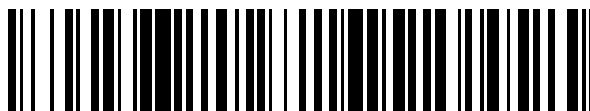


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 020**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01) G01N 33/53	(2006.01)
C07K 14/51	(2006.01) A01K 67/027	(2006.01)
C07K 14/495	(2006.01)	
C12N 15/63	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
C07K 16/22	(2006.01)	
C12Q 1/68	(2006.01)	
C12N 15/62	(2006.01)	
A61K 38/18	(2006.01)	
A61P 19/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.1999** **E 10008049 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** **EP 2261335**

54 Título: **Composiciones y métodos para incrementar la mineralización de la sustancia ósea**

30 Prioridad:

27.11.1998 US 110283 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

73 Titular/es:

UCB PHARMA S.A. (100.0%)
Allee de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

72 Inventor/es:

BRUNKOW, MARY E.;
GALAS, DAVID J.;
KOVACEVICH, BRIAN;
MULLIGAN, JOHN T.;
PAEPER, BRYAN W.;
VAN NESS, JEFFREY y
WINKLER, DAVID G.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 639 020 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para incrementar la mineralización de la sustancia ósea

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a productos y métodos farmacéuticos, y, más concretamente, a composiciones adecuados para incrementar el contenido mineral del hueso. Tales composiciones pueden ser utilizados para tratar una amplia variedad de afecciones, incluyendo por ejemplo, osteopenia, osteoporosis, fracturas y otros trastornos en los cuales la densidad mineral del hueso es un sello de la enfermedad.

Antecedentes de la invención

A lo largo de la vida se pueden producir dos o tres fases distintas de cambios para la masa ósea de un individuo (ver Riggs, West J. Med. 154:63-77, 1991). La primera fase se produce tanto en hombres como en mujeres, y prosigue hasta la consecución de una masa ósea pico. Esta primera fase se logra por medio del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondrales, y del crecimiento radial debido a una tasa de aposición perióstica. La segunda fase comienza alrededor de los 30 años para el hueso trabecular (huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y alrededor de los 40 años para el hueso cortical (p.ej., huesos largos encontrados en las extremidades) y continúa durante la edad adulta. Esta fase se caracteriza por una pérdida ósea lenta, y se produce tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, también se produce una tercera fase de pérdida de hueso, muy probablemente debido a las deficiencias de estrógenos post-menopáusicas. Solo durante esta fase, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular (ver Riggs, supra).

La pérdida de contenido mineral del hueso puede estar causada por una amplia variedad de afecciones, y puede producir problemas médicos significativos. Por ejemplo, la osteoporosis es una enfermedad debilitante en humanos caracterizada por descensos marcados de masa de hueso esquelético y densidad mineral, deterioro estructural del hueso incluyendo la degeneración de la microarquitectura ósea y los correspondientes incrementos de la fragilidad del hueso y la susceptibilidad a la fractura en los individuos afectados. La osteoporosis en humanos está precedida de osteopenia clínica (densidad mineral del hueso que es mayor de una desviación típica pero menor de 2,5 desviaciones típicas por debajo del valor medio para hueso adulto joven), un estado encontrado en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. Otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos han sido diagnosticados de osteoporosis clínica (definida como un contenido mineral del hueso mayor de 2,5 desviaciones típicas por debajo de la del hueso adulto joven maduro). La osteoporosis es una de las enfermedades más costosas para el sistema sanitario, costando decenas de millardos de dólares anualmente en los Estados Unidos. Además de los costes relacionados con el cuidado de la salud, el cuidado residencial a largo plazo y la pérdida de días de trabajo son añadidos a los costes financieros y sociales de esta enfermedad. En todo el mundo aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

La frecuencia de osteoporosis en la población humana aumenta con la edad, y entre los Caucásicos es predominante en las mujeres (que comprenden el 80% de la reserva de pacientes con osteoporosis en los Estados Unidos). El aumento de fragilidad y susceptibilidad a la fractura del hueso esquelético en las personas de edad se agrava por el mayor riesgo de caídas accidentales en esta población. Se ha informado sobre más de 1,5 millones de fracturas óseas relacionadas con la osteoporosis en los Estados Unidos cada año. Las caderas, muñecas, y vértebras fracturadas están entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de cadera en particular son extremadamente incómodas y costosas para el paciente, y para las mujeres se correlacionan con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad.

Aunque la osteoporosis ha sido definida como un incremento del riesgo de fractura debido a un descenso de la masa ósea, ninguno de los tratamientos disponibles en la actualidad para los trastornos óseos puede incrementar sustancialmente la densidad ósea de los adultos. Existe la percepción entre todos los médicos de que se necesitan fármacos que puedan incrementar la densidad ósea en adultos, particularmente en los huesos de la muñeca, la columna vertebral y la cadera que están en riesgo de osteopenia y osteoporosis.

Las estrategias actuales para la prevención de la osteoporosis pueden ofrecer algún beneficio pero no pueden asegurar la resolución de la enfermedad. Entre estas estrategias se incluyen la actividad física moderada (particularmente en actividades de soporte de pesos) con el inicio de la edad avanzada, incluyendo calcio adecuado en la dieta, y evitando el consumo de productos que contienen alcohol o tabaco. Para los pacientes que presentan osteopenia clínica u osteoporosis, todos los fármacos terapéuticos y estrategias actuales están dirigidos a reducir adicionalmente la pérdida de masa ósea inhibiendo el proceso de absorción ósea, un componente natural del proceso de remodelación ósea que se produce constitutivamente.

Por ejemplo, ahora se están prescribiendo estrógenos para retardar la pérdida de hueso. No obstante, hay cierta controversia sobre si existe un beneficio a largo plazo para los pacientes y si existe algún efecto en todos los pacientes de más de 75 años de edad. Por otra parte, se cree que el uso de estrógenos aumenta el riesgo de cáncer de mama o endometrio.

También se han sugerido dosis elevadas de calcio en la dieta, con o sin vitamina D para mujeres postmenopáusicas. No obstante, a menudo las dosis elevadas de calcio tienen efectos secundarios gastrointestinales desagradables, y los niveles de calcio en suero deben ser controlados continuamente (ver Khosla y Riggs, Mayo Clin. Proc. 70:978-982, 1995).

Entre otros agentes terapéuticos que han sido sugeridos se incluyen calcitonina, bifosfonatos, esteroides anabólicos y fluoruro de boro. Tales agentes terapéuticos sin embargo, tienen efectos secundarios no deseables (p.ej., la calcitonina y los esteroides pueden causar náuseas y provocar una reacción inmunitaria, los bifosfonatos y el fluoruro de sodio pueden inhibir la reparación de las fracturas, incluso aunque la densidad ósea aumente moderadamente) que pueden evitar su uso (ver Khosla y Riggs, supra).

Ninguna estrategia terapéutica puesta en práctica en la actualidad implica un fármaco que estimule o intensifique el crecimiento de nueva masa ósea. La presente invención proporciona composiciones que pueden ser utilizadas para incrementar la mineralización ósea, y de este modo pueden ser utilizadas para tratar una amplia variedad de afecciones en las que se desea incrementar la masa ósea. Adicionalmente, la presente invención proporciona otras ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

Como se ha indicado más arriba, la presente proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una proteína codificada por el SEQ ID NO. 1.

Dentro de un aspecto de la presente descripción, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas, en donde dichas moléculas de ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) una molécula de ácido nucleico aislada que comprende los ID de secuencia NO: 1, 5, 7, 9, 11, 13, o 15, o una secuencia complementaria de los mismos;

(b) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida específicamente con la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones muy restrictivas; y

(c) un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión a TGF-beta de acuerdo con (a) o (b);

Dentro de los aspectos relacionados de la presente descripción, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas basadas en la hibridación a una porción solamente de una de las secuencias identificadas antes (p.ej., para (a) la hibridación puede ser con una sonda de al menos 20, 25, 50 o 100 nucleótidos seleccionados entre los nucleótidos 156 a 539 o 555 a 687 del ID de secuencia NO. 1). Como debe resultar fácilmente evidente, las condiciones restrictivas necesarias que se van a utilizar para la hibridación pueden variar basándose en el tamaño de la sonda. Por ejemplo, para una sonda de 25-meros entre las condiciones muy restrictivas se podrían incluir Tris 60 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, 5x solución de Denhardt, 6x SSC, N-laurilsarcosina al 0,1% (p/v), NP-40 al 0,5% (p/v) (nonidet P-40) durante la noche a 45 grados centígrados, seguido de dos lavados con 0,2x SSC/SDS al 0,1% a 45-50 grados. Para una sonda de 100-meros en condiciones poco restrictivas, entre las condiciones adecuadas se podrían incluir las siguientes: 5x SSPE, 5x Denhardt y SDS al 0,5% durante la noche a 42-50 grados, seguido de dos lavados con 2x SSPE (o 2x SSC)/SDS al 0,1% a 42-50 grados.

Dentro de aspectos relacionados de la presente descripción, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen homología con los ID de Secuencia Núm. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, a un nivel de homología del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o 98% utilizando un algoritmo de Wibur-Lipman. Entre los ejemplos representativos de tales moléculas de ácido nucleico aisladas se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que comprende los ID de Secuencia Núm. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, o tienen homología con estas secuencias a un nivel del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, o 98% de nivel de homología utilizando un algoritmo de Lipman-Pearson.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas tienen típicamente un tamaño de menos de 100 kb, y en ciertas realizaciones, menos de 50 kb, 25 kb, 10 kb, o incluso 5 kb de tamaño. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas, en otras realizaciones, no existen en una "genoteca" de otras moléculas de ácido nucleico no relacionado (p.ej., un subclon BAC tal como se describe en el Núm. de Acceso de GenBank AC003098 y el Núm. EMB AQ171546). No obstante, las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser encontradas en genotecas de moléculas relacionadas (p.ej., para transposición genética, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.837.458, 5.830.721; y 5.811.238). Finalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas como se describen en la presente memoria no incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (Patente de los Estados Unidos Núm.

5.780.263).

También son proporcionados por la presente descripción vectores de clonación que contienen las moléculas de ácido nucleico indicadas antes, y vectores de expresión que comprenden un promotor (p.ej., una secuencia reguladora) conectada operablemente a una de las moléculas de ácido nucleico indicada antes. Entre los ejemplos representativos de los promotores adecuados se incluyen promotores específicos de tejidos, y promotores basados en virus (p.ej., promotores basados en CMV tales como 1-E de CMV, el promotor temprano de SV40, y LTR de MuLV). Los vectores de expresión también pueden estar basados en, o derivados de virus (p.ej., un "vector viral"). Entre los ejemplos representativos de los vectores virales se incluyen los vectores virales del herpes simplex, los vectores adenovirales, los vectores virales asociados con adenovirus y los vectores retrovirales. También son proporcionadas por la descripción células anfitrionas que contienen cualquiera de los vectores indicados antes (incluyendo por ejemplo, células anfitrionas de origen humano, de mono, de perro, de rata, o de ratón).

En otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan métodos de producción de proteínas de unión a TGF-beta, que comprenden la etapa de cultivar la célula anfitriona anteriormente mencionada que contiene el vector en unas condiciones y durante un tiempo suficiente para producir la proteína de unión a TGF-beta. En realizaciones adicionales de la descripción, la proteína producida mediante estos métodos puede ser purificada adicionalmente (p.ej., mediante cromatografía en columna, purificación de afinidad, y similares). Por tanto, las proteínas aisladas que son codificadas por las moléculas de ácido nucleico indicadas antes (p.ej., Secuencias de ID Núm. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16) pueden ser fácilmente producidas dada la descripción de la solicitud sujeto.

También se debe observar que las proteínas mencionadas antes, o fragmentos de las mismas, pueden ser producidas como proteínas de fusión. Por ejemplo, en un aspecto de la descripción se proporcionan proteínas de fusión que comprenden un primer segmento polipeptídico de una proteína de unión a TGF-beta codificada por una molécula de ácido nucleico como se ha descrito antes, o una porción de la misma de al menos 10, 20, 30, 50, o 100 aminoácidos de longitud, y un segundo segmento polipeptídico que comprende una proteína que no es de unión a TGF-beta. El segundo polipéptido puede ser una etiqueta adecuada para la purificación o el reconocimiento (p.ej., un polipéptido que comprende múltiples restos aminoácido aniónicos - ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.851.341), un marcador (p.ej., la proteína verde fluorescente, o la fosfatasa alcalina), o una molécula tóxica (p.ej., ricina).

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de los mismos que son capaces de unirse específicamente a una proteína codificada por el SEQ ID NO. 1.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal (p.ej. de origen humano o murino). En realizaciones adicionales el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo que conserva las características de unión de un anticuerpo completo (p.ej., un fragmento F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, o Fv, o incluso una CDR). Asimismo se proporcionan hibridomas y otras células que son capaces de producir o expresar los anticuerpos anteriormente mencionados.

En aspectos relacionados de la invención, se proporcionan métodos que detectan una proteína de unión a TGF-beta, que comprenden las etapas de incubar un anticuerpo como se ha descrito antes en unas condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a una proteína de unión a TGF-beta, y detectar la unión. En varias realizaciones el anticuerpo puede ser unido a un soporte sólido para facilitar el lavado o la separación, y/o marcado (p.ej., con un marcador seleccionado del grupo formado por las enzimas, las proteínas fluorescentes, y los radioisótopos).

En otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan oligonucleótidos aislados que hibridan con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con los ID de Secuencia NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 0 18 o su complemento, en condiciones muy restrictivas. En realizaciones adicionales de la descripción, el oligonucleótido puede ser encontrado en la secuencia que codifica los ID de Secuencia NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. En ciertas realizaciones de la descripción, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 15, 20, 30, 50, o 100 nucleótidos. En realizaciones adicionales de la descripción, el oligonucleótido está marcado con otra molécula (p.ej., una enzima, molécula fluorescente, o radioisótopo). Asimismo se proporcionan por la descripción, cebadores que son capaces de amplificar específicamente toda o una porción de las moléculas de ácido nucleico mencionadas antes que codifican proteínas de unión de TGF-beta. Según se utiliza en la presente memoria, se debe entender que el término "amplificar específicamente" hace referencia a cebadores que amplifican las proteínas de unión a TGF-betas mencionadas antes, y no otras proteínas de unión a TGF-beta tales como Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (patente de los Estados Unidos Núm. 5.780.263).

En aspectos relacionados de la presente descripción, se proporcionan métodos para detectar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta, que comprende las etapas de incubar un oligonucleótido como se ha descrito antes en condiciones muy restrictivas, y detectar la hibridación de dicho oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede estar marcado y/o

unido a un soporte sólido.

En otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan ribozimas que son capaces de escindir ARN que codifica una de las proteínas de unión a TGF-beta (p.ej. ID de Secuencia NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14, o 16). Tales ribozimas pueden estar compuestas por ADN, ARN (incluyendo ácidos 2'-O-metilribonucleicos), análogos de ácido nucleico (p.ej., ácidos nucleicos que tienen enlaces fosforotioato) o mezclas de los mismos. Asimismo se proporcionan por la descripción moléculas de ácido nucleico (p.ej., ADN o ADNc) que codifican estas ribozimas, y vectores que son capaces de expresar o producir las ribozimas. Entre los ejemplos representativos de los vectores se incluyen plásmidos, retrotransposones, cósmidos, y vectores basados en virus (p.ej., vectores virales generados al menos en parte a partir de un retrovirus, adenovirus, o virus adeno-asociado). También se proporcionan por la descripción células anfitrionas (p.ej., células humanas, de perro, de rata o de ratón) que contienen estos vectores. En ciertas realizaciones, la célula anfitriona puede ser transformada establemente con el vector.

En aspectos adicionales de la descripción, se proporcionan métodos para producir ribozimas o bien sintéticamente, o bien mediante transcripción in vitro o in vivo. En realizaciones adicionales de la descripción, las ribozimas así producidas pueden ser purificadas adicionalmente y/o formuladas en composiciones farmacéuticas (p.ej., la ribozima o la molécula de ácido nucleico que codifica la ribozima junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable). De un modo similar, los oligonucleótidos antisentido y los anticuerpos u otras moléculas seleccionadas descritas en la presente memoria pueden ser formuladas en composiciones farmacéuticas.

En otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan oligonucleótidos antisentido que comprenden una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con los SEC ID Núm. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o 15, o el complemento de esta, y donde dicho oligonucleótido inhibe la expresión de la proteína de unión a TGF-beta como se describe en la presente memoria (p.ej., BEER humana). En diversos aspectos, el oligonucleótido tiene una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50 nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene menos de 100, 75 o 60 nucleótidos de longitud. Como debe resultar fácilmente evidente, el oligonucleótido puede constar de uno o más análogos de ácido nucleico, ácidos ribonucleicos, o ácidos desoxirribonucleicos. Adicionalmente, el oligonucleótido puede ser modificado por uno o más enlaces, incluyendo por ejemplo, enlaces covalentes tales como un enlace fosforotioato, un enlace fosfotriéster, un enlace metilfosfonato, un enlace metilen(imino), un enlace morfolino, un enlace amido, un enlace poliamido, un enlace interazúcar alquílico de cadena corta, un enlace interazúcar cicloalquílico, un enlace interazúcar heteroatómico de cadena corta y un enlace interazúcar heterocíclico. Un ejemplo representativo de un oligonucleótido quimérico es proporcionado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.912.

En otro aspecto más de la presente descripción, se proporcionan métodos para incrementar la mineralización ósea, que comprenden introducir en un animal de sangre caliente una cantidad eficaz de la ribozima en el animal. En aspectos relacionados, tales métodos comprenden la etapa de introducir en un paciente una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico o vector descritos en la presente memoria que es capaz de producir la ribozima deseada, en condiciones que favorecen la transcripción de la molécula de ácido nucleico para producir la ribozima.

En otros aspectos de la descripción se proporcionan animales no humanos, transgénicos. En una realización de la descripción se proporciona un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta donde el ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID Núm. 1, 3, 5, 9, 11, 13 o 15 antes que está conectada operablemente a un promotor efectivo para la expresión del gen, siendo introducido el gen en el animal, o ancestro del animal, en una fase embrionaria, con la condición de que dicho animal no sea humano. En otras realizaciones, se proporcionan animales modificados genéticamente transgénicos, que comprenden un animal cuyas células germinales y células somáticas comprenden una desorganización de al menos un alelo de una molécula de ácido nucleico endógena que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a TGF-beta donde el ácido nucleico endógeno es un ácido nucleico que comprende la SEC IND NO. 1, 5, 9, 11, 13 or 15, donde la desorganización evita la transcripción del ARN mensajero a partir de dicho alelo en comparación con un animal sin la desorganización, con la condición de que el animal no sea un humano. En varias realizaciones, la desorganización es una delección, sustitución o inserción en el ácido nucleico. En otras realizaciones el animal transgénico es un ratón, rata, oveja, cerdo o perro.

En aspectos adicionales de la descripción, se proporcionan kits para la detección de la expresión de la proteína de unión a TGF-beta, que comprenden un recipiente que comprende una molécula de ácido nucleico, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por (a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de los SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a); (c) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (a) o (b) de al menos 15, 20, 30, 50, 75, o 100 nucleótidos de longitud. Asimismo son proporcionados por la invención kits para la detección de una

proteína de unión a TGF-beta que comprenden un recipiente que comprende uno de los anticuerpos para la proteína de unión a TGF-beta descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, en un aspecto de la presente descripción se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una o más moléculas candidato con la proteína de unión a TGF-beta codificada por la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta (*p.ej.*, BMP 5 o 6), (b) determinar si la molécula candidato altera la señalización del miembro de la familia del TGF-beta, altera o unión de la proteína de unión a TGF-beta al miembro de la familia del TGF-beta. En ciertas realizaciones de la descripción, la molécula altera la capacidad de TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima. En este aspecto de la presente descripción, la molécula o las moléculas candidato pueden alterar la señalización o la unión, por ejemplo, disminuyendo (*p.ej.*, inhibiendo), o incrementando (*p.ej.*, intensificando) la señalización o la unión.

En otro aspecto más de la siguiente descripción, se proporcionan los métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo la etapa de determinar si una molécula seleccionada inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta al hueso, o un análogo de la misma. Entre los ejemplos representativos de hueso o de los análogos del mismo se incluyen hidroxiapatita y muestras de hueso humano primario obtenidas mediante biopsia.

En ciertas realizaciones de los métodos citados antes, de la descripción, la molécula seleccionada está contenida en una mezcla de moléculas y los métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de aislar una o más moléculas que son funcionales en el análisis. En otras realizaciones más de la descripción, la familia de proteínas del TGF-beta está unida a un soporte sólido y se mide la unión de la proteína de unión a TGF-beta o las proteínas de unión a TGF-beta están unidas a un soporte sólido y se mide la unión de las proteínas de unión a TGF-beta.

Utilizando métodos tales como los divulgados antes, se pueden analizar una amplia variedad de moléculas en cuanto a su capacidad para incrementar el contenido mineral del hueso inhibiendo la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de las proteínas de TGF-beta. Entre los ejemplos representativos de tales moléculas se incluyen proteínas o péptidos, moléculas orgánicas, y moléculas de ácido nucleico.

En otros aspectos relacionados la descripción se proporcionan métodos para aumentar el contenido mineral del hueso en un animal de sangre caliente, que comprende la etapa de administrar a un animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula identificada a partir de los análisis citados en la presente memoria. Se describen métodos para aumentar el contenido mineral de hueso en un animal de sangre caliente, que comprende la etapa de administrar a un animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la superfamilia de proteínas de TGF-beta incluyendo la superfamilia de proteínas de TGF-beta, incluyendo las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Los ejemplos representativos de las moléculas adecuadas incluyen moléculas antisentido, ribozimas, genes de ribozimas y anticuerpos (*p.ej.*, un anticuerpo humanizado) que reconocen específicamente y alteran la actividad de la proteína de unión a TGF-beta.

Se describen métodos para aumentar el contenido mineral de hueso en un animal de sangre caliente, que comprenden las etapas de (a) introducir en las células que anidan en el hueso un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y proteínas morfogénicas del hueso (BMP), y (b) administrar las células que contienen el vector a un animal de sangre caliente. Según se utiliza en la presente memoria, se debe entender que las "células anidan en el hueso" si localizan la matriz del hueso después de la administración periférica. Tales métodos pueden comprender adicionalmente, antes de la etapa de introducción, el aislamiento de células de la médula del hueso que anidan en el hueso. Las células que anidan en el hueso se pueden seleccionar del grupo formado por las células CD34+ y los osteoblastos.

En otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan moléculas (preferiblemente aisladas) que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la súper-familia de proteínas del TGF-beta.

Las moléculas pueden ser proporcionadas en forma de una composición, y pueden comprender adicionalmente un inhibidor de la resorción ósea. Entre los ejemplos representativos de tales inhibidores se incluyen calcitonina, estrógeno, un bisfosfonato, un factor de crecimiento que tenga actividad anti-resorción y tamoxifeno.

Entre los ejemplos representativos de las moléculas que pueden ser utilizadas en los contextos terapéuticos anteriormente mencionados se incluyen, anticuerpos (*p.ej.*, anticuerpos humanizados). Tales moléculas pueden ser utilizadas, dependiendo de su selección, para alterar, ejercer un efecto antagónico

o ejercer un efecto agonístico de la señalización o la unión de un miembro de la familia de proteínas de unión a TGF-beta como se ha descrito en la presente memoria.

Las moléculas y los métodos de tratamiento o prevención descritos anteriormente pueden ser utilizados en afecciones tales como osteoporosis, osteomalasia, enfermedad periodontal, escorbuto, enfermedad de Cushing, fractura de huesos y afecciones debidas a la inmovilización de miembros y uso de esteroides. Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Además, se muestran en la presente memoria diversas referencias que describen con más detalle ciertos procedimientos o composiciones (p.ej., plásmidos, etc.), y por lo tanto se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática que compara la secuencia de aminoácidos de Dan Humana; Gremlin Humana; Cerberus Humana y Beer Humana. Las flechas indican el esqueleto de Cisteína.

La Figura 2 resume los resultados obtenidos partir de la inspección de una variedad de tejidos humanos para la expresión de un gen de la proteína de unión a TGF-beta, específicamente, el gen Beer Humano. Se utilizó un procedimiento de transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa semi-cuantitativo (RT-PCR) para amplificar una porción del gen de ADNc de la primera hebra sintetizada a partir del ARN total (descrito con más detalle en el EJEMPLO 2A).

La Figura 3 resume los resultados obtenidos a partir del ARN la hibridación in situ de secciones de embrión de ratón, utilizando una sonda de ARNc que es complementaria al transcrito Beer de ratón (descrito con más detalle en el EJEMPLO 2B). El panel A es una sección transversal de embriones de 10,5 dpc. El panel B es una sección sagital de embriones de 12,5 dpc y los paneles C y D son secciones sagitales de embriones de 15,5 dpc.

La Figura 4 ilustra, mediante análisis de transferencia western, la especificidad de tres anticuerpos policlonales diferentes para sus respectivos antígenos (descrito con más detalle en el EJEMPLO 4). La Figura 4A muestra la reactividad específica de un anticuerpo anti-H. Beer para el antígeno H. Beer, pero no H. Dan o H. Gremlin. La Figura 4B muestra la reactividad de un anticuerpo anti-H. Gremlin para el antígeno H. Gremlin, pero no H. Beer o H. Dan. La Figura 4C muestra la reactividad de un anticuerpo anti-H. Dan para H. Dan, pero no para H. Beer o H. Gremlin.

La Figura 5 ilustra, mediante análisis de transferencia western, la selectividad de la proteína de unión a TGF-beta, Beer, para BMP-5 y BMP-6, pero no BMP-4 (descrito con más detalle en el EJEMPLO 5).

La Figura 6 demuestra que la interacción iónica entre la proteína de unión a TGF-beta, Beer, y BMP-5 tiene una constante de disociación en el intervalo de 15-30 nM.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de exponer la invención con detalle, puede servir de ayuda para la comprensión de la misma mostrar las definiciones de ciertos términos y enumerar y definir las abreviaturas que se utilizarán más adelante.

Se debe entender que "molécula" incluye proteínas o péptidos (p.ej., anticuerpos, pares de unión recombinantes, péptidos con una afinidad de unión deseada), ácidos nucleicos (p.ej., ADN, ARN, moléculas de ácido nucleico quiméricas, y análogos de ácidos nucleicos tales como PNA); y compuestos orgánicos e inorgánicos.

Se debe entender que "TGF-beta" incluye cualquier miembro conocido o novedoso de la súper-familia del TGF-beta, lo que también incluye las proteínas morfogénicas del hueso (BMP).

Se debe entender que "receptor del TGF-beta" hace referencia al receptor específico para un miembro concreto de la super-familia del TGF-beta (incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)).

Se debe entender que "proteína de unión a TGF-beta" hace referencia a una proteína con una afinidad de unión específica para un miembro concreto o subgrupo de miembros de la super-familia del TGF-beta (incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)). Entre los ejemplos específicos de las proteínas de unión a TGF-beta se incluyen las proteínas codificadas por los ID de Secuencia Núm. 1, 5, 7, 9, 11, 13 y 15.

Se debe entender que "la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)" hace referencia a moléculas que permiten la activación de TGF-beta o proteínas morfogénicas del hueso (BMP), o permiten la unión de miembros de la familia del TGF-beta incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP) a sus respectivos receptores,

separando o evitando la unión del TGF-beta con la proteína de unión a TGF-beta. Semejante inhibición puede ser completada, por ejemplo, mediante moléculas que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a miembros específicos de la súper-familia del TGF-beta.

"Vector" hace referencia a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la proteína deseada. El vector debe incluir elementos promotores transcripcionales que estén conectados operablemente al gen o los genes de interés. El vector puede constar de ácidos desoxirribonucleicos ("ADN"), ácidos ribonucleicos ("ARN"), o una combinación de los dos (p.ej. quimérico de ADN-ARN). Opcionalmente, el vector puede incluir una secuencia de poliadenilación, uno o más sitios de restricción, así como uno o más marcadores seleccionables tales como neomicina-fosfotransferasa o higromicina-fosfotransferasa. Adicionalmente, dependiendo de la célula anfitriona elegida y del vector empleado, también se pueden incorporar otros elementos genéticos tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ácidos nucleicos adicionales, intensificadores, secuencias que confieran inducibilidad de transcripción, y también se pueden incorporar marcadores seleccionables en los vectores descritos en la presente memoria.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína de unión a TGF que ha sido separada del ADN genómico de una célula eucariótica es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma del organismo. La molécula de ácido nucleico aislada puede ser de ADN genómico, ADNc, ARN, o constar de al menos una parte de análogos de ácido nucleico.

Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. En ciertas realizaciones, una separación de proteínas concreta contiene un polipéptido aislado si éste aparece nominalmente como una única banda sobre el gel de SDS-PAGE con tinción de Azul Coomassie. "Aislado" cuando se refiere a moléculas orgánicas significa que los compuestos son puros en más del 90 por ciento utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica (p.ej., RMN, punto de fusión).

"Esclerosteosis". Esclerosteosis es un término que fue aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose. En: Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlín: Springer (pub.) 6 1967. págs. 351-355) a un trastorno similar a hiperostosis cortical generalizada de van Buchem pero posiblemente difiriendo en la apariencia radiológica de los cambios del hueso y en la presencia de sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos. La mandíbula tiene una apariencia inusualmente cuadrada en esta afección.

Los "anticuerpos humanizados" son proteínas recombinantes en las cuales las regiones determinantes de la complementariedad de ratón de los anticuerpos monoclonales han sido transferidas de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano.

Según se utiliza en la presente memoria, un "fragmento de anticuerpo" es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', y similar. Sin tener en cuenta la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo monoclonal para la proteína de unión a TGF-beta se une con un epítipo de la proteína de unión a TGF-beta.

El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o diseñada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen fragmentos aislados que constan de la región variable de la cadena ligera, fragmentos "Fv" que constan de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas polipeptídicas de una única cadena recombinante en las cuales las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un conector peptídico ("proteínas sFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que constan de los restos aminoácido que imitan la región hipervariable.

Una "marca detectable" es una molécula o átomo que puede ser conjugada con un radical de un anticuerpo para producir una molécula útil para la diagnosis. Entre los ejemplos de las marcas se incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos, enzimas, y otros radicales marcadores.

Según se utiliza en la presente memoria, un "producto inmunoconjugado" es una molécula que comprende un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta, o un fragmento de anticuerpo, y una marca detectable. Un producto inmunoconjugado tiene más o menos la misma capacidad, o una capacidad solo ligeramente reducida para unirse a la proteína de unión a TGF-beta después de la conjugación que antes de la conjugación.

Abreviaturas: TGF-beta - "Factor de Crecimiento Transformante-beta"; TGF-bBP - "Proteína de unión al Factor de Crecimiento Transformante-beta" (una TGF-bBP representativa se denomina "H. Beer"); BMP - "proteína morfogénica del hueso"; PCR - "reacción en cadena de la polimerasa"; RT-PCR - procedimiento de PCR en el cual el ARN es transcrito primero a ADN en la primera etapa utilizando la transcriptasa inversa (RT); ADNc - cualquier ADN elaborado copiando una secuencia de ARN en forma de ADN.

Como se ha indicado antes, la presente descripción proporciona una clase novedosa de proteínas de unión a TGF-beta, así como medicamentos y composiciones para incrementar el contenido mineral del hueso en animales de sangre caliente. Brevemente, las presentes descripciones se basan en el descubrimiento inesperado de que una mutación en el gen que codifica un miembro novedoso de la familia de las proteínas de unión a TGF-beta produce una rara afección (esclerosteosis) caracterizada por contenidos minerales de los huesos que son una a cuatro veces superiores que en individuos normales. De este modo, como se discute con más detalle más abajo este descubrimiento ha conducido al desarrollo de análisis que pueden ser utilizados para seleccionar moléculas que inhiben la unión de la proteína del unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y las proteínas morfogénica del hueso (BMP), y tales moléculas para su uso para incrementar el contenido de material óseo de animales de sangre caliente (incluyendo por ejemplo, seres humanos).

Estudio de la enfermedad conocida como esclerosteosis

Esclerosteosis es un término que fue aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose. Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlín: Springer (pub.) 6 1967. págs. 351-355) a un trastorno similar a la hiperostosis cortical generalizada de van Buchem pero posiblemente difiriendo en la apariencia radiológica de los cambios del hueso y en la presencia de sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos.

Se sabe ahora que la esclerosteosis es una alteración semi-dominante autosómica que está caracterizada por lesiones escleróticas ampliamente diseminadas del hueso en el adulto. La afección es progresiva. La esclerosteosis también tiene un aspecto evolutivo que está asociado con la sindactilia (dos o más dedos están juntos). El Síndrome de Esclerosteosis está asociado con una gran estatura y muchos individuos afectados alcanzan una altura de uno con ochenta y tres metros (seis pies) o más. El contenido mineral del hueso de los homocigotos puede ser de 1 a 6 veces por encima de los individuos normales y la densidad mineral del hueso puede ser de 1 a 4 veces por encima de los valores normales (p.ej., de hermanos no gemelos).

El Síndrome de Esclerosteosis se produce principalmente en Afrikaners de descendencia Alemana en Sudáfrica. Aproximadamente 1/140 individuos de la población Afrikaner son portadores del gen mutado (heterocigotos). La mutación muestra una penetrancia del 100%. Existen informes anecdóticos de aumento de la densidad mineral del hueso en heterocigotos con patologías no asociadas (sindactilia o sobrecrecimiento de la cabeza ósea).

En la actualidad parece que no hay anomalía del eje de la pituitaria-hipotálamo en la Esclerosteosis. En particular, no parece haber sobre-producción de la hormona del crecimiento ni de la cortisona. Además, los niveles de hormonas sexuales son normales en los individuos afectados. No obstante, los marcadores de recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, péptido C' de procolágeno de tipo I (PICP), y fosfatasa alcalina total, (ver Comier, C., Curr. Opin. In Rheu. 7:243, 1995) indican que existe actividad hiperosteoblástica asociada con la enfermedad pero que hay una actividad osteoclástica normal a débilmente disminuida medida mediante marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinaria, fosfatasas ácidas resistentes al ácido en plasma y galactosilhidroxilisina (ver Coomier, supra)).

La esclerosteosis se caracteriza por el depósito continuo de hueso a lo largo de todo el esqueleto durante la vida de los individuos afectados. En homocigotos el depósito continuo de mineral del hueso conduce a un sobrecrecimiento del hueso en las áreas del esqueleto en las que hay una ausencia de mecanorreceptores (cabeza ósea, mandíbula, cráneo). En homocigotos con Esclerosteosis, el sobrecrecimiento de los huesos de la cabeza ósea conduce a una compresión craneal y eventualmente a la muerte debido a una presión hidrostática excesiva sobre el tallo encefálico. En todas las demás partes del esqueleto existe una esclerosis generalizada y difusa. Las áreas corticales de los huesos largos están enormemente engrosadas dando como resultado un incremento sustancial en la resistencia del hueso. Las conexiones trabeculares tienen un grosor incrementado que a su vez aumenta la fuerza del hueso trabecular. Los huesos escleróticos aparecen normalmente opacos a los rayos x.

Como se describe con más detalle en el Ejemplo 1, la rara mutación genética que es responsable del Síndrome de Esclerosteosis ha sido localizada hacia la región del cromosoma humano 17 que codifica un miembro novedoso de la familia de las proteínas de unión a TGF-beta (un ejemplo representativo del cual es denominado "H. Beer"). Como se describe con más detalle más abajo, basándose en este descubrimiento, el mecanismo de mineralización ósea se comprende más completamente, permitiendo el

desarrollo de análisis para moléculas que incrementan la mineralización ósea, y el uso de tales moléculas para incrementar el contenido mineral del hueso, y en el tratamiento o la prevención de un amplio número de enfermedades.

5 Superfamilia de TGF-beta

La súper-familia del Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de la secuencia comunes y unidades estructurales (a los niveles tanto secundarios como terciarios). Se sabe que esta familia de proteínas ejerce un amplio espectro de respuestas biológicas sobre una gran variedad de tipos celulares. Muchas de ellas tienen importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y la especificación de tejidos; en adultos, están implicadas, p.ej., en la curación de heridas y la reparación ósea y la remodelación ósea, y en la modulación del sistema inmunitario. Además de los tres TGF-beta, en la súper-familia se incluyen las Proteínas Morfogénicas del Hueso (BMP), Activinas, Inhibinas, Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF), y Factores Neurotróficos Derivados de la Glía. La clasificación primaria es establecida por medio de rasgos de la secuencia general que vinculan una proteína específica a una sub-familia general. La estratificación adicional dentro de la sub-familia es posible debido a una conservación de la secuencia más estricta entre los miembros de un grupo más pequeño. En ciertos casos, tales como BMP-5, BMP-6 y BMP-7, esta puede ser tan elevada como el 75 por ciento de homología de aminoácidos entre los miembros del grupo más pequeño. Este nivel de identidad permite que una única secuencia representativa ilustre los elementos bioquímicos clave del sub-grupo que la separa de los otros miembros de la familia más grande.

El TGF-beta señala induciendo la formación de complejos hetero-oligoméricos de los receptores tipo I y de tipo II. La estructura cristalina del TGF-beta2 ha sido determinada. El plegado general del monómero de TGF-beta2 contiene una estructura de tipo nudo de cisteína, compacto, estable formado por tres puentes disulfuro. La dimerización, estabilizada por un puente disulfuro, es antiparalela.

Los miembros de la familia del TGF-beta inician su acción celular uniéndose a receptores con una actividad serina/treonina quinasa intrínseca. Esta familia de receptores consta de dos subfamilias, denominadas receptores de tipo I y de tipo II. Cada miembro de la familia del TGF-beta se une a una combinación característica de receptores de tipo I y de tipo II, ambos los cuales son necesarios para la señalización. En el modelo actual para la activación del TGF-beta, el TGF-beta se une primero al receptor de tipo II (TbR-II), que aparece en la membrana celular en una forma oligomérica con quinasa activada. Después de eso, el receptor de tipo I (TbR-I), que no puede unirse al ligando en ausencia de TbR-II, es reclutado en el complejo. Después TbR-II fosforila TbR-I predominantemente en un dominio rico en restos glicina y serina (dominio GS) en la región de la yuxtamembrana, y de ese modo activa TbR-I.

Hasta ahora se han identificado siete receptores de tipo I y cinco receptores de tipo II.

Las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) son proteínas reguladoras clave en la determinación de la densidad mineral del hueso en seres humanos

Un avance principal en la comprensión de la formación de hueso fue la identificación de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP), también conocidas como proteínas osteogénicas (OP), que regulan la diferenciación del cartílago y el hueso in vivo. Las BMP/OP inducen la diferenciación del hueso endocondral por medio de una cascada de eventos que incluyen la formación de cartílago, la hipertrofia y la calcificación del cartílago, la invasión vascular, la diferenciación de osteoblastos, y la formación de hueso. Como se ha descrito antes, las BMP/OP (BMP 2-14, y proteínas osteogénicas 1 y 2, OP-1 y OP-2) son miembros de la súper-familia del TGF-beta. La sorprendente conservación evolutiva entre los miembros de la sub-familia de BMP/OP sugiere que son críticos en el desarrollo y la función normal de los animales. Por otra parte, la presencia de múltiples formas de BMP/OP plantea una cuestión importante acerca de la relevancia biológica de esta aparente redundancia. Además de la condrogénesis y la osteogénesis post-fetal, las BMP/OP juegan múltiples papeles en la esqueletogénesis (incluyendo el desarrollo de los tejidos craneofaciales y dentales) y en el desarrollo embrionario y a organogénesis de los órganos parenquimatosos, incluyendo el riñón. Se sabe ahora que la naturaleza cuenta con mecanismos moleculares comunes (y escasos) adaptados para proporcionar la emergencia de tejidos y órganos especializados. La súper-familia de BMP/OP es un elegante ejemplo de parsimonia natural en la programación de múltiples funciones especializadas que despliegan isoformas moleculares con una variación minoritaria en las unidades de aminoácidos dentro de regiones carboxi terminales altamente conservadas.

Antagonismo de BMP

Las sub-familias de las BMP y la Activina están sujetas a una regulación post-traducciona significativa. Existe un sistema de control extracelular intrincado, por medio del cual se sintetiza y se exporta un antagonista de elevada afinidad, y con posterioridad forma complejos selectivamente con las BMP o las

activinas para desorganizar su actividad biológica (W.C. Smith (1999) TIG 15(1) 3-6). Han sido identificados algunos de estos antagonistas naturales, y basándose en la divergencia de la secuencia parecen haber evolucionado independientemente debido a la carencia de conservación de la secuencia primaria. No ha habido un trabajo estructural hasta la fecha sobre esta clase de proteínas. Los estudios de estos antagonistas han destacado una clara diferencia para interaccionar y neutralizar BMP-2 y BMP-4. Además, el mecanismo de inhibición parece diferir para los diferentes antagonistas (S. Iemura et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 9337-9342).

Proteínas de unión a TGF-beta novedosas

1. Antecedente re: proteínas de unión a TGF-beta

Como se ha observado antes, la presente descripción proporciona un clase novedosa de proteínas de unión a TGF-beta que posee un armazón de cisteína (disulfuro) casi idéntico cuando se comparaba con DAN Humana, Gremlin Humana, y Cerberus Humana, y SCGF (Patente de los estados Unidos Núm. 5.780.263) pero no posee casi homología a nivel de nucleótidos (para la información antecedente, ver generalmente Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., "The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities", Molecular Cell 1:673-683, 1998).

Un ejemplo representativo de la clase novedosa de proteínas de unión a TGF-beta se describe en los ID de Secuencia Núm. 1, 5, 9, 11, 13, y 15. Se debe entender que los miembros representativos de esta clase de proteínas de unión incluyen variantes de la proteína de unión a TGF-beta (p.ej., los ID de Secuencia Núm. 5 y 7). Según se utiliza en la presente memoria, un "gen variante de la proteína de unión a TGF-beta" hace referencia a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de los ID de Secuencia Núm. 2, 10, 12, 14 o 16. Entre tales variantes se incluyen los polimorfismos de origen natural o las variantes alélicas de los genes de la proteína de unión a TGF-beta, así como genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de estas secuencias de aminoácidos. Las formas variantes adicionales de un gen de la proteína de unión a TGF-beta son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o deleciones de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria. Los genes variantes de la proteína de unión a TGF-beta pueden ser identificados determinando si los genes hibridan con una molécula de ácido nucleico que tenga la secuencia de nucleótidos de los ID de Secuencia Núm. 1, 5, 7, 9, 11, 13, o 15 en condiciones restrictivas. Además, los genes variantes de la proteína de unión a TGF-beta deben codificar una proteína que tenga un esqueleto de cisteína.

Como alternativa, se pueden identificar genes variantes de la proteína de unión a TGF-beta mediante comparación de la secuencia. Según se utiliza en la presente memoria, dos secuencias de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos aminoácido de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. De un modo similar, dos secuencias de nucleótidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. Las comparaciones de la secuencia se pueden realizar utilizando programas de soporte lógico normalizados tales como los incluidos en la Suite de computación bioinformática LASERGENE, que es producida por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos mediante la determinación del alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins", en Methods in Gene Biotechnology, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª Edición (Academic Press, Inc. 1998)).

Una proteína de unión a TGF-beta variante debe tener al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 50% con los ID de Secuencia Núm. 2, 6, 10, 12, 14, o 16 y preferiblemente, una identidad de más del 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, o 95%. Alternativamente, las variantes de la proteína de unión a TGF-beta pueden ser identificadas por tener una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 70% con los ID de Secuencia Núm. 1, 5, 9, 11, 13 o 15. Por otra parte, la presente descripción contempla las variantes del gen de la proteína de unión a TGF-beta que tienen una identidad de más del 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% con el SEQ ID NO. 1. Sin hacer caso del método concreto utilizado para identificar un gen variante de una proteína de unión a TGF-beta o una proteína de unión a TGF-beta, una proteína de unión a TGF-beta variante o un polipéptido codificado por un gen de la proteína de unión a TGF-beta variante puede ser caracterizado funcionalmente, por ejemplo, mediante su capacidad para unirse a y/o inhibir la señalización de un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta, o mediante su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo de una proteína de unión a TGF-beta.

