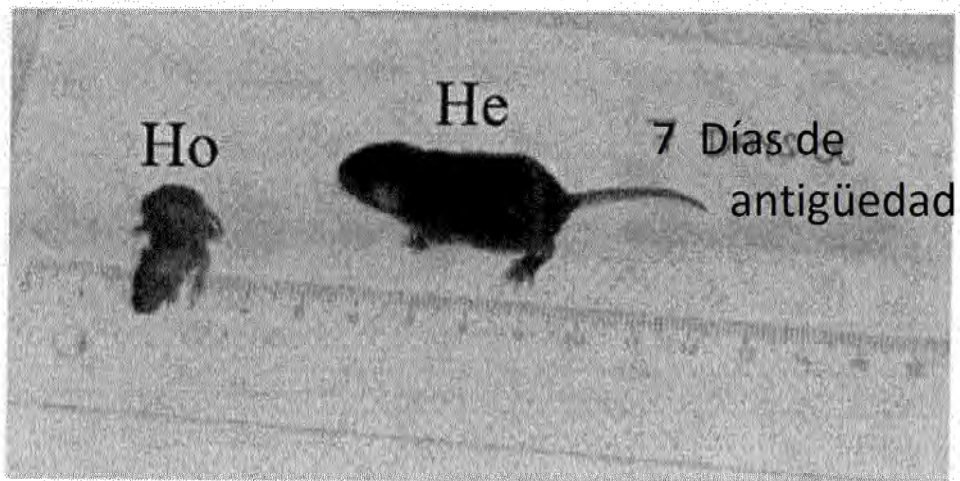


Fig. 17

ES 2 575 131 T3

accacc atg aat cca ctc ctg atc ctt acc ttt gtg gca gct gct ctt	48
Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu	
1 5 10	
gct gcc ccc ttt gat gat gat gac aag atc gtt ggg ggc tac aac tgt	96
Ala Ala Pro Phe Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Asn Cys	
15 20 25 30	
gag gag aat tct gtc ccc tac cag gtg tcc ctg aat tct ggc tac cac	144
Glu Glu Asn Ser Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His	
35 40 45	
ttc tgt ggt ggc tcc ctc atc aac gaa cag tgg gtg gta tca gca ggc	192
Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Glu Gln Trp Val Val Ser Ala Gly	
50 55 60	
cac tgc tac aag tcc cgc atc cag gtg aga ctg gga gag cac aac atc	240
His Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile	
65 70 75	
gaa gtc ctg gag ggg aat gag cag ttc atc aat gca gcc aag atc atc	288
Glu Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile	
80 85 90	
cgc cac ccc caa tac gac agg aag act ctg aac aat gac atc atg tta	336
Arg His Pro Gln Tyr Asp Arg Lys Thr Leu Asn Asn Asp Ile Met Leu	
95 100 105 110	
atc aag ctc tcc tca cgt gca gta atc aac gcc cgc gtg tcc acc atc	384
Ile Lys Leu Ser Ser Arg Ala Val Ile Asn Ala Arg Val Ser Thr Ile	
115 120 125	
tct ctg ccc acc gcc cct cca gcc act ggc acg aag tgc ctc atc tct	432
Ser Leu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Thr Gly Thr Lys Cys Leu Ile Ser	
130 135 140	
ggc tgg ggc aac act gcg agc tct ggc gcc gac tac cca gac gag ctg	480
Gly Trp Gly Asn Thr Ala Ser Ser Gly Ala Asp Tyr Pro Asp Glu Leu	
145 150 155	
cag tgc ctg gac gct cct gtg ctg agc cag gct aag tgt gaa gcc tcc	528
Gln Cys Leu Asp Ala Pro Val Leu Ser Gln Ala Lys Cys Glu Ala Ser	
160 165 170	
tac cct gga aag att acc agc aac atg ttc tgt gtg ggc ttc ctt gag	576
Tyr Pro Gly Lys Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Val Gly Phe Leu Glu	
175 180 185 190	
gga ggc aag gat tca tgt cag ggt gat tct ggt ggc cct gtg gtc tgc	624
Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys	
195 200 205	
aat gga cag ctc caa gga gtt gtc tcc tgg ggt gat ggc tgt gcc cag	672
Asn Gly Gln Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln	
210 215 220	

Fig. 18A

ES 2 575 131 T3

```

aag aac aag cct gga gtc tac acc aag gtc tac aac tat gtg aaa tgg      720
Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Tyr Asn Tyr Val Lys Trp
      225                      230                      235

att aag aac acc ata gct gcc aat agc taa agccccccagt atctcttcag      770
Ile Lys Asn Thr Ile Ala Ala Asn Ser
      240                      245

tctctataacc aataaagtga cctgtttctc      800

```

Fig. 18B