En la presente descripción se incluyen fragmentos funcionales de los genes de las proteínas de unión a

TGF-beta. En el contexto de esta descripción, un "fragmento funcional" de un gen de una proteína de unión a TGF-beta hace referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica una porción de un polipéptido de la proteína de unión a TGF-beta que o bien posee (1) la actividad funcional indicada antes, o bien (2) se une específicamente con un anticuerpo de una proteína de unión a TGF-beta. Por ejemplo, un fragmento funcional de un gen de una proteína de unión a TGF-beta descrito en la presente memoria comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Núm: 1, 5, 9, 11, 13, o 15.

2. Aislamiento del gen de la proteína de unión a TGF-beta

Se pueden obtener moléculas de ADN que codifican un gen de una proteína de unión rastreando una genoteca deADNc o genómico humano utilizando sondas polinucleotídicas basadas, por ejemplo, en la SEC ID NO: 1.

Por ejemplo, la primera etapa en la preparación de una genoteca deADNc es aislar el ARN utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, las técnicas de aislamiento de ARN deben proporcionar un método para romper las células, un medio para inhibir la degradación de ARN dirigida por la RNasa, y un método para separar el ARN del ADN, la proteína y los polisacáridos contaminantes. Por ejemplo, se puede aislar el ARN total congelando el tejido en nitrógeno líquido, triturando el tejido congelado con un mortero y una mano de mortero para lisar las células, extrayendo el tejido triturado con una solución de fenol/cloroformo para separar las proteínas, y separando el ARN de las impurezas restantes mediante precipitación selectiva con cloruro de litio (ver, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41] (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"].

Alternativamente, el ARN total puede ser aislado extrayendo el tejido triturado con isotiocianato de guanidinio, extrayendo con disolventes orgánicos, y separando el ARN de los contaminantes utilizando la centrifugación diferencial (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 4-1 a 4-6; Wu (1997) en las páginas 33-41).

Con el fin de construir una genoteca deADNc, se debe aislar ARN poli(A)⁺ de la preparación de ARN total. El ARN poli(A)⁺ puede ser aislado del ARN total utilizando la técnica normalizada de la cromatografía en oligo(dT)-celulosa (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 4-11 a 4-12).

Las moléculas de ADNc de doble hebra son sintetizadas a partir de ARN poli(A)⁺ utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Wu (1997) en las páginas 41-46). Por otra parte, se pueden utilizar kits asequibles comercialmente para sintetizar moléculas de ADNc de doble hebra. Por ejemplo, tales kits son asequibles de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California), Promega Corporation (Madison, Wisconsin) y Stratagene Cloning Systems (La Jolla, California).

El enfoque básico para obtener clones de ADNc de la proteína de unión a TGF-beta puede ser modificado construyendo una genoteca deADNc sustraída que esté enriquecido en moléculas de ADNc específicas de la proteína de unión a TGF. Los mecanismos para construir genotecas sustraídas son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sargent, "Isolation of Differentially Expressed Genes" en *Meth. Enzymol.* 152:423, 1987, y Wu et al., (eds.) "Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 29-65 (CRC Press, Inc. 1997)).

Diversos vectores de clonación son apropiados para la construcción de una genoteca deADNc. Por ejemplo, se puede preparar una genoteca deADNc en un vector derivado de bacteriófagos, tal como un vector λ gt10 (ver, por ejemplo, Huynh et al., "Construction and Screening cDNA in λ gt10 and λ gt11", en *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.) página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52).

Alternativamente, se pueden insertar moléculas de ADNc de doble hebra en un vector plasmídico, tal como un vector pBluescript (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, California), LambdaGEM-4 (Promega Corp.; Madison, Wisconsin) u otros vectores asequibles comercialmente. Los vectores de clonación adecuados también pueden ser obtenidos de la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

Con el fin de amplificar las moléculas de ADNc clonadas, la genoteca deADNc es insertada en un anfitrión procariótico, utilizando mecanismos normalizados. Por ejemplo, se puede introducir una genoteca deADNc en células *E. coli* DH5 competentes, que pueden ser obtenidas de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland).

Se puede preparar una genoteca de ADN genómico humano por métodos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327). Se puede aislar ADN genómico lisando tejido con el detergente Sarkosyl, digiriendo el producto lisado con

proteinasas K, aclarando los restos insolubles del producto lisado mediante centrifugación, precipitando el ácido nucleico del producto lisado utilizando isopropanol, y purificando el ADN resuspendido en un gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Los fragmentos de ADN que son adecuados para la producción de un genoteca genómica pueden ser obtenidos sometiendo a cizalla al azar el ADN genómico o mediante digestión parcial del ADN genómico con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de ADN genómico pueden ser insertados en un vector, tal como un vector bacteriófago o cosmídico, de acuerdo con los mecanismos convencionales, tal como el uso de la digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, el uso del tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada de moléculas de ADN, y la ligadura con ligasa apropiadas. Los mecanismos para semejante manipulación son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de la proteína de unión a TGF-beta también pueden ser obtenidas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleotídicos que tengan secuencias de nucleótidos del gen de la proteína de unión a TGF-beta humano, como se describe en la presente memoria. Los métodos generales para rastrear genotecas con PCR son proporcionados por ejemplo, por Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.) páginas 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Por otra parte, describen mecanismos para utilizar la PCR para aislar genes relacionados, por ejemplo, Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

Alternativamente, se pueden obtener genotecas genómicas humanas de fuentes comerciales tales como Research Genetics (Huntsville, AL) y American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

Se puede rastrear una genoteca que contiene ADNc o clones genómicos con una o más sondas polinucleotídicas basadas en el SEC ID NÚM: 1, utilizando métodos normalizados (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-1 a 6-11).

Los anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta, producidos como se describe más abajo, también pueden ser utilizados para aislar secuencias de ADN que codifican los genes de la proteína de unión a TGF-beta de las genotecas de ADNc. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser utilizados para rastrear genotecas de expresión de λ gt11, o se pueden utilizar los anticuerpos para el inmunoescrutinio después de la selección y la traducción de híbridos (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-12 a 6-16; Margolis et al., "Screening λ expression libraries with antibody and protein probes", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al., (eds.) páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

La secuencia de un ADNc de una proteína de unión a TGF-beta o de un fragmento genómico de la proteína de unión a TGF-beta puede ser determinada utilizando métodos normalizados. Por otra parte, la identificación de fragmentos genómicos que contienen un promotor o un elemento regulador de la proteína de unión a TGF-beta puede ser lograda utilizando mecanismos bien establecidos, tales como análisis de delección (ver, generalmente, Ausubel (1995)).

Como alternativa, se puede obtener un gen de una proteína de unión a TGF-beta sintetizando moléculas de ADN utilizando oligonucleótidos largos mutuamente cebadores y secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Los mecanismos establecidos que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131, 1993; Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266, 1993; Dilton et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc., 1993); Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299, 1995).

3. Producción de genes de la proteína de unión a TGF-beta

Se pueden obtener moléculas de ácido nucleico que codifican genes de proteína de unión a TGF-beta variantes rastreando diversas genotecas de ADNc o genómico con sondas oligonucleotídicas que tienen secuencias de nucleótidos basadas en los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15, utilizando los procedimientos descritos antes. Las variantes del gen de la proteína de unión a TGF-beta también pueden ser construidas sintéticamente. Por ejemplo, se puede idear una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido que tenga un cambio de aminoácido conservativo, en comparación con la secuencia de aminoácidos de los SEC ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. Esto es, se pueden obtener variantes que contengan una o más sustituciones de aminoácidos de los SEC ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, en las cuales un aminoácido alifílico está sustituido por un aminoácido alifílico en una secuencia de aminoácidos de la proteína de

unión a TGF-beta, un aminoácido aromático está sustituido por un aminoácido aromático en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta, un aminoácido que contiene azufre es sustituido por un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta, un aminoácido que contiene hidroxilo es sustituido por un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta, un aminoácido ácido es sustituido por un aminoácido ácido en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta, un aminoácido alcalino es sustituido por un aminoácido alcalino en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta, o un aminoácido monocarboxílico dibásico es sustituido por un aminoácido monocarboxílico dibásico en una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a TGF-beta.

Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservativa" es ilustrada por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina, y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparragina, y (6) lisina, arginina e histidina. Al realizar tales sustituciones, es importante, cuando sea posible mantener el esqueleto de cisteína esbozado en la Figura 1.

Los cambios de aminoácidos conservativos en el gen de la proteína de unión a TGF-beta pueden ser introducidos sustituyendo nucleótidos por los nucleótidos citados en el SEC ID NO: 1. Tales "variantes de aminoácido conservativo" pueden ser obtenidas, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, y similar (ver Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22, y McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)). La capacidad funcional de tales variantes puede ser determinada utilizando un método normalizado, tal como el análisis descrito en la presente memoria. Alternativamente, un polipéptido de la proteína de unión a TGF-beta variante puede ser identificado mediante la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta.

Se pueden realizar análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener "fragmentos funcionales" de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la proteína de unión a TGF-beta. Como ilustración, se pueden digerir moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 1 con la nucleasa *Bal*/31 para obtener una serie de delecciones encajadas. Después los fragmentos son insertados en vectores de expresión en un marco de lectura apropiado, y los polipéptidos expresados son aislados y sometidos a ensayo en cuanto a su actividad, o en cuanto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es la utilización de la mutagénesis dirigida al oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos concretos de un gen de la proteína de unión a TGF-beta utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los mecanismos normalizados para el análisis funcional de las proteína son descritos, por ejemplo, por Treuter et al., Molec. Gen. Genet. 240:113, 1993; Content et al., "Espression and preliminaray deletion analysis of the 42 kea 2-5A synthesise induced by human interferon", en Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", en Control of Animal Cell Proliferation, Vol. I, Boynton et al., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau et al., J. Biol. Chem. 270:29270, 1995; Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270:25291, 1995; Yamaguchi et al., Biochem. Pharmacol. 50:1295, 1995; y Meisel et al., Plant Molec. Biol. 30:1, 1996.

La presente descripción también contempla fragmentos funcionales de un gen de la proteína de unión a TGF-beta que tienen cambios de aminoácidos conservativos.

Un gen variante de la proteína de unión a TGF-beta puede ser identificado basándose en la estructura determinando el nivel de identidad con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15 y 2, 6, 10, 12, 14, o 16, como se ha discutido antes. Un enfoque alternativo para identificar un gen variante basándose en la estructura consiste en determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de la proteína de unión a TGF-beta variantes puede hibridar en condiciones restrictivas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de los SEC ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, o 15, o una porción de la misma de una longitud de al menos 15 o 20 nucleótidos. Como ilustración de las condiciones de hibridación restrictivas, se puede unir una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia de la proteína de unión a TGF-beta variante con un fragmento de una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia de la SEC ID NO: 1 en un tampón que contenga, por ejemplo, 5xSSPE (1xSSPE = cloruro de sodio 180 mM, fosfato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,7), 5xsolución de Denhardt (100xDenhardt = seralbúmina bovina al 2% (p/v), Ficoll al 2% (p/v), polivinilpirrolidona al 2% (p/v) y SDS al 0,5% incubado durante la noche a 55-60°C. Los lavados post-hibridación con una alta restricción se realizan típicamente en 0,5xSSC (1xSSC = cloruro de sodio 150 mM, citrato de sodio 15 mM) o en 0,5xSSPE a 55-60°C.

Con independencia de la secuencia de nucleótidos concreta de un gen de la proteína de unión a TGF-beta variante, el gen codifica un polipéptido que puede ser caracterizado por su actividad funcional, o por la

capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta. Más específicamente, los genes de la proteína de unión a TGF-beta variantes codifican polipéptidos que muestran al menos un 50%, y preferiblemente, más del 60, 70, 80 o 90% de la actividad de los polipéptidos codificados por el gen de la proteína de unión a TGF-beta humano descrito en la presente memoria.

4. Producción de la proteína de unión a TGF-beta en Células Cultivadas

Para expresar un gen de una proteína de unión a TGF-beta, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe ser conectada operablemente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después introducida en una célula anfitriona. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores e intensificadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencia reguladoras de la traducción y un gen marcador que sea adecuado para la selección de células que portan el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína foránea en células eucarióticas contienen típicamente (1) elementos de ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y la selección del vector de expresión en un anfitrión bacteriano; (2) elementos de ADN eucariótico que controlan el inicio de la transcripción, tal como un promotor, y (3) elementos de ADN que controlan la maduración de los transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación.

Las proteínas de unión a TGF-beta de la presente descripción son expresadas preferiblemente en células de mamífero. Entre los ejemplos de las células anfitrionas de mamífero se incluyen células de riñón de mono verde Africano (Vero; ATCC CRL 1587, células de riñón embrionario humano ((293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de cría de hámster (BHK-21; ATCC CRL 8544), células de riñón caninas (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster Chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias de ratóns (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Para un anfitrión mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y la traducción pueden derivar de fuentes virales, tales como adenovirus, virus de papiloma bovino, virus de simios, o similar, en los cuales las señales reguladoras están asociadas con un gen concreto que tiene un elevado nivel de expresión. Las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales también pueden ser obtenidas de genes de mamíferos, tales como los genes de actina, colágeno, miosina, y metalotioneína.

Entre las secuencias reguladoras transcripcionales se incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Entre los promotores eucarióticos adecuados se incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón [Hamer et al., J. Molec. Appl. Genet. 1:273,1982], el promotor TK del Herpes virus [McKnight, Cell 31:355, 1982], el promotor temprano de SV40 [Benoist et al., Nature 290:304,1981], el promotor del virus del Sarcoma de Rous [Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9:6777, 1982], el promotor de citomegalovirus [Foecking et al., Gene 45, 101, 1980], y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (ver, generalmente, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en Protein Engineering Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativamente, se puede utilizar un promotor procariótico, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3 para controlar la expresión del gen de la proteína de unión a TGF-beta en células de mamífero si el promotor procariótico está regulado por un promotor eucariótico (Zhou et al., Mol. Cell. Biol. 10:4529, 1990; Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19:4485, 1991).

Los genes de la proteína de unión a TGF-beta también pueden ser expresados en células bacterianas, de levadura, de insectos o de plantas. Los promotores adecuados que pueden ser utilizados para expresar los polipéptidos de la proteína de unión a TGF-beta en un anfitrión procariótico son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_I del bacteriófago lambda, los promotores *trp*, *recA*, del choque térmico, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA*, y *lacZ* de *E. coli*, los promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor *bla* de pBR322, y el promotor CAT del gen de la cloramfenicol acetil transferasa. Los promotores procarióticos han sido revisados por Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277, 1987, Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4ª Ed. (Benjamin Cummins 1987), y por Ausubel et al., (1995).

Entre los anfitriones procarióticos preferidos se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Entre las cepas adecuadas de *E. coli* se incluyen BL21(DE3), BL2(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4, DH5, DH51, DH51F', DH51MCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38,RR1,

Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, y ER1647 (ver, por ejemplo, Brown (Ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Entre las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* se incluyen BR151, YB886, M1119, M1120, y B170 (ver, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (Ed.) (IRL Press 1985)).

Los métodos para expresar proteínas en anfitriones procarióticos son bien conocidos para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al. (eds.) página 15 (Oxford University Press 1995), Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995); y Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al., (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).ç

El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz de introducir genes de la proteína de unión a TGF-beta clonada en células de insecto. Los vectores de expresión adecuados están basados en el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), y contienen promotores bien conocidos tales como el promotor 70 de la proteína del choque térmico de *Drosophila* (hsp), el promotor del gen temprano inmediato (ie-1) y el promotor 39K temprano retardado de *Autographa californica*, el promotor p10 de baculovirus, y el promotor de la metalotioneína de *Drosophila*. Entre las células anfitrionas e insecto adecuadas se incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, una línea celular de ovario de pulpa de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE, y Sf21 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*. Las técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus son proporcionadas por Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors", en *Methods in Molecular Biology*, Volumen 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), por Patel et al., "The baculovirus expression system", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al., (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), por Ausubel (1995) en las páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995), y por Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Entre los promotores para la expresión en levaduras se incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa), y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levaduras y son asequibles fácilmente. Entre estos vectores se incluyen vectores basados en Ylp, tales como Ylp5, vectores YRp, tales como YRp17, vectores YEp tales como YEp13 y vectores YCp, tales como YCp19. Un experto en la técnica apreciará que hay una amplia variedad de vectores adecuados para la expresión en células de levadura.

Los vectores de expresión también pueden ser introducidos en protoplastos de plantas, tejidos vegetales intactos, o células vegetales aisladas. Los métodos generales para cultivar tejidos vegetales son proporcionados, por ejemplo, por Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al. (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

Un vector de expresión puede ser introducido en células anfitrionas utilizando una variedad de mecanismos normalizados incluyendo la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por liposomas, el reparto mediado por microproyectiles, la electroporación, y similares. Preferiblemente, las células transfectadas son seleccionadas y propagadas para proporcionar células anfitrionas recombinantes que comprendan el vector de expresión integrado establemente en el genoma de la célula anfitriona. Las técnicas para introducir vectores en células eucarióticas y las técnicas para seleccionar tales transformantes estables utilizando un marcador seleccionable dominante son descritas, por ejemplo, por Ausubel (1995) y por Murray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991). Los métodos para introducir vectores de expresión en células bacterianas, de levadura, de insectos, y vegetales también son proporcionados por Ausubel (1995).

Los métodos generales para expresar y recuperar la proteína foránea producida por un sistema celular de mamífero son proporcionados por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en "Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al., (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Los mecanismos normalizados para recuperar la proteína producida por un sistema bacteriano son proporcionados, por ejemplo, por Grishammer et al., "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los métodos establecidos para el aislamiento de proteínas recombinante a partir de un sistema de baculovirus son descritos por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc., 1995).

Más generalmente, la proteína de unión a TGF-beta puede ser aislada mediante mecanismos

normalizados, tales como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión por tamaños, la cromatografía de intercambio iónico, la HPLC y similares. Se pueden idear variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación de la proteína de unión a TGF-beta por parte de aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta, obtenidos como se describe más abajo, para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación por inmunofinidad.

5. Producción de Anticuerpos para las proteínas de unión a TGF-beta

Los anticuerpos para la proteína de unión a TGF-beta pueden ser obtenidos, por ejemplo, utilizando el producto de una expresión como antígeno. Los anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta particularmente útiles se "unen específicamente" con la proteína de unión a TGF-beta de los SEC ID Núm. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, pero no a otras proteínas de unión a TGF-beta tales como Dan, Cerberus, SCGF, o Gremlin. Los anticuerpos de la presente invención (incluyendo los fragmentos de los mismos) son monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, y puede ser por ejemplo un anticuerpo IgG, por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgE, IgM, o IgA. Puede ser de origen animal, por ejemplo de mamífero, y puede ser por ejemplo un anticuerpo de ratón, de rata, humano o de otro primate. Cuando se desea el anticuerpo puede ser un anticuerpo internalizante.

Los anticuerpos policlonales para la proteína de unión a TGF-beta recombinante pueden ser preparados utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Green et al. "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992); Williams et al., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995)). Aunque los anticuerpos policlonales se originan típicamente en animales tales como ratas, ratones, conejos, cabras, u ovejas, un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF de la presente invención también puede derivar de un anticuerpo de primate sub-humano. Los mecanismos generales para originar anticuerpos útiles para el diagnóstico y la terapia en babuinos fueron encontrados, por ejemplo, en Goldenberg et al., publicación de patente internacional Núm. WO 91/11465 (1991), y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990.

El anticuerpo debe comprender al menos un dominio de la región variable. El dominio de la región variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una secuencia de aminoácidos hipervariable responsable de la unión al antígeno embebido en una secuencia marco. En términos generales el dominio de la región variable (V) puede ser cualquier ordenación adecuada de dominios variables de la cadena pesada (V_H) y/o ligera (V_L) de inmunoglobulina. De este modo por ejemplo el dominio de la región V puede ser monomérico y ser un dominio V_H o V_L donde estos sean capaces de unirse independientemente con una afinidad aceptable. Alternativamente el dominio de la región V puede ser dimerico y contener dímeros V_H-V_H, V_H-V_L, o V_L-V_L en los cuales las cadenas V_H y V_L están asociadas no covalentemente (abreviado en adelante como F_V). Cuando se desea, no obstante, las cadenas pueden estar acopladas covalentemente o bien directamente, por ejemplo por medio de un enlace disulfuro entre los dos dominios variables, o a través de un ligador, por ejemplo un ligador peptídico, para formar un dominio de cadena sencilla (abreviado en adelante como scF_V).

El dominio de la región variable puede ser cualquier dominio variable de origen natural o una versión diseñada del mismo. Por versión diseñada se quiere significar un dominio de la región variable que ha sido creado utilizando mecanismos de diseño de ADN recombinante. Entre tales versiones diseñadas se incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Entre los ejemplos concretos de este tipo se incluyen aquellos dominios de la región variable diseñados que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo.

El dominio de la región variable puede estar anclado covalentemente en un aminoácido C-terminal a al menos otro dominio del anticuerpo o un fragmento del mismo. De este modo, por ejemplo cuando un dominio V_H está presente en el dominio de la región variable este puede estar conectado a un dominio C_H1 de la inmunoglobulina o un fragmento del mismo. De un modo similar un dominio V_L puede estar conectado a un dominio C_K o un fragmento del mismo. De este modo por ejemplo el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión al antígeno contiene dominios V_H y V_L asociados conectados en sus extremos C a un dominio CH1 y C_K respectivamente. El dominio CH1 puede ser prolongado con aminoácidos adicionales, por ejemplo para proporcionar un dominio de la región bisagra como el encontrado en un fragmento Fab', o para proporcionar dominios adicionales, tales como los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden ser obtenidos construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes son preparados, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región

variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos (ver, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Anticuerpos monoclonales para su uso en la invención pueden ser preparados mediante inmunización convencional y procedimientos de fusión celular. Fragmentos, pueden ser derivados de allí utilizando cualquier mecanismo químico normalizado adecuado p.ej., reducción o escisión enzimática y/o digestión, por ejemplo mediante tratamiento con pepsina.

Más específicamente, los anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta monoclonales pueden ser generados utilizando una variedad de técnicas. Los anticuerpos monoclonales de roedor para antígenos específicos pueden ser obtenidos mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975; y Coligan et al. (eds.) *Current Protocols in Immunology*, 1:2.5-1.2.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover et al., (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)).

En resumen, se pueden obtener anticuerpos monoclonales inyectando en ratones una composición que comprende un producto génico de la proteína de unión a TGF-beta, verificando la presencia de producción de anticuerpo mediante la separación de una muestra de suero, separación del bazo para obtener B-linfocitos, fusión de los B-linfocitos con células de mieloma para producir hibridomas, clonación de los hibridomas, selección de clones positivos que producen anticuerpos para el antígeno, cultivo de los clones que producen los anticuerpos para el antígeno, y aislamiento de los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Además, un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta de la presente invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos son obtenidos a partir de ratones transgénicos que han sido diseñados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una sensibilización antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen desorganizaciones redireccionadas de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden ser utilizados para producir hibridomas de escrutinio de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, Green et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados y purificados a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de mecanismos bien establecidos. Entre tales mecanismos de aislamiento se incluyen la cromatografía de afinidad con Proteína A-Sepharose, la cromatografía de exclusión por tamaños, y la cromatografía de intercambio iónico (ver, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79-104 (The Human Press, Inc. 1992)).

Para usos concretos, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser escindido adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede ser realizada utilizando un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática en la que se utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos por ejemplo, por Goldenberg, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.331.647, Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959, Edelman et al., en *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967), y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10-2.10.4.

También se pueden utilizar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera monovalentes, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, con tal que los fragmentos se unan al antígeno que sea reconocido por el anticuerpo intacto.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante o diseñado genéticamente obtenido mediante el uso mecanismos de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión del ADN que codifica las regiones variable y/o constante del anticuerpo. Semejante ADN es conocido y/o es fácilmente asequible de genotecas de ADN incluyendo por ejemplo genotecas de anticuerpos de fagos (ver Chiswell, D.J. y McCafferty, J. Tibtech. 10 80-84 (1992)) o se puede sintetizar cuando se desee. Los procedimientos de la biología molecular y/o la química normalizados pueden ser utilizados para secuenciar y manipular el ADN, por ejemplo, para introducir codones para crear restos cisteína, para modificar, añadir o suprimir otros aminoácidos o dominios según se desee.

A partir de en la presente memoria, uno o más vectores de expresión replicables que contengan el ADN y pueden ser preparados y utilizados para transformar una línea celular apropiada, p.ej. una línea celular de mieloma no productora, tal como una línea NSO de ratón o una línea bacteriana, p.ej. de E. coli, en la cual tendrá lugar la producción del anticuerpo. Con el fin de obtener una transcripción y una traducción eficaz, una secuencia de ADN de cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, concretamente un promotor y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia de dominio variable. Los métodos concretos para producir anticuerpos de esta manera son generalmente bien conocidos y utilizados rutinariamente. Por ejemplo, describen procedimientos de la biología molecular básicos Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); la secuenciación del ADN se puede realizar como describen Sanger et al. (PNAS 74, 5463, (1977)) y el manual de secuenciación plc de Amersham International; y la mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo según el método de Kramer et al. (Nucl. Acids Res. 12, 9441, (1984)) y el manual Anglian Biotechnology Ltd. Adicionalmente, existen numerosas publicaciones, que detallan técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante la manipulación del ADN, la creación de vectores de expresión y la transformación de células apropiadas, por ejemplo como revisan Mountain A y Adair, J R in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (ed. Tombs, M P, 10, Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, UK) y en la Memoria de la Patente Internacional Núm. WO 91/09967.

Cuando se desea, el anticuerpo según la invención puede tener una o más moléculas efectoras o informadoras ancladas a él y la invención se amplía a tales proteínas modificadas. Las moléculas efectoras o informadoras pueden estar ancladas al anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible, aminoácido amino terminal o, cuando esté presente un grupo funcional carbohidrato localizado en el anticuerpo, siempre que, por supuesto, este no afecte adversamente a las propiedades de unión y a la utilidad eventual de la molécula. Entre los grupos funcionales concretos se incluyen, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo, carboxilo o aldehído libre. El anclaje del anticuerpo y la molécula o las moléculas efectoras y/o informadoras puede ser logrado vía tales grupos y un grupo funcional apropiado en las moléculas efectoras o informadoras. La conexión puede ser directa o indirecta, por medio de grupo espaciadores o formadores de puentes.

Entre las moléculas efectoras se incluyen, por ejemplo, agentes antineoplásicos, toxinas (tales como toxinas farmacéuticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas p.ej. ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p.ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, polímeros de origen natural y sintético p.ej. polisacáridos y polímeros de polialquileno tales como poli(etilenglicol) y derivados del mismo, radionúclidos, concretamente radioyoduro, y metales quelantes. Entre los grupos informadores adecuados se incluyen metales quelados, compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Entre los agentes antineoplásicos concretos se incluyen agentes citotóxicos y cistostáticos, por ejemplo, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (p.ej., clorambucil, melfalan, mecloretamina, ciclofosfamida, o mostaza de uracilo) y los derivados de los mismos, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, busulfan, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (p.ej. sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorubicina, mitomicinas (p.ej. mitomicina C), actinomicinas (p.ej. dactinomicinas), plicamicina, calicamicina y derivados de la misma, o esperamicina y derivados de la misma, inhibidores mitóticos, tales como etoposido, vincristina o vinblastina y derivados de los mismos, alcaloides, tales como elipticina; polioles tales como taxicina-I o taxicina-II, hormonas tales como andrógenos (p.ej. dromostanolona o testolactona), progestinas (p.ej. acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (p.ej., difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (p.ej. tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxiiurea, hidrazinas, tales como procarbazona, o imidazoles, tales como dacarbazina.

Son grupos efectores particularmente útiles la calicamicina y los derivados de la misma (ver por ejemplo las Memorias de Patente Surafricanas Núm. 85/8794, 88(8127 y 90/2839).

Entre los metales quelados se incluyen quelatos de metales di- o tri-positivos que tienen un número de coordinación de 2 a 8 inclusive. Entre los ejemplos concretos de tales metales se incluyen tecnecio (Tc),

renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido. Entre los radionúclidos concretos se incluyen Tc^{99m}, Re¹⁸⁶, Co⁵⁸, Co⁶⁰, Cu⁶⁷, Au¹⁹⁵, Au¹⁹⁹, Au¹¹⁰, Pb²⁰³, Bi²⁰⁶, Bi²⁰⁷, In¹¹¹, Ga⁶⁷, Ga⁶⁸, Y⁸⁸, Y⁹⁰, Tb¹⁶⁰, Gd¹⁵³ y Sc⁴⁷.

El metal quelado puede ser por ejemplo uno de los tipos de metal quelado anteriores con cualquier agente quelante polidentado adecuado, por ejemplo poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres, (p.ej. éteres corona y derivados de los mismos), poliamidas, porfirinas, y derivados carbocíclicos.

En general, el tipo de agente quelante dependerá del metal que se use. Un grupo particularmente útil de agentes quelantes en los productos conjugados según la invención, no obstante, son las poliaminas acíclicas y cíclicas, especialmente los ácidos poliaminocarboxílicos, por ejemplo el ácido dietilentríaminopentaacético y derivados de los mismos, y aminas macrocíclicas, p.ej., derivados tri-aza y tetra-aza cíclicos (por ejemplo como se describe en la Memoria de la Patente Internacional Núm. WO 92/22583); y poliamidas, especialmente desferrioxamina y derivados de la misma.

De este modo por ejemplo cuando se desee utilizar un grupo tiol en el anticuerpo como punto de anclaje esto puede ser logrado por medio de una reacción con un grupo reactivo con tiol presente en la molécula efectora o informadora. Entre los ejemplos de tales grupos se incluyen un ácido o éster a-halocarboxílico, p.ej., yodoacetamida, una imida, p.ej., maleimida, una vinilsulfona, o un disulfuro. Estos y otros procedimientos de unión adecuados se describen generalmente y más concretamente en las Memorias de Patente Internacional Núm. WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/091195 y WO 89/01476.

Análisis para seleccionar moléculas que incrementen la densidad ósea

Como se ha discutido antes, la presente descripción proporciona métodos para seleccionar y/o aislar compuestos que son capaces de incrementar la densidad ósea. Por ejemplo, en un aspecto de la presente descripción se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada estimula la señalización por la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones de la descripción, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

En otros aspectos de la descripción, se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresen la proteína de unión a TGF-beta y (b) determinar si la expresión (o actividad) de la proteína de unión a TGF-beta de dichas células expuestas disminuye, y determinar a partir de allí si el compuesto es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso. En una realización de la descripción las células son seleccionadas del grupo formado por hueso humano normal transformado espontáneamente o no transformado de biopsias óseas y osteoblastos de hueso parietal de rata. Semejantes métodos pueden ser completados en una variedad de formatos de análisis incluyendo, por ejemplo, la Inmunolectroforesis Contracorriente (CIEP), los Radioinmunoanálisis, las Radioinmunoprecipitaciones, los Análisis de Absorción con Enzima Ligada (ELISA), y los análisis sandwich (ver, las Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.376.110 y 4.486.530, ver también *Antibodies: A Laboratory Manual*, supra).

Las realizaciones representativas de tales análisis son proporcionadas más abajo en los Ejemplos 5 y 6. En resumen, un miembro de la familia de la súper-familia de TGF-beta o una proteína de unión de TGF-beta se une primero a una fase sólida, seguido de la adición de una molécula candidato. El miembro de la familia marcado de la súper-familia del TGF-beta o la proteína de unión a TGF-beta es añadido después al análisis, la fase sólida lavada, y la cantidad de miembro de la súper-familia de TGF-beta unido o marcado o de proteína de unión a TGF-beta del soporte sólido es determinada. Las moléculas que son adecuadas para su uso en el aumento del contenido mineral del hueso como se describe en la presente memoria son aquellas moléculas que disminuyen la unión de proteína de unión a TGF-beta a un miembro o miembros de la súper-familia del TGF-beta de una manera estadísticamente significativa. Obviamente, los análisis adecuados para su uso en la presente descripción no deben estar limitados a las realizaciones descritas en los Ejemplos 2 y 3. En particular, se pueden alterar numerosos parámetros, por ejemplo uniendo el TGF-beta a una fase sólida, o eliminando completamente la fase sólida.

En otros aspectos de la descripción, se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresan el TGF-beta y (b) determinar si la actividad de TGF-beta a partir de dichas células expuestas es alterada, y determinar a partir de allí si el compuesto es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso. De un modo similar a los métodos descritos antes, se pueden utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar los cambios de expresión de la proteína

de unión a TGF-beta debidos a un compuesto de ensayo seleccionado.

Por ejemplo, en un aspecto de la presente descripción se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada sobre-regula la señalización de la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones de la descripción, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

De un modo similar a los métodos descritos antes, se puede utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar la estimulación de TGF-beta debida a un compuesto de ensayo seleccionado. Uno de tales métodos representativos se proporciona más abajo en el Ejemplo 6 (ver también Durham et al., Endo, 136:1374-1380).

En otros aspectos más de la presente descripción, se proporcionan los métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, comprendiendo la etapa de determinar si una molécula seleccionada inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta al hueso, o un análogo del mismo. Según se utiliza en la presente memoria, se debe entender que el hueso o los análogos del mismo hacen referencia a hidroxiapatita o una superficie compuesta por una forma en polvo de hueso, hueso triturado o hueso intacto. De un modo similar a los métodos descritos antes, se pueden utilizar una amplia variedad de métodos para evaluar la inhibición de la localización de la proteína de unión a TGF-beta en la matriz ósea. Uno de tales métodos representativos se proporciona más abajo en el Ejemplo 7.

Se debe observar que mientras los métodos citados en la presente memoria pueden hacer referencia al análisis de una molécula de ensayo individual, la presente descripción no debe estar limitada a ellos. En particular, la molécula seleccionada puede estar contenida en una mezcla de compuestos. Por tanto, los métodos citados pueden comprender adicionalmente la etapa de aislar una molécula que inhiba la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Moléculas candidato

Se pueden analizar una amplia variedad de moléculas en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta. Entre los ejemplos representativos que se discuten con más detalle más abajo, se incluyen moléculas orgánicas, proteínas o péptidos, y moléculas de ácido nucleico. Aunque debe ser evidente a partir del estudio de más abajo que las moléculas candidato descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas en los análisis descritos en la presente memoria, debe ser fácilmente evidente que tales moléculas también pueden ser utilizadas en una variedad de entornos de diagnóstico y terapéuticos.

1. Moléculas Orgánicas

Se pueden analizar numerosas moléculas orgánicas en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Por ejemplo, en una realización de la descripción se pueden seleccionar moléculas orgánicas adecuadas o bien a partir de una genoteca química, donde los agentes químicos son analizados individualmente, o bien a partir de genotecas químicas combinatorias en los que se analizan múltiples compuestos de una vez, después se descifran para determinar y aislar la mayor parte de los compuestos activos.

Entre los ejemplos representativos de tales genotecas químicas combinatorias se incluyen los descritos por Agrafiotis et al., "System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.463.564; Armstrong, R.W., "Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds through the use of multiple component combinatorial array syntheses", WO 95/02566; Baldwin, J.J. et al., "Sulfonamide derivatives and their use", WO 95/24186; Baldwin, J.J. et al., "Combinatorial dihydrobenzopyran library", WO 95/30642; Brenner, S., "New kit for preparing combinatorial libraries", WO 95/16918; Chenery, B. et al., "Preparation of library of resin-bound aromatic carbocyclic compounds", WO 95/16712; Ellman, J.A., "Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.288.514; Felder, E. et al., "Novel combinatorial compound libraries", WO 95/16209; Lerner, R. et al., "Encoded combinatorial chemical libraries", WO 93/20242; Pavia, M.R. et al., "A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library", WO 95/04277; Summerton, J.E. y D.D. Weller, "Morpholino-subunit combinatorial library and method", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.506.337; Holmes, C., "Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazonones, and Derivatives thereof", WO 96/00148; Phillips, G.B. y G.P. Wei, "Solid-

phase Synthesis of Benzimidazoles", Tet. Letters 37:4887-90, 1996; Ruhland, B. et al., "Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse β -Lactams", J. Amer. Chem. Soc. 111:253-4, 1996; Look, G.C. et al., "The Identification of Cyclooxygenase-I Inhibitors from 4-Thiazolidonone Combinatorial Libraries", Bioorg. and Med. Chem. Letters 6:707-12, 1996.

2. Proteínas y Péptidos

Del mismo modo se pueden utilizar una amplia gama de proteínas y péptidos como moléculas candidato para inhibidores de la unión de la proteína de unión a un miembro de la familia del TGF-beta.

a. Genotecas Peptídicas Combinatorias

Las moléculas peptídicas que son supuestos inhibidores de la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta pueden ser obtenidas a través del escrutinio de genotecas peptídicas combinatorias. Tales genotecas pueden ser preparadas por un experto en la técnica (ver p.ej., Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.528.266 y 4.359.535, y Publicación del Tratado de Cooperación de Patentes Núm. WO 92/15679, WO 92/15677, WO 90/07862, WO 90/02809, o adquiridos de fuentes asequibles comercialmente (p.ej. New England Biolabs Ph.D.® Phage Display Peptide Library Kit).

b. Anticuerpos

Los anticuerpos que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta puede ser fácilmente preparada dada la descripción proporcionada en la presente memoria. En el contexto de la presente descripción, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-idiotípicos y fragmentos de anticuerpos (p.ej., Fab, y F(ab')₂, regiones variables F_v, o regiones determinantes de la complementariedad). Como se ha estudiado antes, se entiende que los anticuerpos son específicos contra la proteína de unión a TGF-beta, o contra un miembro de la familia del TGF-beta específico, si se unen con una K_a mayor o igual a 10⁷ M, preferiblemente mayor o igual a 10⁸ M⁻¹, y no se unen a otras proteínas de unión a TGF-beta, o, se unen con una K_a menor o igual a 10⁶ M⁻¹. Además, los anticuerpos de la presente descripción deben bloquear o inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de unión a TGF-beta.

La afinidad de un anticuerpo monoclonal o un patrón de unión; así como la inhibición de la unión se pueden determinar fácilmente por un experto normal en la técnica (ver, Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672, 1949).

En resumen, los anticuerpos monoclonales pueden ser generados fácilmente por un experto en la técnica a partir de una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, diversas aves, conejos, ratones o ratas. Típicamente, la proteína de unión a TGF-beta o un péptido único de la misma de 13-20 aminoácidos (conjugado preferiblemente con hemocianina de lapa ojo de cerradura mediante entrecruzamiento con glutaraldehído) es utilizada para inmunizar al animal a través de inyecciones intraperitoneales, intramusculares, intraoculares, o subcutáneas, junto con un coadyuvante tal como el coadyuvante completo o incompleto de Freund. Después de varias inmunizaciones de refuerzo, se recogen las muestras de suero y se someten a ensayo en cuanto a la reactividad con la proteína o péptido. Los antisueros policlonales particularmente preferidos darán una señal en uno de estos análisis que es al menos tres veces mayor que el fondo. Una vez que el título del animal ha alcanzado una meseta en términos su reactividad con la proteína, se pueden obtener fácilmente cantidades mayores de antisueros o bien mediante tomas de sangre semanales, o bien mediante exanguinación del animal.

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados fácilmente utilizando mecanismos convencionales (ver las Patentes de los Estados Unidos Núm. RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993, que se incorporan a la presente memoria como referencia; ver también Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kenett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980, y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, que también se incorporan a la presente memoria como referencia).

En resumen, en una realización se inmuniza un sujeto animal tal como una rata o ratón con la proteína de unión a TGF-beta o una porción de la misma como se ha descrito antes. La proteína puede ser mezclada con un coadyuvante tal como coadyuvante completo o incompleto de Freund con el fin de incrementar la respuesta inmune resultante. Entre una y tres semanas después de la inmunización inicial el animal puede ser inmunizado de nuevo con otra inmunización de refuerzo, y sometido a ensayo en cuanto a la reactividad con la proteína utilizando los análisis descritos antes. Una vez que el animal ha alcanzado una meseta en su reactividad con la proteína inyectada, éste se sacrifica, y los órganos que contienen un gran número de células B tales como el bazo y los nódulos linfáticos se cosechan.

Las células que se obtienen del animal inmunizado pueden ser immortalizadas mediante infección con un virus tal como el virus de Epstein-Barr (EBV) (ver Glasky and Reading, Hybridoma 8(4):377-389, 1989).

Alternativamente, en una realización preferida, las suspensiones del bazo y/o los nódulos linfáticos cosechados son fusionadas con una célula de mieloma adecuada con el fin de crear un "hibridoma" que secreta anticuerpo monoclonal. Entre las líneas de mieloma adecuadas se incluye, por ejemplo, NS-1 (ATCC Núm. TIB 18), y P3X63 - Ag 8.653 (ATCC Núm. CRL 1580).

Tras la fusión, las células son colocadas en placas para el cultivo de tejidos conteniendo un medio adecuado, tal como RPMI 1640, o DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), así como ingredientes adicionales, tales como suero bovino fetal (FBS, es decir, de Hyclone, Logan, Utah, o JRH Biosciences). Adicionalmente, el medio debe contener un reactivo que permita selectivamente el crecimiento de células de bazo y mieloma fusionadas tales como HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Después de aproximadamente siete días, las células fusionadas resultantes o hibridomas pueden ser rastreados con el fin de determinar la presencia de anticuerpos que sean reactivos contra la proteína de unión a TGF-beta (dependiendo del antígeno utilizado), y que bloqueen o inhiban la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

Se pueden utilizar una amplia variedad de análisis para determinar la presencia de anticuerpos que sean reactivos contra las proteínas de la presente invención, incluyendo por ejemplo la inmunoelectroforesis contracorrente, los radioinmunoanálisis, las radioinmunoprecipitaciones, los análisis de absorción con enzima ligada (ELISA), los análisis de transferencia puntual, las transferencias Western, la inmunoprecipitación, los análisis de inhibición o competitivos, y los análisis sandwich (ver las Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.376.110 y 4.486.530; ver también *Antibodies: A Laboratory manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Tras numerosas diluciones y re-análisis clónicas, se puede aislar un hibridoma que produzca anticuerpos reactivos contra la proteína deseada.

Asimismo se pueden utilizar otras técnicas para construir anticuerpos monoclonales (ver William D. Huse et al., "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281, Diciembre de 1989; ver también L. Sastry et al., "Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-5732, Agosto de 1989; ver también Michelle Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9, Enero 1990). Estas referencias describen un sistema comercial asequible de Stratagene (La Jolla, California) que permite la producción de anticuerpos por medio de mecanismos de recombinación. En resumen, el ARNm es aislado de una población de células B, y utilizado para crear genotecas de expresión de ADNc de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera en los vectores λ ImmunoZap(H) e ImmunoZap(L). Estos vectores pueden ser rastreados individualmente o expresados simultáneamente para formar fragmentos Fab o anticuerpos (ver Huse et al., supra; ver también Sastry et al., supra). Las placas positivas pueden ser convertidas con posterioridad en un plásmido no lítico que permita un elevado nivel de expresión de los fragmentos de anticuerpo monoclonal a partir de *E. coli*.

De un modo similar, también se pueden construir porciones o fragmentos, tales como fragmentos Fab y Fv, de anticuerpos utilizando mecanismos de digestión enzimática o de recombinación de ADN convencionales para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo que se une específicamente. En una realización, los genes que codifican la región variable de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de interés son ampliados utilizando cebadores nucleotídicos para la región variable. Estos cebadores pueden ser sintetizados por un experto normal en la técnica, o pueden ser adquiridos de fuentes asequibles comercialmente. Stratagene (La Jolla) vende cebadores para regiones variables de ratón y de humano incluyendo, entre otros, cebadores para las regiones $V_{H\alpha}$, $V_{H\beta}$, $V_{H\gamma}$, $V_{H\delta}$, C_{H1} , V_L y C_L . Estos cebadores pueden ser utilizados para amplificar las regiones variables de la cadena pesada o ligera, que pueden ser insertadas después en vectores tales como ImmunoZAP[®] H o ImmunoZAP[®] L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores pueden ser introducidos después en *E. coli*, levaduras, o sistemas de expresión basados en mamíferos. Utilizando estos mecanismos, se pueden producir grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla conteniendo una fusión de los dominios V_H y V_L (ver Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988). Además, semejantes técnicas pueden ser utilizadas para cambiar un anticuerpo "de ratón" por un anticuerpo "humano", sin alterar la especificidad de unión del anticuerpo.

Una vez que se han obtenido anticuerpos adecuados, éstos pueden ser aislados o purificados por medio de muchos mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica (ver *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Entre los mecanismos adecuados se incluyen columnas de afinidad de péptidos o proteínas, HPLC o RP-HPLC, purificación en columnas de proteína A o proteína G, o cualquier combinación de estos mecanismos.

c. Proteínas de unión a TGF-beta mutantes

Como se describe en la presente memoria y más abajo en los Ejemplos (p.ej., Ejemplos 8 y 9), las versiones alteradas de la proteína de unión a TGF-beta que compiten con la capacidad de la proteína de

unión a TGF-beta nativa para bloquear la actividad de un miembro de la familia de I TGF-beta concreto deben conducir a un incremento de la densidad ósea. De este modo, los mutantes de la proteína de unión a TGF-beta que se unen al miembro de la familia del TGF-beta pero no inhiben la función del miembro de la familia del TGF-beta satisfarían el criterio. Las versiones mutantes deben competir eficazmente con las funciones inhibitoras endógenas de la proteína de unión a TGF-beta.

d. Producción de proteínas

Aunque en la presente memoria se proporcionan varios genes (o porciones de los mismos), se debe entender que en el contexto de la presente descripción, la referencia a uno o más de estos genes incluye los derivados de los genes que son sustancialmente similares a los genes (y, cuando sea apropiado, las proteínas (incluyendo péptidos y polipéptidos) que están codificadas por los genes y sus derivados). Según se utiliza en la presente memoria, se cree que una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente similar" si: (a) la secuencia de nucleótidos está derivada de la región codificante de los genes descritos antes e incluye, por ejemplo, porciones de la secuencia o variaciones alélicas de las secuencias comentadas antes, o alternativamente, codifica una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta, (b) la secuencia de nucleótidos es susceptible de hibridación con las secuencias de nucleótidos de la presente invención en condiciones moderadamente restrictivas, altamente restrictivas o muy restrictivas (ver Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989); o (c) las secuencias de ADN son degeneradas como resultado del código genético de las secuencias de ADN definidas en (a) o (b). Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria incluye secuencias tanto complementarias como no complementarias, siempre que las secuencias satisfagan de otro modo los criterios expuestos en la presente memoria. En el contexto de la presente descripción, unas condiciones altamente restrictivas representan condiciones de hibridación normalizadas (p.ej., 5XSSPE, SDS al 0,5% a 65°C, o equivalente).

La estructura de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria puede ser pronosticada a partir de los productos de la traducción primarios utilizando la función de trazado del carácter hidrófobo, por ejemplo, de P/C Gene o Intelligenetics Suite (Intelligenetics, Mountain View, California), o de acuerdo con los métodos descritos por Kyte y Doolittle (J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982).

Las proteínas de la presente descripción pueden ser preparadas en forma de sales ácidas o alcalinas, o en forma neutra. Además, se pueden modificar los restos aminoácido individuales mediante oxidación o reducción. Además, se pueden realizar diversas sustituciones, deleciones, o adiciones en las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, cuyo efecto neto es conservar o intensificar o reducir adicionalmente la actividad biológica de la proteína mutante o de tipo natural. Por otra parte, debido a la degeneración del código genético, por ejemplo, puede haber una considerable variación en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos.

Entre otros derivados de las proteínas descritas en la presente memoria se incluyen los productos conjugados de las proteínas junto con otras proteínas o polipéptidos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la síntesis de proteínas de fusión N-terminales o C-terminales que pueden ser añadidas para facilitar la purificación o identificación de proteínas (ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.851.341, ver también, Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988). Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión tales como Flag/proteína de unión a TGF-beta con el fin de ayudar a la identificación, expresión y análisis de la proteína.

Las proteínas de la presente descripción pueden ser construidas utilizando una amplia variedad de mecanismos descritos en la presente memoria. Adicionalmente, se pueden introducir mutaciones en loci concretos sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligadura a fragmentos que contienen una secuencia natural. Tras la ligadura, la secuencia reconstruida resultante codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución, o delección deseada.

Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de mutagénesis de sitio específico (o de segmento específico) dirigidas al oligonucleótido para proporcionar un gen alterado que tenga codones concretos alterados según la sustitución, delección, o inserción requerida. Los métodos ejemplares de elaboración de las alteraciones mostradas antes son descritas por Walder et al. (*Gene* 42:133, 1986); Bauer et al., (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, Enero 1985, 12-19); Smith et al., (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); y Sambrook et al., (supra). Los derivados por delección o truncamiento de proteínas (p.ej. una porción extracelular soluble) también pueden ser construidos utilizando sitios para endonucleasas de restricción convenientes adyacentes a la delección deseada. Después de la restricción, los salientes pueden ser rellenados, y el ADN religado. Los métodos ejemplares de elaboración de alteraciones mostrados antes son descritos por Sambrook et al., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Las mutaciones que se realizan en las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción conservan preferiblemente el marco de lectura de las secuencias codificantes. Además, las mutaciones no crearán preferiblemente regiones complementarias que hibriden para producir estructuras de ARNm secundarias, tales como bucles u horquillas, que afectarían adversamente a la traducción de ARNm. Aunque se puede pre-determinar el sitio de la mutación, no es necesario que la naturaleza de la mutación sea pre-determinada per se. Por ejemplo, con el fin de seleccionar características óptimas de los mutantes en un sitio dado, se puede realizar una mutagénesis al azar en el codón diana y los mutantes expresados rastreados en cuanto a una actividad biológica indicativa. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en loci concretos sintetizando oligonucleótidos que contengan una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permitan la ligadura a fragmentos de la secuencia natural. Tras la ligadura, la secuencia reconstruida resultante codifica un derivado que tiene la inserción, sustitución, o delección de aminoácidos deseada.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de la presente descripción también pueden ser construidas utilizando mecanismos de mutagénesis por PCR, mutagénesis química (Drinkwater y Klinedinst, PNAS 83:34022-3406, 1986), mediante la incorporación errónea de un nucleótido forzada (p.ej., Liao y Wise Gene 88:107-111, 1990), o mediante el uso de oligonucleótidos mutagenizados al azar (Horwitz et al., Genome 3:112-117, 1989).

La presente descripción también proporciona la manipulación y la expresión de los genes descritos antes cultivando células anfitrionas que contienen un vector capaz de expresar los genes descritos antes. Entre tales vectores o constructos de vectores se incluyen moléculas de ácido nucleico derivadas de ADNc o sintéticas que codifican la proteína deseada, que están conectadas operablemente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados. Los elementos reguladores adecuados pueden estar derivados de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero, de insecto, o vegetales. La selección de los elementos reguladores apropiados depende de una de las células anfitrionas seleccionadas, y puede ser completada fácilmente por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos de los elementos reguladores se incluyen: un promotor y un intensificador transcripcionales o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, un terminador transcripcional, y una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas descritas antes pueden ser fácilmente expresadas por una amplia variedad de células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, incluyendo células bacterianas, de mamífero, levaduras u otros hongos, virales, de insecto, o vegetales. Los métodos para transformar o transfectar tales células para expresar el ADN foráneo son bien conocidos en la técnica (ver, p.ej., Itakura et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.704.362; Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929-1933, 1978; Murray et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.801.542; Upshall et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.349; Hagen et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.784.950; Axel et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.399.216; Goeddel et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.766.075; y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; para células vegetales ver Czako y Marton, Plant Physiol. 104:1067-1071, 1994; y Paszkowski et al., Biotech. 24:387-392, 1992).

Entre las células anfitrionas bacterianas adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, así como muchas otras especies bacterianas bien conocidas por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos representativos de las células anfitrionas bacterianas se incluyen DH5α (Stratagene, La Jolla, California).

Los vectores de expresión bacteriana comprenden preferiblemente un promotor que funcione en la célula anfitriona, uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, y un origen de replicación bacteriano. Entre los promotores representativos se incluye la β-lactamasa (penicilinas) y el sistema promotor de la lactosa (ver Chang et al., Nature 275:615, 1978), el promotor de la ARN polimerasa de T7 (Studier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990) el promotor lambda (Elvin et al., Gene 87:123-126, 1990), el promotor trp (Nichols y Yanofsky, Meth. In Enzymology 101::155, 1983) y el promotor tac (Russell et al., Gene 20:231, 1982). Entre los marcadores seleccionables representativos se incluyen diversos marcadores de resistencia a antibióticos tales como los genes de resistencia a kanamicina o ampicilina. Muchos plásmidos adecuados para transformar células anfitrionas son bien conocidos en la técnica, incluyendo entre otros, pBR322 (ver Bolivar et al., Gene 2:95, 1977), los plásmidos de pUC pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (ver Messing, Meth. in Enzymology 101:20-77, 1983 y Vieira y Messing, Gene 19:259-268, 1982), y pNH8A, pNH16A, pNH18A, y Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California).

Entre las células anfitrionas de levaduras y hongos adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen, entre otros, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus* (McKnight et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.349). Entre los vectores de expresión adecuados para las levaduras y hongos se incluyen, entre otros, YCp50 (ATCC Núm. 37419) para levaduras, y el vector de clonación de amdS pV3

(Turnbull, *Bio/Technology* 7:169, 1989), YRp7 (Struhl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039, 1978), YEp13 (Broach et al., *Gene* 8:121-133, 1979), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) y derivados de los mismos.

5 Entre los promotores preferidos para su uso en levaduras se incluyen los promotores de genes glicolíticos de levaduras (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255:12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-934, 1982) o genes de la alcohol deshidrogenasa (Young et al., en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Hollaender et al., (eds.), pág. 355, Plenum Nueva York, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101:192-201, 1983). Entre los ejemplos útiles de los promotores de hongos se incluyen
10 aquellos derivados de los genes glicolíticos de *Aspergillus nidulans*, tales como el promotor *adh3* (McKnight et al., *EMBO J.* 4:2093-2099, 1985). Las unidades de expresión también pueden incluir un terminador transcripcional. Un ejemplo de un terminador adecuado es el terminador *adh3* (McKnight et al., *ibid.*, 1985).

15 Como con los vectores bacterianos, los vectores de levadura incluirán generalmente un marcador seleccionable, que puede ser uno de los numerosos genes que muestran un fenotipo dominante para el cual existe un análisis fenotípico para permitir la selección de los transformantes. Los marcadores seleccionables preferidos son aquellos que complementan la auxotrofia de la célula anfitriona, proporcionan resistencia a antibióticos o permiten a una célula utilizar fuentes de carbono específicas, e
20 incluyen *leu2* (Broach et al., *ibid.*), *ura3* (Botstein et al., *Gene* 8:17, 1979), o *his3* (Struhl et al., *ibid.*). Otro marcador seleccionable adecuado es el gen *cat*, que confiere resistencia al cloramfenicol a células de levadura.

25 Las técnicas para transformar hongos son bien conocidas en la literatura, y han sido descritas, por ejemplo, por Beggs (*ibid.*), Hinnen et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978), Yelton et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1740-1747, 1984), y Russell (*Nature* 301:167-169, 1983). El genotipo de la célula anfitriona puede contener un defecto genético que sea complementado por el marcador seleccionable presente en el vector de expresión. La elección de un anfitrión y un marcador seleccionable concretos está dentro del nivel del experto normal en la técnica.

30 Los protocolos para la transformación de levaduras son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, se puede completar fácilmente o bien la preparación de esferoplastos de levadura con ADN (ver Hinnen et al., *PNAS USA* 75:1929, 1978) o mediante tratamiento con sales alcalinas tales como LiCl (ver Itoh et al., *J. Bacteriology* 153:163, 1983). La transformación de hongos también se puede
35 llevar a cabo utilizando polietilenglicol como describen Cullen et al., (*Bio/Technology* 5:369, 1987).

Entre los vectores virales se incluyen aquellos que comprenden un promotor que dirige la expresión de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una proteína deseada como se ha descrito antes. Se puede utilizar una amplia variedad de promotores en el contexto de la presente invención, incluyendo por
40 ejemplo, promotores tales como MoMLV LTR, RSV LTR, Friend MuLV LTR, promotores adenovirales (Ohno et al., *Science* 265:781-784, 1994), el promotor/intensificador de la fosfotransferasa de neomicina, el promotor del parvovirus tardío (Koering et al., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), el promotor TK del Herpes, el promotor de SV40, el intensificador/promotor del gen *Ila* de la metalotioneína, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, y el promotor tardío inmediato de citomegalovirus. En las
45 realizaciones particularmente preferidas de la descripción, el promotor es un promotor específico del tejido (ver, p.ej., WO 91/02805; EP 0.415.731; y WO 90/07936). Entre los ejemplos representativos de los promotores específicos de tejidos adecuados se incluyen el promotor de la enolasa específica neural, el promotor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas, el promotor de la proteína morfogénica del hueso, el promotor de la alfa1-quimerina humana, el promotor de la sinapsina I y el promotor de la
50 sinapsina II. Además de los promotores indicados antes, se pueden utilizar otros promotores específicos de virus (p.ej., promotores retrovirales, (incluyendo los indicados antes, así como otros tales como los promotores del HIV), promotores específicos de la hepatitis, el herpes (p.ej., EBV), y bacterianos, fúngicos o parásitos (p.ej., malaria) con el fin de elegir como diana una célula o tejido específico que esté infectado con un virus, bacteria, hongo o parásito.

55 Entre las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente descripción se incluyen, entre otros COS, CHO, SaOS, osteosarcomas, KS483, MG-63, osteoblastos primarios, y estroma de médula ósea de humano o mamífero. Entre los vectores de expresión en mamíferos para su uso en la realización de la presente descripción se incluirán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o un
60 ADNc. Entre los promotores preferidos se incluyen promotores virales y promotores celulares. Entre los promotores específicos del hueso se incluyen la sialo-proteína ósea y el promotor de la osteocalcina. Entre los promotores virales se incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (Boshart et al., *Cell* 41:521-530, 1985), el promotor tardío inmediato de citomegalovirus, el promotor de SV40 (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981), MMTV LTR, RSV LTR, metalotioneína-1, adenovirus
65 E1a. Entre los promotores celulares se incluyen el promotor de la metalotioneína-1 de ratón (Palmiter et al., *Patente de los Estados Unidos Núm.* 4.579.821), un promotor V_K de ratón (Bergman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983; Grant et al., *Nucl. Acids Res.* 15:5496, 1987) y un promotor V_H de

ratón (Loh et al., Cell 33:85-93, 1983). La elección del promotor dependerá, al menos en parte, del nivel de expresión deseado o de la línea celular receptora que vaya a ser transfectada.

Tales vectores de expresión también pueden contener un grupo de sitios de empalme de ARN localizados aguas abajo del promotor y aguas arriba de la secuencia de ADN que codifica el péptido o la proteína de interés. Los sitios de empalme de ARN preferidos pueden ser obtenidos a partir de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina. También se encuentra contenida en el vector de expresión una señal de poliadenilación localizada aguas abajo de la secuencia codificante de interés. Entre las señales de poliadenilación adecuadas se incluyen las señales de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región E1B de Adenovirus 5 y el terminador del gen de la hormona de crecimiento humana (De Noto et al., Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981). Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia líder viral no codificante, tal como el líder tripartito de Adenovirus 2, localizado entre el promotor y los sitios de empalme del ARN. Entre los vectores preferidos se pueden incluir también secuencias intensificadoras, tales como el intensificador de SV40. Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias que codifican los ARN Va de adenovirus. Los vectores de expresión adecuados pueden ser obtenidos a partir de fuentes comerciales (p.ej., Stratagene, La Jolla, California).

Los constructos vectores que comprenden secuencias de ADN clonadas pueden ser introducidos en células de mamífero, por ejemplo, mediante transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., Cell 14:725; Corsar y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham y Vand der Eb, Virology 52:456, 1973), electroporación (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982), o transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987). Para identificar células que tengan integrado establemente el ADNc clonado, generalmente se introduce un marcador seleccionable en las células junto con el gen o el ADNc de interés. Entre los marcadores seleccionables preferidos para su uso en células de mamífero cultivadas se incluyen los genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina, y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Los marcadores seleccionables amplificables preferidos son el gen DHFR y el gen de resistencia a la neomicina. Los marcadores seleccionables son revisados por Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts).

Las células de mamífero que contienen un vector adecuado se dejan crecer durante un período de tiempo, típicamente 1-2 días, para empezar a expresar la secuencia o las secuencias de ADN de interés. La selección del fármaco es aplicada después para seleccionar el crecimiento de las células que están expresando el marcador seleccionable de una manera estable. Para las células que han sido transfectadas con un marcador amplificable, seleccionable se puede incrementar la concentración de fármaco por etapas para seleccionar el número de copias de las secuencias aumentado de las secuencias clonadas, incrementando de ese modo los niveles de expresión. Las células que expresan las secuencias introducidas son seleccionadas y rastreadas en cuanto a la producción de la proteína de interés en la forma deseada o al nivel deseado. Las células que satisfacen estos criterios pueden ser clonadas después y aumentadas a escala para la producción.

Los protocolos para la transfección de células de mamífero son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Entre los métodos representativos se incluyen la transfección con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la transfección mediada por fusión retroviral, adenoviral y de protoplastos (ver Sambrook et al., *supra*). Asimismo pueden ser absorbidos constructos vectores desnudos por las células musculares u otras células adecuadas después de la inyección en el músculo de un mamífero (u otro animal).

Numerosas células anfitrionas de insecto conocidas en la técnica pueden resultar útiles en la presente descripción, a la luz de la memoria sujeto. Por ejemplo, el uso de baculovirus como vectores para expresar secuencias de ADN heterólogo en células de insecto ha sido revisado por Atkinson et al. (Pestic. Sci. 28:215-224, 1990).

Numerosas células anfitrionas vegetales conocidas en la técnica pueden asimismo resultar útiles en la presente descripción a la luz de la memoria sujeto. Por ejemplo, el uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar et al. (J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987).

En aspectos relacionados de la presente descripción, las proteínas de la presente descripción pueden ser expresadas en un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen un gen que codifica la proteína deseada y que están conectadas operablemente a un promotor eficaz para la expresión del gen. Alternativamente, de una manera similar se puede preparar animales transgénicos que carezcan del gen deseado (p.ej., ratones con un gen desactivado). Semejantes transgénicos pueden ser preparados en una variedad de animales no humanos, incluyendo ratones, ratas, conejos, ovejas, perros, cabras y cerdos (ver Hammer et al., Nature 315:680-683, 1985, Palmiter et al., Science 222:809-814,

1983, Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985, Palmiter y Brinster, Cell 41:343-345, 1985, y Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.175.383, 5.087.751, 4.736.866, 5.387.742, 5.347.075, 5.221.778, y 5.175.384). Brevemente, un vector de expresión, incluyendo una molécula de ácido nucleico que va a ser expresada junto con secuencias para el control de la expresión situadas adecuadamente, es introducido en pronúcleos de huevos fertilizados, por ejemplo, mediante microinyección. La integración del ADN inyectado es detectada mediante análisis de transferencia de ADN desde las muestras de tejido. Se prefiere que el ADN introducido sea incorporado a la línea germinal del animal de manera que pase a la progenie del animal. La expresión específica de tejidos puede ser lograda por medio del uso de un promotor específico de tejidos, o por medio del uso de un promotor inducible, tal como el gen promotor de la metalotioneína (Palmiter et al., 1983, *ibid.*), que permita la expresión regulada del transgen.

Las proteínas pueden ser aisladas, entre otros métodos, cultivando sistemas anfitriones y vectores adecuados para producir los productos de traducción recombinantes de la presente invención. Los sobrenadantes de tales líneas celulares, o las inclusiones de proteína o las células completas en las que la proteína es excretada al sobrenadante, pueden ser preparados después mediante una variedad de procedimientos de purificación con el fin de aislar las proteínas deseadas. Por ejemplo, el sobrenadante puede ser concentrado primero utilizando filtros de concentración de proteínas asequibles comercialmente, tales como una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la concentración, el producto concentrado puede ser aplicado a una matriz de purificación adecuada tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-proteína unido a un soporte adecuado. Alternativamente, se pueden emplear resinas de intercambio aniónico o catiónico con el fin de purificar la proteína. Como alternativa adicional, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para purificar adicionalmente la proteína. Otros métodos de aislamiento de las proteínas de la presente descripción son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se cree que una proteína está "aislada" en el contexto de la presente descripción si no se detecta otra proteína (no deseada) conforme al análisis de SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie. En otras realizaciones, de la descripción, la proteína deseada puede ser aislada de manera que no se detecte otra proteína (no deseada) conforme al análisis de SDS-PAGE seguido de tinción con plata.

3. Moléculas de Ácido Nucleico

En otros aspectos de la descripción, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que son capaces de inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Por ejemplo, en una realización de la descripción se proporcionan moléculas oligonucleotídicas antisentido que inhiben específicamente la expresión de las secuencias de ácido nucleico de la proteína de unión a TGF-beta (ver generalmente, Hirashima et al., en *Molecular Biology of ARN: New Perspectives* (M. Inouye y B.S. Dudock, eds., 1987 Academic Press, San Diego, pág. 401); *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (J.S. Cohen, ed., 1989 MacMillan Press, Londres); Stein y Cheng, *Science* 261:1004-1012, 1993; WO 95/10607; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.359.051; WO 92/06693; y EP-A2-612844). Brevemente, tales moléculas son construidas de manera que sean complementarias, y sean capaces de formar pares de bases de Watson-Crick, con una región de secuencia de ARNm de la proteína de unión a TGF-beta transcrita. El ácido de doble hebra resultante interfiere en la posterior maduración del ARNm, evitando de ese modo la síntesis de proteínas (ver Ejemplo 10).

En otros aspectos de la descripción se proporcionan ribozimas que son capaces de inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que "ribozimas" incluya moléculas de ARN que contengan secuencias antisentido para el reconocimiento específico, y una actividad enzimática de escisión del ARN. La hebra catalítica escinde un sitio específico en un ARN diana a una concentración mayor de la estequiométrica. Se pueden utilizar una amplia variedad de ribozimas en el contexto de la presente descripción, incluyendo por ejemplo, la ribozima cabeza de martillo (por ejemplo, como describen Forster y Symons, *Cell* 48:211-220, 1987; Haseloff y Gerlach, *Nature* 328:596-600, 1988; Walbot y Bruening, *Nature* 334:196, 1988; Haseloff y Gerlach, *Nature* 334:585, 1988); la ribozima en horquilla (por ejemplo, como describen Haseloff et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.254.678, expedida el 19 de Octubre de 1993, y Hempel et al., Solicitud de Patente Europea Núm. 0.360.257, publicada el 26 de Marzo de 1990); y ribozimas basadas en el ARN ribosomal de *Tetrahymena* (ver Cech et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.987.071). Las ribozimas de la presente descripción constan típicamente de ARN, pero también pueden estar compuestas por ADN, análogos de ácido nucleico (p.ej., fosforotioatos), o quiméricos de los mismos (p.ej., ADN/ARN/ARN).

4. Marcas

El producto génico o cualquiera de las moléculas candidato descritas antes y más abajo, pueden estar marcadas con una variedad de compuestos, incluyendo por ejemplo, moléculas fluorescentes, toxinas, y radionúclidos. Entre los ejemplos representativos de moléculas fluorescentes se incluyen fluoresceína, proteínas Phycobili, tales como ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y luciferasa. Entre los ejemplos

representativos de las toxinas se incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, proteína antiviral de *Phytolacca americana* ("pokeweed"), tritina, toxina de *Sigella*, y exotoxina A de *Pseudomonas*. Entre los ejemplos representativos de los radionúclidos se incluyen Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Ph-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-199, Au-203, At-211, Pb-212 y Bi-212. Además, los anticuerpos descritos antes también pueden ser marcados o conjugados con un par de un par de unión al ligando. Entre los ejemplos representativos se incluyen avidina-biotina, y riboflavina-proteína de unión a riboflavina.

Los métodos para conjugar o marcar las moléculas descritas en la presente memoria con las marcas representativas mostradas antes pueden ser fácilmente completados por un experto normal en la técnica (ver *Trichothecene Antibody Conjugate*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.744.981; *Antibody Conjugate*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.106.951; *Fluorogenic Materials and Labeling Techniques*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.018.884; *Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.255; y *Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics*, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.988.496; ver también Inman, *Methods In Enzymology*, Vol. 34, *Affinity Techniques*, *Enzyme Purification: Part B*, Jackoby y Wilchek (eds.), Academic Press, Nueva York, pág. 30, 1974; ver también Wilchek y Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988).

Composiciones farmacéuticas

Como se ha observado antes, la presente descripción también proporciona una variedad de composiciones farmacéuticas, que comprenden una de las moléculas descritas antes que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta junto con un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, excipientes o diluyentes. Generalmente, tales portadores pueden ser no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Normalmente, la preparación de tales composiciones abarca combinar el agente terapéutico con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con seralbúmina no específica son diluyentes apropiados ejemplares.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden ser preparadas para su administración mediante una variedad de rutas diferentes. Además, las composiciones farmacéuticas pueden ser colocadas en recipientes, junto con material de envasado que proporcione instrucciones referentes al uso de tales composiciones farmacéuticas. Generalmente, semejantes instrucciones incluirán una expresión tangible describiendo la concentración de reactivo, así como ciertas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (p.ej., agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarias para reconstituir la composición farmacéutica.

Tratamiento

La presente invención también proporciona el incremento del contenido mineral y la densidad mineral del hueso. En resumen, numerosas afecciones dan como resultado la pérdida de contenido mineral del hueso, incluyendo por ejemplo, las enfermedades, la predisposición genética, los accidentes que producen la pérdida de uso de un hueso (p.ej. debido a una fractura), los agentes terapéuticos que afectan a la resorción ósea, o que eliminan células formadoras de hueso y el envejecimiento normal. Por medio del uso de las moléculas descritas en la presente memoria que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta se pueden tratar o prevenir tales afecciones. Según se utiliza en la presente memoria, se debe entender que el contenido mineral del hueso ha aumentado, si el contenido mineral del hueso ha aumentado de una manera estadísticamente significativa (p.ej., mayor de media desviación estándar), en un sitio seleccionado.

Una amplia variedad de afecciones que dan como resultado la pérdida de contenido mineral del hueso pueden ser tratadas con las moléculas descritas en la presente memoria. Los pacientes con tales afecciones pueden ser identificados a través de la diagnosis clínica utilizando mecanismos bien conocidos (ver, p.ej., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, Inc.). Entre los ejemplos representativos de las enfermedades que pueden ser tratadas se incluyen las displasias, en las que existe un crecimiento o desarrollo anormal del hueso. Entre los ejemplos representativos de tales afecciones se incluyen acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, enfermedad de Marfan, exostosis hereditaria múltiple, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoikilosis, lesiones escleróticas, fracturas, enfermedad periodontal, pseudoartrosis y osteomielitis piogénica.

Entre otras afecciones que pueden ser tratadas o evitadas se incluyen una amplia variedad de causas de osteopenia (es decir, una afección que ocasiona una desviación estándar mayor de uno de contenido

mineral o densidad del hueso por debajo del contenido mineral esquelético pico en la juventud). Entre los ejemplos representativos de tales afecciones se incluyen los estados anémicos, las afecciones causadas por esteroides, las afecciones causadas por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia en calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia y osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes melitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria y osteomalacia.

En un aspecto de la presente descripción proporciona, se puede incrementar el contenido mineral o la densidad de hueso administrando a un animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Entre los ejemplos de los animales de sangre caliente que se pueden tratar se incluyen tanto vertebrados como mamíferos, incluyendo por ejemplo, caballos, vacas, cerdos, ovejas, perros, gatos, ratas y ratones. Entre los ejemplos representativos de las moléculas terapéuticas se incluyen ribozimas, genes de ribozimas, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos (p.ej., anticuerpos humanizados).

En otros aspectos de la presente descripción se proporcionan métodos para incrementar la densidad de hueso que comprende la etapa de introducir en las células que anidan en el hueso un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta, y administrar las células que contienen el vector a un animal de sangre caliente. Brevemente, las células que anidan en el hueso pueden ser obtenidas directamente a partir del hueso de pacientes (p.ej., células obtenidas a partir de médula ósea tales como CD34+, osteoblastos, osteocitos, y similares), a partir de sangre periférica, o a partir de cultivos.

Un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta es introducido en las células. Entre los ejemplos representativos de los vectores adecuados se incluyen vectores virales tales como vectores virales del herpes (p.ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.288.641), vectores adenovirales (p.ej., WO 94/26914, WO 93/9191; Kolls et al., PNAS 91(1):215-219, 1994; Kass-Eisler et al., PNAS 90(24):11498-502, 1993; Guzman et al., Circulation 88(6):2838-48, 1993; Guzman et al., Cir. Res. 73(6):1202-1207, 1993; Zabner et al., Cell 75(2):207-216, 1993; Li et al., Hum Gene Ther. 4(4):403-409, 1993; Caillaud et al., Eur. J. Neurosci. 5(10):1287-1291, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5(2):130-134, 1993; Jaffe et al., Nat. Genet. 1(5):372-378, 1992; y Levrero et al., Gene 101(2):195-202, 1991), vectores virales adenoasociados (WO 95/13365; Flotte et al., PNAS 90(22):10613-10617, 1993), vectores de baculovirus, vectores de parvovirus (Koering et al., Hum. Gene Therap. 5:457-463, 1994), vectores de poxvirus (Panicali y Paoletti, PNAS 79:4927-4931, 1982; y Ozaki et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193(2):653-660, 1993), y retrovirus (p.ej., EP 0.415.731; WO 90/07936; WO 91/0285; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.219.740; WO 93/11239; WO 93/10218). Del mismo modo se pueden construir vectores virales que contengan una mezcla de elementos diferentes (p.ej., promotores, secuencias de la envuelta y similares) de diferentes virus, o fuentes no virales. En varias realizaciones, se puede utilizar o bien el propio vector viral, o bien una partícula viral que contenga el vector viral en los métodos y composiciones descritos más abajo.

En otras realizaciones de la descripción, las moléculas de ácido nucleico que codifican una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta por sí mismas pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, la administración a asialomucoide (ASOR) conjugado con complejos de poli-L-lisina ADN (Cistano et al., PNAS 92:122-92126, 1993), ADN unido a adenovirus muerto (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3(2):147-154, 1992), introducción mediada por citofectina (DMRIE-DOPE, Vical, California), inyección de ADN directa (Acsadi et al., Nature 352:815-818, 1991); ligandos de ADN (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989); lipofección (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989); liposomas (Pickering et al., Circ. 89(1):13-21, 1994; y Wang et al., PNAS 84:7851-7855, 1987); bombardeo con microproyectiles (Williams et al., PNAS 88:2726-2730, 1991); y liberación directa de ácido nucleicos que codifican la propia proteína ya sea sola (Vile y Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993) o utilizando complejos de PEG-ácido nucleico.

Entre los ejemplos representativos de las moléculas que pueden ser expresadas por los vectores de la presente descripción se incluyen ribozimas y moléculas antisentido, cada uno de las cuales se ha discutido con más detalle antes.

La determinación del contenido mineral del hueso incrementado puede ser resuelta directamente por medio del uso de los rayos x (p.ej., Dual Energy X-ray Absorptometry o "DEXA"), o mediante inferencia a través de marcadores de recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, procolágeno de tipo 1, propéptido C' (PICP), y fosfatasa alcalina total; ver Comier, C., Curr. Opin. In Rheu. 7:243, 1995), o marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinaria, fosfatasas ácidas tartrato-resistentes del plasma y galactosilhidroxilisina; ver Comier, *supra*). La

cantidad de masa ósea puede ser calculada a partir de los pesos corporales, o utilizando otros métodos (ver Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. And Rel. Res. 5:177-181, 1984).

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la cantidad y la frecuencia de la administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación que esté siendo tratada, de la respuesta deseada, de la condición del paciente, etcétera. Típicamente, las composiciones pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, como se ha indicado antes. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplos 1

Mapas de esclerosteosis para el brazo largo del cromosoma 17 humano

El cartografiado genético del defecto responsable de la esclerosteosis en humanos localizó el gen responsable de este trastorno en la región del cromosoma 17 humano que codifica un miembro novedoso de la familia de la proteína de unión a TGF-beta. En la esclerosteosis, el hueso esquelético presenta un incremento sustancial en la densidad mineral en relación con la de los individuos no afectados. El hueso de la cabeza también presenta un sobrecrecimiento. Los pacientes con esclerosteosis son generalmente sanos aunque pueden mostrar grados variables de sindactilia al nacer y grados variables de compresión craneal y compresión nerviosa en el cráneo.

El análisis de conexión del defecto del gen asociado con la esclerosteosis fue realizado aplicando el método del cartografiado por homocigosidad a muestras de ADN recogidas de 24 familias de Afrikaaner de Suráfrica en las cuales se producía la enfermedad. (Sheffield et al., 1994, Human Molecular Genetics 3:1331-1335. "Identification of a Badet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). La población Afrikaaner de Suráfrica es generalmente homogénea; la población descende de un pequeño número de fundadores que colonizaron el área hace varios siglos, y ha estado aislada por barreras geográficas y sociales desde su fundación. La esclerosteosis es rara en todo el mundo fuera de la comunidad Afrikaaner, lo que sugiere que se encontraba presente una mutación en el gen en la población fundadora y ha aumentado de número junto con el crecimiento de la población. El uso del cartografiado de homocigosidad se basa en la suposición de que es probable que los marcadores del cartografiado del ADN adyacentes a una mutación recesiva sean homocigotos en los individuos afectados de familias consanguíneas y en poblaciones aisladas.

Se seleccionó un grupo de 371 marcadores microsatélites (Research Genetics, Set 6) de los cromosomas autosómicos para tipificar reservas de ADN de muestras de pacientes con esclerosteosis. Las muestras de ADN para este análisis procedían de 29 pacientes con esclerosteosis de 24 familias, 59 miembros de familias no afectadas y un grupo de individuos de control no emparentados de la misma población. Las reservas constaban de 4-6 individuos, individuos afectados, individuos afectados de familias consanguíneas, padres y hermanos no afectados, o controles no emparentados. En las reservas de individuos no relacionados y en la mayor parte de las reservas con individuos afectados o miembros de la familia, los análisis de los marcadores demostraron numerosos tamaños de alelos para cada marcador. Un marcador, D17S1299, mostraba una indicación de homocigosidad: una banda en algunas de las reservas de individuos afectados.

Las 24 familias con esclerosteosis fueron tipificadas con un total de 19 marcadores en la región D17S1299 (en 17q12-q21). Los individuos afectados de cada familia demostraron ser homocigotos en esta región, y 25 de los 29 individuos eran homocigotos para un haplotipo central; cada uno tenía los mismos alelos entre D17S1787 y D17S930. Los otros cuatro individuos tenían un cromosoma que se emparejaba con este haplotipo y un segundo que no. En suma, los datos sugerían de modo convincente que esta región de 3 megabases contenía la mutación de la esclerosteosis. El análisis de la secuencia de la mayor parte de los exones de esta región de 3 megabases identificaba una mutación terminadora en la secuencia codificante de la proteína de unión a TGF novedosa (mutación C>T en la posición 117 del SEQ ID NO. 1 da como resultado un codón de terminación). Se demostró que esta mutación era única para los pacientes con esclerosteosis y los portadores de los descendientes de Afrikaaner. La identidad del gen fue confirmada adicionalmente identificando una mutación en su intrón (mutación A>T en la posición +3 del intrón) que da como resultado una maduración del ARNm inapropiada en un paciente no emparentado, individual con esclerosteosis diagnosticada.

Ejemplo 2

Especificidad de tejidos de la expresión del gen de la proteína de unión a TGF-beta

A. Expresión del Gen Beer Humano mediante RT-PCR

Se preparó un ADNc de primera hebra a partir de las siguientes muestras de ARN total utilizando un kit asequible comercialmente ("Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis", Life Technologies, Rockville, MD): cerebro humano, hígado humano, bazo humano, timo humano, placenta humana, músculo esquelético humano, tiroides humano, pituitaria humana, osteoblastos humanos (NH0st de Clonetics Corp., San Diego, CA), línea celular de osteosarcoma humano (Saos-2, ATCC# HTB-85), hueso humano, médula ósea humana, cartílago humano, hueso de mono Vervet, *Saccharomyces cerevisiae* y monocitos de sangre periférica humana. Todas las muestras de ARN fueron adquiridas de una fuente comercial (Clontech, Palo Alto, CA), excepto las siguientes que fueron preparadas por la empresa: osteoblasto humano, línea celular de osteosarcoma humano, hueso humano, cartílago humano y hueso de mono Vervet. Estas muestras de ARN preparadas en la empresa fueron preparadas utilizando un kit asequible comercialmente ("TRI Reagent", Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

La PCR fue realizada sobre estas muestras, y adicionalmente sobre una muestra genómica como control. El oligonucleótido Beer efector tenía la secuencia 5'-CCGGAGCTGGAGAACACAAG-3' (SEC ID NO: 19). El cebador oligonucleotídico Beer antisentido tenía la secuencia 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 20). Además, se realizó la PCR utilizando cebadores para el gen de la beta-actina humana, como control. El cebador oligonucleotídico de la beta-actina-efector tenía la secuencia 5'-AGGCCAACC GCGAGAAGATGA CC-3' (SEC ID NO: 21). El cebador oligonucleotídico de la beta-actina antisentido tenía la secuencia 5'-GAAGT CCAGGCGACGTAGCA-3' (SEC ID NO: 22). La PCR se realizó utilizando condiciones normalizadas en reacciones de 25 µl, con una temperatura de hibridación de 61 grados Celsius. Se llevaron a cabo 32 ciclos de PCR con los cebadores Beer y veinticuatro ciclos con los cebadores de la beta-actina.

Tras la amplificación, se analizaron 12 µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Ver Figura 2A.

B. Hibridación In-situ de ARN de Secciones Embrionarias de Ratón:

El ADNc Beer de ratón completo (Secuencia de ID Núm: 11) fue clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en las direcciones antisentido y efectora utilizando el protocolo del fabricante. Los transcritos efector y antisentido de ARNc marcado con S³⁵-alfa-GTP fueron sintetizados utilizando reactivos de transcripción in vitro suministrados por Ambion, Inc. (Austin, TX). La hibridación in situ fue realizada de acuerdo con los protocolos de Lyons et al. (J. Cell Biol. 111:2427-2436, 1990).

La sonda de ARNc Beer de ratón detectaba un mensaje específico expresado en el tubo neural, los blastemas, los vasos sanguíneos y los cartílagos de osificación de los embriones de ratón en desarrollo. El Panel A de la Figura 3 muestra expresión en la cresta ectodérmica apical (aer en sus siglas en inglés) del blastema (l en sus siglas en inglés), los vasos sanguíneos (bv en sus siglas en inglés) y el tubo neural (nt en sus siglas en inglés). El panel B muestra la expresión en el 4º ventrículo del cerebro (4). El Panel C muestra la expresión en la mandíbula (ma), en las vértebras cervicales (cv), el hueso occipital (oc), el paladar (pa) y los vasos sanguíneos (bv). El panel D muestra la expresión en las costillas (r) y en la válvula del corazón (va). El panel A es una sección transversal de embrión de 10,5 dpc. El panel B es una sección sagital de embrión de 12,5 dpc y los paneles C y D son secciones sagitales de embriones de 15,5 dpc. Ba= arco branquial, h=corazón, te=telencéfalo (prosencéfalo), b=cerebro, f=masa frontal, g=intestino, j=mandíbula, li=hígado, lu=pulmón, ot=vesícula ótica, ao=, sc=médula espinal, skm=músculo esquelético, na=seno nasal, th=timo, to=lengua, fl=miembro anterior, di=diafragma.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de proteína beer recombinante

A. Expresión en células COS-1:

La secuencia de ADN que codifica la proteína Beer humana completa fue amplificada utilizando los siguientes cebadores oligonucleotídicos para PCR. El cebador oligonucleotídico 5' tenía la secuencia 5'-AAGCTTGGTACCATGCAGCTCCAC-3' (SEC ID NO: 23) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de 19 nucleótidos del gen Beer empezando 6 pares de bases antes del presunto codón de iniciación amino terminal (ATG). El cebador oligonucleotídico 3' tenía la secuencia 5'-AAGCTTCTACTTGTCATCGTCGTCCT TGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-3' (SEC ID NO: 24) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de un codón de terminación complementario inverso (CTA) seguido del complemento inverso del epítipo FALG (subrayado, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) flanqueado por el complemento inverso de nucleótidos que codifican los 5 aminoácidos carboxi terminales de Beer. El producto de la PCR fue clonado con TA ("Original TA Cloning Kit", Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones individuales fueron rastreados mediante secuenciación del ADN. Un clon de secuencia verificada fue digerido después por HindIII y purificado sobre gel de agarosa al 1,5% utilizando reactivos asequibles comercialmente ("Qiaquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Valencia, CA). Este fragmento fue ligado después al plásmido pcDNA3.1 tratado con fosfatasa, digerido

con HindIII y cultivado en placa sobre placas LB con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias que portaban el recombinante deseado en la orientación apropiada fueron identificados mediante escrutinio basado en PCR, utilizando un cebador 5' correspondiente al sitio promotor/cebador de T7 en pcDNA3.1 y un cebador 3' con la secuencia 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 25) que corresponde al complemento inverso de la secuencia BEER interna. La secuencia del fragmento clonado fue confirmada mediante secuenciación del ADN.

Se utilizaron células COS-1 (ATCC #CRL-1650) para la transfección. Se transfectaron 50 µg del plásmido de expresión pcDNA-Beer-Flag utilizando un kit asequible comercialmente siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante ("DEAE-Dextran Transfection Kit", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El medio final tras la transfección era DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) conteniendo Suero Bovino Fetal al 0,1%. Al cabo de 4 días de cultivo, el medio se separó. La expresión de BEER recombinante fue analizada mediante SDS-PAGE y Transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). La purificación de la proteína BEER recombinante se realizó utilizando una columna de afinidad M2 anti-FLAG ("Mammalian Transient Expression System", Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). El perfil de la columna fue analizado vía SDS-PAGE y Transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG.

B. Expresión en células de insecto SF9

La secuencia del gen Beer humano fue amplificada utilizando la PCR con condiciones normalizadas y los siguientes cebadores:

Cebador efector: 5'-GTCGTCGGATCCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAT-GAT-3' (SEC ID NO: 26)

Cebador antisentido: 5'-GTCGTCAAGCTTCTACTTGTCATCGTCCTTGAGTCTA
GGCGTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEC ID NO: 27)

El ADNc resultante contenía la región codificante de Beer con dos modificaciones. La señal de secreción N-terminal se había eliminado y la etiqueta del epítipo FLAG (Sigma) estaba fusionada en marco con el extremo C-terminal del inserto. Se añadieron los sitios de clonación BamHI y HindIII y el gen fue subclonado en el vector pMelBac (Invitrogen) para la transferencia a un vector baculoviral utilizando métodos normalizados.

Los baculovirus recombinantes que expresaban la proteína Beer fueron elaborados utilizando el kit de transfección Ba-N-blue (Invitrogen) y purificados según las instrucciones de los fabricantes.

Las células SF9 (Invitrogen) fueron mantenidas en medio TNM_FH (Invitrogen) conteniendo suero de ternera fetal al 10%. Para la expresión de la proteína, los cultivos de SF9 en matraces con extensor de centrifugación ("Spinner") a una MOI de más de 10. Las muestras de los medios y de las células fueron tomadas diariamente durante cinco días, y la expresión de Beer fue controlada mediante transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma) o antisero policlonal de conejo anti-Beer.

Al cabo de cinco días las células SF9 infectadas con baculovirus fueron recogidas mediante centrifugación y la proteína asociada a las células fue extraída del sedimento celular utilizando un tampón de extracción de elevada contenido de sal (NaCl 1,5 M, Tris 50 mM pH 7,5). El extracto (20 ml por 300 ml de cultivo) fue aclarado mediante centrifugación, sometido a diálisis tres veces frente a cuatro litros de solución salina tamponada con Tris (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,5), y aclarado de nuevo mediante centrifugación. Esta fracción con elevado contenido de sal fue aplicada a Hitrap Heparin (Pharmacia: 5 ml de volumen de lecho), lavada extensamente con solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25 mM 7,5, NaCl 150 mM) y las proteínas unidas se hicieron eluir con un gradiente de NaCl 150 mM a NaCl 1200 mM. La elución de Beer fue observada a un NaCl aproximadamente 800 mM. Las fracciones que contenían Beer fueron suplementadas con glicerol al 10% y DTT 1 mM y congeladas a -80°C.

Ejemplo 4

Preparación y ensayo de anticuerpos policlonales para Beer, Gremlin, y Dan

A. Preparación de antígeno

Las secuencias de ADN de *Beer* humana, *Gremlin* humana, y *Dan* humana fueron amplificadas utilizando métodos de PCR normalizados con los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

Beer H

Efector: 5'-GACTTGGATCCCAGGGGTGGCAGGCGTTC-3' (SEC ID NO: 28)

Antisentido: 5'-AGCATAAGCTTCTAGTAGGCGTTCTCCAG-3' (SEC ID NO: 29)

Gremlin H.

Efector: 5'-GACTTGGATCCGAAGGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEC ID NO: 30)
 Antisentido: 5'-AGCATAAGCTTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEC ID NO: 31)

Dan H.

Efector: 5'-ACTACGAGCTCGGCCCCACCACCCATCAACAAG-3' (SEC ID NO: 32)
 Antisentido: 5'-ACTTAGAAGCTTTCAGTCCTCAGCCCCCTCTTTCC-3' (SEC ID NO: 33)

En cada caso los cebadores enumerados amplificaban la región codificante completa menos la secuencia señal de secreción. Entre estos se incluyen los sitios de restricción para la subclonación en el vector de expresión bacteriano pQE-30 (Qiagen Inc., Valencia) en los sitios BamHI/HindIII para Beer y Gremlin, y en los sitios SacI/HindIII para Dan. pQE30 contiene una secuencia codificante para la etiqueta 6x His en el extremo 5' de la región de clonación. Los constructos completados fueron transformados en *E. coli* cepa M-15/pRep (Qiagen Inc.) y los clones individuales fueron verificados por secuenciación. La expresión de la proteína en M-15/pRep y la purificación (unión de la etiqueta de afinidad 6xHis a Ni-NTA acoplado con Sepharose) fueron realizadas como describen los fabricantes (Qiagen, The QIAexpressionist).

La proteína Beer derivada de *E. coli* fue recuperada en una cantidad significativa utilizando la solubilización en guanidina 6M y sometida a diálisis a 2-4M para evitar la precipitación durante el almacenamiento. Las proteínas Gremlin y Dan fueron recuperadas en una cantidad superior con solubilización en guanidina 6M y una concentración de guanidina post-purificación de 0,5M.

B. Producción y ensayo de anticuerpos policlonales

Se produjeron anticuerpos policlonales para cada uno de los tres antígenos en anfitriones como conejo y pollo utilizando los protocolos normalizados (R & R Antibody, Stanwood, WA; protocolo normalizado para inmunización de conejo y recuperación de antisuero; Short Protocols in Molecular Biology, 2ª edición, 1992. 11.37-11.41. Contributors Helen M. Cooper and Yvonne Paterson; el suero de pollo fue generado con Strategic Biosolutions Ramona, CA).

El antisuero de conejo y la fracción IgY de huevo de pollo fueron rastreados en cuanto a la actividad vía transferencia Western. Cada uno de los tres antígenos fue separado mediante PAGE y transferido a nitrocelulosa de 0,45 µm (Novex, San Diego, CA). La membrana fue cortada en tiras conteniendo cada tira aproximadamente 75 ng de antígeno. Las tiras fueron bloqueadas en Blottig Grade Block al 3% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y lavadas 3 veces en 1X solución salina tamponada con Tris (TBS)/tampón Tween al 0,02%. El anticuerpo primario (tomas de sangre pre-inmunización, antisuero de conejo o IgY de huevo de pollo en diluciones que oscilaban de 1:100 a 1:10.000 en tampón de bloqueo) fue incubado con las tiras durante una hora con un balanceo suave. Una segunda serie de tres lavados 1X TBS/TWEEN al 0,02% estuvo seguida de una incubación de una hora con el anticuerpo secundario (anti-conejo de burro conjugado con peroxidasa, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; o anti-polli de burro conjugado con peroxidasa, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se realizó un ciclo final de 3X lavados de 1X TBS/TWEEN al 0,02% y las tiras fueron desarrolladas con Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

C. Ensayo de reactividad cruzada con anticuerpo:

Siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, se incubaron tiras de Beer, Gremlin o Dan con diluciones (1:5000 y 1:10.000) de sus respectivos antisueros de conejo o IgY de huevo de pollo así como antisuero o lgy de huevo de pollo (diluciones 1:1000 y 1:5000) elaborados para los dos antígenos restantes. Los niveles incrementados de anticuerpos que no se emparejaban fueron realizados para detectar la unión de baja afinidad por los anticuerpos que pueden ser observados solamente a una concentración elevada. El protocolo y la duración del desarrollo son los mismos para los tres eventos de unión utilizando el protocolo descrito antes. No se observaba reactividad cruzada con el antígeno para ninguno de los antígenos sometidos a ensayo.

Ejemplo 5**Interacción de Beer con proteínas de la superfamilia de TGF-beta**

La interacción de Beer con las proteínas de diferentes ramas filogenéticas de la súper-familia del TGF-β fue estudiada utilizando métodos de inmunoprecipitación. Se obtuvieron TGFβ-1, TGFβ-2, TGFβ-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y GDNF a partir de fuentes comerciales (R & D systems; Minneapolis, MN). Un protocolo representativo es el siguiente. Se sometió a diálisis Beer parcialmente purificada en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25 mM 7,5, NaCl 150 mM). Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas en 300 µl de tampón IP (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1,4 mM, triton X-100 al 0,5%, y glicerol al 10%). Se aplicaron 30 ng de proteína BMP-5 humana recombinante

(R & D systems) a 15 µl de matriz de afinidad FLAG (Sigma, St. Louis MO)) en presencia y ausencia de 500 ng de Beer marcada con el epítipo FLAG. Las proteínas fueron incubadas durante 4 horas @ 4°C y después las proteínas asociadas con la matriz de afinidad fueron lavadas cinco veces en tampón IP (1 ml por lavado). Las proteínas unidas se hicieron eluir de la matriz de afinidad en 60 microlitros de 1X tampón de muestra SDS PAGE. La proteínas fueron resueltas mediante SDS PAGE y la Beer asociada con BMP-5 fue detectada mediante transferencia Western utilizando antisuero anti-BMP-5 (Research Diagnostics, Inc.) (ver la Figura 5).

Análisis de Unión al Ligando Beer

La proteína FLAG-Beer (20 ng) es añadida a 100 µl de PBS/BSA al 0,2% y adsorbida en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma; St Louis MO) y bloqueada con BSA en PBS al 10%. Esto se realiza a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Esta solución de proteína se separa y los pocillos se lavan para separar la proteína no unida. Se añade BMP-5 a cada pocillo a concentraciones que oscilan de 10 pM a 500 nM en PBS/BSA al 0,2% y se incuba durante 2 horas a la temperatura ambiente. La solución de unión se separa y la placa se lava tres veces con volúmenes de 200 µl de PBS/BSA al 0,2%. Los niveles e BMP-5 son detectados utilizando anti-suero BMP-5 vía ELISA (F.M. Ausubel et al. (1998) Current Protocols in Mol. Biol. Vol. 2 11.2.1-11.2.22). La unión específica se calcula sustrayendo la unión no específica de la unión total y se analiza mediante el programa LIGAND (Munson y Podbard, Anal. Biochem., 107, pág. 220-239, (1980). En una variación de este método, se diseña Beer y se expresa como una proteína de fusión con Fc human. Del mismo modo el BMP ligando se diseña y se expresa como una fusión con Fc de ratón. Estas proteínas son incubadas juntas y el análisis es realizado como describe Mellor et al. utilizando la detección de fluorescencia de resolución con el tiempo (G.W. Mellor et al., J. of Biomol Screening, 3(2) 91-99, 1998).

Ejemplo 6

Análisis de escrutinio para la inhibición de la unión de la proteína de unión a TGF-beta a miembros de la familia de TGF-beta

El análisis descrito antes se repite con dos excepciones. Primero, la concentración de BMP se mantiene fija a la Kd determinada previamente. Segundo, se añade una colección de candidatos antagonistas a una concentración fijada (20 µM en el caso de las colecciones de moléculas orgánicas pequeñas y 1 µM en estudios con anticuerpo). Entre estas moléculas candidato (antagonistas) de la unión a la proteína de unión a TGF-beta se incluyen compuestos orgánicos derivados de colecciones comerciales o internas que representan diversas estructuras químicas. Estos compuestos son preparados en forma de soluciones de partida en DMSO y son añadidas a pocillos de análisis a $\leq 1\%$ del volumen final en condiciones de análisis normalizadas. Estas son incubadas durante 2 horas a la temperatura ambiente con BMP y Beer, la solución es separada y el BMP unido es cuantificado como se ha descrito. Los agentes que inhiben el 40% de la unión a BMP observada en ausencia de compuesto o anticuerpo son considerados antagonistas de esta interacción. Estos son evaluados adicionalmente como inhibidores potenciales basándose en estudios de titulación para determinar sus constantes d inhibición y su influencia sobre la afinidad de unión de la proteína de unión a TGF-beta. Asimismo se pueden llevar a cabo análisis de control de la especificidad comparables para establecer el perfil de selectividad para el antagonista identificado a través de estudios en los que se utilizan análisis dependientes de la acción del ligando BMP (p.ej., estudio de competición BMP/receptor de BMP).

Ejemplo 7

Inhibición de la localización de la proteína de unión a TGF-beta a la matriz del hueso

La evaluación de la inhibición de la localización en la matriz del hueso (hidroxiapatita) se realiza utilizando modificaciones del método de Nicolas (Nicolas, V. Calcif Tissue Int. 57:206, 1995). Brevemente, la proteína de unión a TGF-beta marcada con I¹²⁵ es preparada como describe Nicolas (supra). La hidroxiapatita es añadida a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos equipada con una membrana de filtración de polipropileno (Polyfiltronic, Weymouth MA). La proteína de unión a TGF-beta es añadida a albúmina al 0,2% en tampón PBS. Los pocillos que contienen la matriz son lavados 3 veces con este tampón. La proteína de unión a TGF-beta adsorbida se hace eluir utilizando NaOH 0,3M y se cuantifica.

La identificación del inhibidor se lleva a cabo por medio de la incubación de la proteína de unión a TGF-beta con moléculas de ensayo y aplicando la mezcla a la matriz como se ha descrito antes. La matriz se lava 3 veces con albúmina al 0,2% en tampón PBS. La proteína de unión a TGF-beta adsorbida se hace eluir utilizando NaOH 0,3M y se cuantifica. Los agentes que inhiben el 40% de la unión de la proteína de unión a TGF-beta observada en ausencia de compuesto o anticuerpo son considerados inhibidores de la localización ósea. Estos inhibidores se caracterizan adicionalmente por los estudios dosis-respuesta para determinar sus constantes de inhibición y su influencia sobre la afinidad de unión de la proteína de unión a

TGF-beta.

Ejemplo 8

5 Construcción de mutantes de la proteína de unión a TGF-beta

A. Mutagénesis

Un ADNc de la proteína de unión a TGF-beta completo en pBluescript SK sirve como molde para la mutagénesis. En resumen, los cebadores apropiados (ver el estudio proporcionado en la presente memoria) son utilizados para generar el fragmento de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la polimerasa Vent DNA (New England Biolabs, Beverly, MA). La reacción en cadena de la polimerasa se hace funcionar durante 23 ciclos en tampones proporcionados por el fabricante utilizando una temperatura de hibridación de 57°C. El producto es expuesto después a dos enzimas de restricción y tras el aislamiento utilizando electroforesis en gel de agarosa, ligado de nuevo en pRBP4-503 del cual se ha separado la secuencia de emparejamiento mediante digestión enzimática. La integridad del mutante es verificada mediante secuenciación del ADN.

B. Expresión en Células de Mamífero y Aislamiento de la Proteína de unión a TGF-beta mutante:

Los ADNc de la proteína de unión a TGF-beta mutante son transferidos al vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 descrito en el Ejemplo 3. Después de verificar la secuencia, los constructos resultantes son transfectados en células COS-1, y la proteína secretada es purificada como se describe en el EJEMPLO 3.

Ejemplo 9

Modelos animales

30 Generación de ratones transgénicos que expresan en exceso el gen Beer

El clon BAC de ~200 kilobases (kb) 15G5, aislado dla genoteca de ADN genómico de ratón CTIB (distribuido por Research Genetics, Huntsville, AL) fue utilizado para determinar la secuencia completa del gen Beer de ratón y sus regiones limítrofes 5' y 3'. Un fragmento Sall de 41 kb, conteniendo el cuerpo del gen completo, más ~17 kb de la secuencia limítrofe 5' y ~20 kb de la secuencia limítrofe 3' fue subclonado en el sitio BamHI del vector cosmídico SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, CA) y propagado en la cepa DH101B de E. coli. De este constructo cosmídico, un fragmento de restricción MluI-AvIII de 35 kb (Secuencia Núm. 6), incluyendo el gen Beer de ratón completo, así como la secuencia limítrofe de 17 kb y de 14 kb 5' y 3', respectivamente, fue purificado después en gel, utilizando medios convencionales, y utilizado para la microinyección en cigotos de ratón (DNX Transgenics; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.191). Los animales fundadores en los que el fragmento de ADN clonado había sido integrado al azar en el genoma fueron obtenidos a una frecuencia del 5-30% de las crías que nacen vivas. La presencia del transgen fue determinada realizando el análisis de transferencia Southern del ADN genómico extraído de una pequeña cantidad de tejido de ratón, tal como la punta de una cola. El ADN fue extraído utilizando el siguiente protocolo: el tejido fue digerido durante la noche a 55°C en tampón de lisis conteniendo NaCl 200 mM, Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS al 0,2% y 0,5 mg/ml de Proteinasa K. Al día siguiente, el ADN fue extraído una vez con fenol/cloroformo (50:50), una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y precipitado con etanol. Tras la re-suspensión en TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1,5 mM), 8-10 µg de cada muestra de ADN fueron digeridos con una endonucleasa de restricción, tal como EcoRI, sometidos a electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nailon cargada, tal como HybondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL). El filtro resultante fue hibridado después con un fragmento marcado radiativamente de ADN derivado del locus del gen Beer de ratón, y susceptible de reconocer tanto un fragmento del locus del gen endógeno como un fragmento de un tamaño diferente derivado del transgen. Los animales fundadores fueron criados hasta ratones no transgénicos normales para generar un número suficiente de progenie transgénica y no transgénica en la cual determinar los efectos de la sobre-expresión del gen Beer. Para estos estudios, animales de diversas edades (por ejemplo, 1, día, 3 semanas, 6 semanas, 4 meses) son sometidos a numerosos análisis diferentes diseñados para averiguar la formación esquelética grosera, la densidad mineral del hueso, el contenido mineral del hueso, la actividad de osteoclastos y osteoblastos, el grado de osificación endocondral, la formación de cartilago, etc. La actividad transcripcional del transgen puede ser determinada extrayendo el ARN de diversos tejidos, y utilizando un análisis de RT-PCR que obtenga ventaja de los polimorfismos de nucleótidos individuales entre la cepa de ratón de la cual deriva el transgen (129Sv/J) y la cepa de ratones utilizada para la microinyección de ADN [(C57BL5/J x SJL/J)F2].

65 Modelos animales II

Desorganización del gen Beer de ratón mediante recombinación homóloga

La recombinación homóloga en células madre (ES) embrionarias puede ser utilizada para inactivar el gen *Beer* endógeno de ratón y generar con posterioridad animales que porten la mutación con pérdida de función. Un gen informador, tal como el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*, fue diseñado en el vector de redireccionamiento de manera que su expresión estuviera controlada por el promotor del gen *Beer* endógeno y la señal de iniciación de la traducción. De este modo, los patrones espaciales y temporales de la expresión del gen *Beer* pueden ser determinados en animales que portan un alelo elegido como diana.

El vector de redireccionamiento fue construido clonando primero la casete del gen *resistente a la neomicina* (*neo*) dirigido por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) seleccionable por fármaco de pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) en el vector de clonación pSP72 (Promega, Madison, WI). Se utilizó la PCR para flanquear la casete PGKneo con sitios P1 loxP de bacteriófago, que son los sitios de reconocimiento para la recombinasa P1 Cre (Hoess et al., PNAS USA, 79:3398,1982). Esto permite la posterior eliminación del marcador de resistencia a neo en las células ES redireccionadas en animales derivados con células ES (Patente de los Estados Unidos 4.959.317). Los cebadores de la PCR estaban comprendidos por una secuencia de 34 nucleótidos (ntd) loxP, 15-25 ntd complementarios a los extremos 5' y 3' de la casete PGKneo, así como sitios para el reconocimiento por la enzima de restricción (BamHI en el cebador efector y EcoRI en el cebador anti-sentido) para la clonación en pSP72. La secuencia del cebador efector era 5'-AATCTGGATCCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGATTCGAGGGGCCCT-3' (SEC ID NO: 34); la secuencia del cebador anti-sentido era 5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAATAAATACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAGTCAGCTTCTGA-3' (SEC ID NO: 35).

La siguiente etapa fue clonar un fragmento de XhoI-HindIII de 3,6 kb, conteniendo el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* y la señal de poliadenilación de SV40 de pSV β (Clontech, Palo Alto, CA) en el plásmido pSP72-PGKneo. El "brazo corto" de la homología del locus del gen *Beer* de ratón fue generado amplificando un fragmento del clon BAC 15G5. El extremo 3' del fragmento coincidía con el sitio de inicio de la traducción del gen *Beer*, y el cebador anti-sentido utilizado en la PCR también incluía 30 ntd complementarios al extremo 5' del gen de la β -galactosidasa de manera que su región codificante pudiera ser fusionada con el sitio de iniciación de *Beer* en marco. El enfoque escogido para introducir el "brazo corto" en el plásmido pSP72- β gal-PGKneo fue linealizar el plásmido en un sitio aguas arriba del gen β -gal y después co-transformar este fragmento con el producto de la PCR del "brazo corto" y seleccionar los plásmidos en los cuales estaba integrado el producto de la PCR mediante recombinación homóloga. El cebador efector para la amplificación del "brazo corto" incluía 30 ntd complementarios al vector pSP72 para permitir este evento de recombinación. La secuencia del cebador efector era 5'-ATTAGGTGACACTATAGAACTCGAGCAGCTGAA GCTTAACCACATGGTGGCTCACAAACCAT-3' (SEC ID NO: 36) y la secuencia del cebador anti-sentido era 5'-AACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEC ID NO: 37).

El "brazo largo" del locus del gen *Beer* fue generado amplificando un fragmento de 6,1 kb del clon BAC 15G5 con cebadores que también introducían los sitios para las enzimas de restricción de corte poco común ("rare-cutting") SgrAI, FseI, AscI y PacI. Específicamente, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACCACCGGTGACACCC GCTTCCTGACAG-3' (SEC ID NO: 38); la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACTTAATTAACATGGCGCGCCATATGGCC GGCCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEC ID NO: 39). El producto de la PCR resultante fue clonado en el vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) como una etapa intermedia.

El constructo de redireccionamiento al gen *Beer* de ratón también incluía un segundo marcador seleccionable, el gen de la *timidina quinasa* del virus *herpes simplex 1* (HSVTK) bajo el control del elemento de la larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV LTR). La expresión de este gen vuelve las células de mamífero sensibles (e inviables) al ganciclovir, es por lo tanto un modo conveniente de seleccionar frente a células resistentes a la neomicina en las cuales ha sido integrado el constructo mediante un evento no homólogo (Patente de los Estados Unidos 5.464.764). La casete RSVLTR-HSVTK fue amplificada de pSP1337 utilizando los cebadores que permiten la posterior clonación en los sitios FseI y AscI del "brazo largo"-plásmido vector TA. Para esta PCR, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACGGCCGCGCCGCAAAGG AATTCAAGA TCTGA-3' (SEC ID NO: 40); la secuencia del cebador antisentido era 5'-ATTACGGCGCGCCCCTCACAGGCCGACCC AGCT-3' (SEC ID NO: 41).

La etapa final en la construcción del vector de redireccionamiento implicaba la clonación del fragmento SgrI-AscI de 8,8 kb que contenía el "brazo largo" y el gen RSVLTR-HSVTK en los sitios SgrAI y AscI del plásmido pSP72-"brazo corto"- β gal-PGK neo. Este vector redireccionado fue linealizado mediante digestión o bien con AscI o PacI antes de la electroporación en células ES.

Ejemplo 10

Inactivación de *Beer* mediada por antisentido

Se preparan oligonucleótidos antisentido de 17 nucleótidos en un formato solapante, de tal manera que el

extremo 5' del primer oligonucleótido se solape con el AUG de inicio de la traducción del transcrito Beer, y los extremos 5' de los sucesivos oligonucleótidos se produzcan en incrementos de 5 nucleótidos moviéndose en dirección 5' (hasta 50 nucleótidos más allá), en relación con el AUG de Beer. Se diseñan los correspondientes oligonucleótidos de control y se preparan utilizando composiciones de bases equivalentes pero redistribuidas en la secuencia para inhibir cualquier hibridación significativa para el ARNm codificante. La liberación del reactivo para el sistema de ensayo celular se lleva a cabo a través de un reparto de lípidos catiónicos (P.L. Felgner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987). Se añaden 2 µg de oligonucleótido antisentido a 100 µl de medio con el suero reducido (medio con suero reducido Opti-MEM 1; Life Technologies Gaithersburg MD) y este se mezcla con reactivo Lipofectin (6 µl) (Life Technologies, Gaithersburg MD) en los 100 µl de medio con suero reducido. Estos se mezclan, se permite que formen complejos durante 30 minutos a la temperatura ambiente y la mezcla se añade a células MC3T3E21 o KS483 sembradas previamente. Estas células se cultivan y el ARNm se recupera. El ARNm de Beer se controla utilizando RT-PCR junto con cebadores específicos de Beer. Además, se recogen los pocillos experimentales separados y los niveles de proteína se caracterizan por medio de métodos de transferencia western descritos en el Ejemplo 4. Las células son cosechadas, resuspendidas en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS al 1%) y la proteína soluble se recoge. Este material se aplica a SDS PAGE en un gradiente desnaturalizante al 10=20). Las proteínas separadas son transferidas a nitrocelulosa y la transferencia western es realizada como antes utilizando los reactivos anticuerpo descritos. Paralelamente, se añaden los oligonucleótidos de control a cultivos idénticos y se repiten las condiciones experimentales. El descenso en los niveles de ARNm o proteína Beer se considera significativo si el tratamiento con el oligonucleótido antisentido da como resultado un cambio del 50% en cualquier caso comparado con el oligonucleótido con las mismas bases orientadas de manera azarosa ("scrambled") de control. Esta metodología permite la inactivación selectiva del gen y la posterior caracterización del fenotipo de los nódulos mineralizados en el modelo de cultivo de tejidos.

SECUENCIAS

ID de Secuencia Núm. 1: ADNc de BEER Humano (región codificante completa más UTR 5' y 3')

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCCAGGGTGGCAGGGCTTCAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCC
 CGAGCTCGGAGATAGCCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAAGAGCCATGACCGGGCGAGAAACGGAGGGCGGC
 CTCCCCAGCACCCCTTTGAGACCAAGAGCGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACCTTCACCCGCTACGTGACCGAT
 GGGCGGTGCGCGAGCGCAAGCCGGTCCACGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGCGCCGGCGCGCCTGCTGCCAACGC
 CATGGGCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGCACTTCGGCTGCATCCCGAGCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
 AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGAGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTGCTGCAAGTGCAAGCCCTCACC
 CGCTTCCACACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGCGCGCTCGGCGCGAGAGGGCCCGGAGCGCGCGCGCG
 CGCGCGGAGCGCGCAAGCCCAACAGCGCGAGCTGGAGAACCGCTACTAGAGCGCGCGCGCGCGCGCTCCCCACCGCGGGC
 GCGCGCGCGCTGAACCG
 AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCAGGCGCTGAGGAATCCCGGGCGCGCGCAAGCGCGCGCGCTCAGCCCGCGAGCTG
 AGGGGTCCACCGGGCAGGGGAGGGGAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACGAGCCCGCGCTCTGGGGCGCGCTACCT
 TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCGAAGATGGAAGCATTTTCACCGCCCTGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATTAAGATTCCCCCTTGCACTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
 CCAGAGCACAGACTGGGGGCACTGTAGATGTGGTTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAAGTTGCTGTGTAACTTGAAC
 TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATG
 CAGTTGCATTGATTAGTGCCAAAGGTCACTTCCAGAATTGAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAGAA
 CAAACAGAAAGAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAGAAAGCTATGCTG
 CTTCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATACATCATCCATTGGGGTAGA
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAAGTTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG
 ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCGAGGGAGC
 AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGAAGACCCGCTTCTGCCACCCTCACGGACACATTTCTGCCT
 AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAGAACTACAAGT
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATATAGCTGCCACCCAAAGATCTTTTGAAGAAATCATTTCCAGACAACCTC
 TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGTTTAAACAGAAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
 GGTGTTTTTTTTGGCAATTCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
 ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTGTAGAGAATGACAAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA
 CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

ID de Secuencia Núm. 2: Proteína BEER Humana (secuencia completa)

MQLFALALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETII FELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGRF EHHF FETHDVSEYSC
RELHFTRYVTDGFCRSAPVTELVCSGQCGEARLLENFNAIGRGRKWWRFSGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGEAEFRARKVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPOKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

5

ID de Secuencia Núm. 3: Proteína BEER Humana conteniendo mutación terminadora de Esclerosteosis

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTGGCGTGGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGTCTG
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGGCTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCTC
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACACAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGGC
CTCCCCACCACCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACTTACCCCGCTACGTGACCGAT
GGGCGGTGGCCAGCGCCAAAGCCGGTCAACCGAGCTGGTGTGTCTCCGGCCAGTGGCGCCGGCGCGCTGTGCCCAACGC
CATCGGCGCGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGGAGCTTCCGCTGCATCCCGACCGGTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGAGCGCGCGCGCGCAAGGTGGCGCTGGTGGCCCTGTGCAAGTGCAGCGCTCACC
CGCTTCCACAAACAGTCCGAGCTCAAGGACTTCCGGGACCGAGGGCGGTCCGGCCGAGAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAAACAGGCGGAGCTGGAGAACGCGCTACTAGAGCCCGCCCGCGCCCTCCCCACCGGCGGGC
GCCCGGCGCTGAACCGCGCGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAAATGCGCTGC
AAGCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
ACGGGTCCACGSGGCAGGGGAGGGATTTGAGAGTACAGAGACTGAGCCACGAGCCCGCGCTCTGGGGCGCGCTACCT
TTTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAAGAAATGGAAGCATTTTCACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGCTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAGACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACTTGAAC
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGATGAATG
CAGTTGCATTGATTCACTGCCAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAACACAGAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAAGTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGC
AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGAACACCGCCTTCTGCCACCCTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTTGAATCATTTCCAGACAACCTC

TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGSTTTTAAACAGAGCAGCATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAG

ID de Secuencia Núm. 4: Proteína BEER Humana Truncada de Esclerosteosis

MLFLALCLVCLLVHTAFRVVEG*

5

ID de Secuencia Núm. 5: ADNc de BEER Humano que codifica la Variante de la Proteína (V10I)

ASAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGSGTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCATCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGGCTTCAAGAATGATGCCACCGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGGC
CTCCCAACCAACCCCTTTGAGACCAAGAGCTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT
GGGCGGTGCGCGCAGCGCCAAGCCGTACCGAGCTGGTGTCTCCGCGCAGTGGGCGCGCGCGCGCTGCTGCCCAACGC
CATCGGCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGTGTGTCCCGTGGTGAAGCGCGCGCGCGCAAGGTGGCCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCC
CGCTTCCACACACAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCGCGAGAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAACAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAGAGCCCGCGCGCGCCCTCCCAACCGCGGGC
GCCCGGCGCCTGAACCGCGCGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTTGATTGTTTATATTTCAATTGTAATGCCTGC
AACCCAGGGGACGGGGGTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCGCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCAAGGGGAGGGGAGGGAATTGAGAGTCAAGACACTGAGCCACGACGCCCCGCTCTGGGCGCGCCTACCT
TTGCTGGTCCCACCTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAGACTGGGGGCACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCCCTGGCTCTGCCACTAACTTGCTGTGTAACCTTGAAC
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATG
CAGTTGCATTGATTAGTGCCAAGGTCACTTCCAGAAATCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAGATGAAAAA
CAACAGAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAAGTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTACCTTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGACAGGCCGAGGGAGC

AGCCATCACAAGCTCAGAGCAGCAGCATCCCTTTTGAAGACACCGCTTCTGCCACCACTCAGCGACACATTTCTGCCT
AGAAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTTGAATAATCATTTCCAGACAACCTC
TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGSTTTTAAACAGAGCAGCATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTCGTTTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAG

ID de Secuencia Núm. 6: Variante de la Proteína BEER Humana (V10I)

MQLEFLALCLICLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIRELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGGRFPHHFFETHKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGFCRSKFEVTELVCSGQCGEARLLFNAIGRGKWWRESGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGEAFRARKVR
LVASCKCKRLTRFHHQSELKDFGTEAARFQNGRKFREFRARSAPKANQAELENAY

ID de Secuencia Núm. 7: ADNc Beer Humano que codifica la Proteína Variante (P38R)

5

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC
CTCCCCACCAACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGASTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTACCCCGCTACGTGACCGAT
GGGCGGTGCCGACGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGCCAGTGCGGGCCGGCGCGCCTGCTGCCCAACGC
CATCGGCCCGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGTCCCCTGGTGGAGGCCCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACC
CGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGCAGAAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCCAAGGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACCGGGCGGGC
GCCCCGGCCCTGAACCCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAAATGCCTGC
AACCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACACAGACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACTTGAAC
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGPAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG

CAGTTGCATTGATTTCAGTGCCAAAGGTCACCTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
 CAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAGAGAGCTATGCTG
 CTTCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATACATCATCCATTGGGGTAGA
 AAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAATTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG
 ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAAGTGAAGGTTCLAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCGAGGGAGC
 AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGGACACCGCCTTCTGCCACCACTCAGGGACACATTTCTGCCT
 AGAAAAAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAAGACATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTGAAAATCATTTCAGAGAACCTC
 TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGTTTAAACAGAGGACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
 GGTGTTTTTTTGGCAATTCTCCAGTGGGACTTGTCACAGAAATGAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTGTAGAGAAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA
 CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

ID de Secuencia Núm. 8: Variante de la Proteína BEER Humana (P38R)

MQLFALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIRELGEYFEFFEELENNKTMNRAENGGRFEHHEFETHDVSEYSC
 RELHETRYVTDFGCRSAKEVTELVSGGCGEARLLFNALGRKWWRFSGDFRCIEDRYRAQRVQLLCFEGGAERARKVR
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARFQKGRKFRFRARSANQAELENAY

5

ID de Secuencia Núm. 9: ADNc de BEER de Vervet (región codificante completa)

ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTTGTCTGCCTGCTGGTACACGAGCCTTCGCTGTAGTGAGAGGCCAGGGGTGGCA
 GGCCTTCAAGAAATGATGCCACGGAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACAA
 AGACCATGAACGGGGCGGAGAATGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC
 CGAGAGCTGCACTTACCCGCTACGTGACCGATGGGCGGTGCCGAGGCCAAGCCAGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGG
 CCAGTGCGGCCCGGCACGCCTGCTGCCAACGCCATCGGCCGCGCAAGTGGTGGCGCCCGAGTGGGCCCGACTTCCGCT
 GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGTGTGCAGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGC
 CTGGTGGCCTCGTGCAAGTGAAGCGCCTCACCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCGAGGCCGC
 TCGGCCGAGAGGGCCGGAAGCGCGGCCCGCGCCGGGGGCCAAGCCAATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACT
 AG

10 ID de Secuencia Núm. 10: Proteína BEER de Vervet (secuencia codificante completa)

MQLFALCLVCLLVHAAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIRELGEYFEFFEELENNKTMNRAENGGRFEHHEFETHDVSEYSC
 RELHETRYVTDFGCRSAKEVTELVSGGCGEARLLFNALGRKWWRFSGDFRCIEDRYRAQRVQLLCFEGGAERARKVR
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAAREFQKGRKFRFRARSANQAELENAY

ID de Secuencia Núm. 11: ADNc de BEER de Ratón (región codificante completa)

15

ATGCAGCCCTCACTAGCCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACGGCTTCCTTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGGTG3CA
 AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTATCCCAGGGCTTGGAGAGTAACCCGAGCCTCCTCCTGAGAAACAACCAAGACCA
 TGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAGGTGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAG
 CTGCACTACACCCGCTTCTGTACAGAGCGGCCATGCCGCAAGGCCAAGCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTG
 CGGCCCGCGCGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAAGGACCGGATTTCCGCTGCATCC
 CGGATCGCTACCGCGCGAGCGGGTGCAAGTGTGTGCCCGGGGCGCGCGCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTG
 GCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCAGCCGCTTCCACAACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGAGACCGCGCGGCC
 GCAGAAAGGTCCGAGCCGCGGCCCGGCCCGGGAGCCAAAGCCAAACAGGCGGAGCTGGAGAACGCTACTAGAG

ID de Secuencia Núm. 12: Proteína BEER de Ratón (secuencia completa)

MQESLAECLICLLVHAFAFAVEGQGWQAFRNDATFVIFGLGEYFEFFFENNQTMNRAENGGRFPHFEYDAKDVSEYSCKE
 LHVTRFLTDGFCRSKAEVTELVCSGQCGFARLLFNALIGRVKWWRENGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFEGGAAPRSRKRLV
 ASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFETARFQGRKPRFEGARGAKANQAELENEY

5

ID de Secuencia Núm. 13: ADNc de BEER de Rata (región codificante completa más UTR 5')

GAGGACCGAGTGCCTTCTCCTTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCTTGCCTTGCCTGCCTGCTTGTACATGCA
 GCCTTCGTTGCTGTGGAGAGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAAGAATGATGCCACAGAAATCATCCGGGACTCAGAGAGTA
 CCCAGAGCCTCCTCAGGAAGTAGAGAACAACAGACCATGAACCGGGCCGAGAACGGAGGCAGACCCCCCACCATCCTT
 ATGACACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCGTGACCGACGGCCCGTGCCGCGAGT
 GCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGCGCCCCGCGCGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGAA
 GTGGTGGCGCCCGAAGCGACCCGACTTCCGCTGCATCCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTCCCCG
 GCGGCGCGCGCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCAGCCGCTTCCACAACCAAG

10

TCGGAGCTCAAGGACTTCGGACCTGAGACCGCGCGCGCGCAGAGGGTGGCAGCGCGGCCCCCGCGCGCGGGGATCCCA
AGCCACCCAGCGGAGCTGGAGAACGCCTACTAG

ID de Secuencia Núm. 14: Proteína BEER de Rata (secuencia completa)

!!QLSLAFCLACLLVHAAEFVAVESQSWQAFKHDATEIIIEGLREYEEFFQELNNQTMIRAENGGRFFHHEYDTEDVSEYV
RELHYTRFVTDGFCRSAPKEVTELVCSGGCGEAKLLFNAGRVKWWRENGDFRCIEDRYRAQRVQLLCFEGGAERERVA
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGEETARFQKGRKFRFRAGAKAHQAELENAY

5

ID de Secuencia Núm. 15: ADNc de BEER Bovina (región codificante parcial)

AGAAATGATGCCAGAGAAATCATCCCCGAGCTGGGCGAGTACCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAACAAGACCATGAAC
CGGGGAGAAAGGAGGAGACCTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAGAGCGCTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCA
ATTCAACCGCTACGTGACCGATGGGCGGTGCCGAGCGCCAGCGCGGTACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGGCG
CGTGGGCGCTGCTGCCAAGCGCATCGGCGCGGGCAAGTGGTGGCGGCCAAGCGGGCCGACTTCGGCTGCATCCCCGAC
CTGTACCGGGCCAGCGGGTGCAGCTGTTGTGTCTCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCAAGSTGCUCCTGGTGGCCTC
GTGTAAATGAGAGCGCCTCACTCGCTTCCACAACCACTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCCCCGAGCGCGCGCGCGCAAA
CGGCGCGGAAGCTGCGGCCCCCGCGCGCGGGGACCAAGCCAGCGGGGCGA

10

ID de Secuencia Núm. 16: Proteína BEER Bovina (secuencia parcial -- secuencia señal perdida y últimos 6 restos)

HDATNIEELGEYEEFLFELNNKTMNRAENGGRFFHHFFETKDASEYSCRELHETRYVTGFCRSAPKEVTELVCSGGCGE
ARLLENAGRVKWWRENGDFRCIEDRYRAQRVQLLCFEGGAERARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPEAAREQT
GKELRFRAROTKASKA

15

ID de Secuencia Núm. 17: Fragmento de Restricción Mlil-AvIII utilizado para elaborar transgen de Beer de ratón

CGCGTTTTGGTGAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTTGGCGTTGAGATTGATACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC

20

GACCGAGCTGGACCAGCGCATTGCTGACACCGTCTCCTTGGAACTTATTGCAATGGAGTGTCAATTCATCAAGGACNGCC
 TGATCGCAATAGGTGCTATCCACGCAGCGGCATCGAAACCCCTCAGCGGCTGACCAATATCTACAPCATCAGCCTTGGT
 ATCCTGCGTGATGAGCCAGCGCAGAAACAAGGTAAACCGTCAGTGCCGATAAGTTCAAAGTTAAACCTGGTGTGATACCAA
 CATTTGAAACGTTGATCGAAACCGCGCTGAAAPACGCTGCTGAATGTGCGCGCTGGATGTCACAAAGCAPATGGCAGCAG
 ACAAGAAAGCGATGGATGAACCTGGCTTCCTATGTCCGCAAGCGCCATCATGATGGATGTTTCCCCGGTGGTGTATCTGG
 CAGCAGTGCCGTCGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCATTTGCGGGTCTTTCCGGCGATCCGCCTTGTACGGGGC
 GGCGACCTCGCGGGTTTTTCGCTATTTATGAAAATTTTCCGGTTTAAAGGCTTTCCGTTCTTCTTCTGTCATAACTTAATGT
 TTTTATTTTAAATACCCCTCTGAAAGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTGGCCCTCTGTGTTTTCTTCTC
 TCTGTTTTTGTCCGTGGATGAACATGGAAGTCAACAAAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTCAACATGAGAAAT
 TCGCGGCCGCATATACGACTCACTATAGGGATCGAGCCTACTCCCGCGCATGAAGGGAGGAGCTGGACTCCGCATG
 CCCAGAGAGCGCCCCCAACCCCAAGTGCCCTGACCTCAGCCTCTACGAGCTCTGGCTTGGGCTTGGGCGGGGCTCAAGGC
 TACCACGTTCTCTTAACAGGTGGCTGGGCTGTCTCTTGGCGCGCGTCACTGTGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTC
 ACCGTGGAATGTCTGCCTTCGTTGCCATGGCAACGGGATGAGCTTACATCTGGGTGTGGAGCTTTTCTGTCCGTGTCA
 GGAAATCCAAATACCTATAAATACCTAGAAAGAGGAAGTAGCTGAGCCAAAGCTTTCTGGCTTCTCCAGATAAAGTTTG
 ACTTAGATGGAAAAAACAAATGATAAAGACCCGAGCCATCTGAAATTCCTCCTAATTGCACCACTAGGAAATGTGTA
 TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTTATTTTAAAPAGAAACTTTAGTCATGTTATTAATAAGAATTTCTCAGCAGTGGGA
 GAGAACCATATTAACACCAAGATAAAGTTGGCATGATCCACATTGCAGGAAGATCCACGTTGGGTTTTCATGAATGTG
 AAGACCCCATTTATTAAGTCCTAAGCTCTGTTTTTGACACTAGGAAGCGATGGCCGGGATGGCTGAGGGGCTGTAAAG
 ATCTTTCAATGTCTTACATGTGTGTTTTCTGTCTGCACCTAGGACCTGCTGCCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGT
 TCACATGATTAGTCTCAGACACTTGGGGGAGGTTGCATGTAAGTGCATGCTTATTTCCATACGGAGCACCTACTATGTG
 TCAAACACCATATGGTGTTCACCTCTCAGAACGGTGGTGGTCATCATGTTGCATTTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA
 GAGCTGAGATATATGGACGCACTCTTCAGCATTCTGTCAAGTGGCTGTGCATTCTTGTCTCTGAGCAAGTGGCTAAACA
 GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTAGGGAACCTCTCCAGTCTCCCTACCTCAACTATCCA
 AGAAGCCAGGGGGCTTGGCGGTCTCAGGAGCCTGCTTGTGCGGGGACAGGTTGTTGAGTTTATCTGCAAGTGGTGGCT
 AGGCATAGTGTGAGGACTGATGGCTGCCTTGGAGAACACATCCTTTGCCCTCTATGCAAATCTGACCTTGACATGGGGG
 GCTGCTCAGCTGGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAGCCTAAAGCTTCTTCTGTCACCTGAAACTCCTGGACCAAG
 GGGCTTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGTGAGCTGCACCTTTCCAATCTCAGGGCGTGAGAGGCAGA
 GGGAGGTGGGGGAGAGCCTTGAGCTCTTTCTCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCCATATGAGCACAGGC
 ACATCCCCACCCCCACCCACCTTTCTGTCTGCAGATTTAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGTCC
 TATCCTCTCTTAGGTAGACAGGACTCTGCAGGAGACACTGCTTTGTAAGATACTGCACCTTTAAATTTGGATGTTGTGAGG
 GGAAAGCGAAGGGCTCTTTGACCATTCAGTCAAGGTACCTTCTAACTCCCATCGTATTGGGGGGCTACTCTAGTGCTAG
 ACATTGCAGAGAGCCTCAGAACTGTAGTTACCAGTGTGGTAGGATTGATCCTTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA
 TTCTTACCCAGTCACCGAATCTTATTAGTACCTACCCCGTAACAGGCACCGTAGCAGGTAAGGAGGACGAGCACT
 CAAAGAACTGACAGACCGAAGCCTTGGATATATAAACACCAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACTCTTTAACTCA
 GGCCCTTTAACTCAGGACCCCCACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTTACAGAGAGGAAAACTA
 GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGCTTAAGCTTGTCTGCATGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTCCA

ACTCTAGGGTCTATTTTTCTTTTTCTCGTTGTTTGGATCTGGGTCTTACTGGGTAACTCAGGCTAGCCTCAGACTCAT
 ATCCTTCTCCCATGGCTTACGAGTGTAGGATTCCAGGTGTGTGCTACCATGTCTGACTCCCTGTAGCTTGTCTATACCA
 TCCTCACAACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACACCGGAGGAGCTGGGGAATCCACAGAGGGCTCCGCAGGATG
 ACAGGCGAATGCCTACACAGAAGGTGGGGAAGGGAAGCAGAGGGAACAGCATGGGCGTGGGACCACAGTCTATTTGGGG
 AAGCTGCCGGTAACCGTATATGGCTGGGGTGAGGGGAGAGGTGATGAGATGAGGCAGGAAAGAGCCACAGCAGGCAGCGGG
 TAGGGCTCCTTATTGCCAAGAGGCTCGGATCTTCCTCCTCTCCTCCTCCGGGGCTGCCTGTTCATTTTCCACCACTG
 CCTCCATCCAGGTCTGTGGCTCAGGACATCACCCAGCTGCAGAACTGGGCATCACCCAGTCTGAATGCTGCCGAGG
 GCAGTCTCTCATGCAGGTCAACACCAGTGTAGCTTCTACGAGGATTCTGGCATCACCTACTTGGGCATCAAGGCCAAT
 GATAGGCAGGAGTTCAACCTCAGTGTCTACTTTGAAGGGCCACAGATTTGATTGACAGGGCGCTGGCCCATAAAATGG
 TAAGGAACGTACATTCGGGCACCCATGGAGCGTAAGCCCTCTGGGACCTGCTTCCTCCAGAGAGGCCCCCACTTGAAABAA
 GBTTCAGAAAGATCCCAAAATATGCCACCACTAGGGATTAGTGTCTACATGTGAGCCGATGGGGGCCACTGCATAT
 AATCTGTGCATAGACATGACATGGAATAATAATTTTCAGACAGAGAGCAGGAGTTAGGTAGCTGTGCTCCTTTCCCTT
 TATTGTAGTGTGCCCATTTTTTTTATTGATGTATGTGTATACATGTGTGTGCACACATGCCATAGGTTGTACTGAACACC
 GTCTTCAATGCTTCCCCACCCCACTTATTTTTTGAGGCAGGGTCTCTTCCCTGATCCTGGGGCTCATTTGTTTATCTAG
 GCTGCTGGCCAGTGAGCTCTGGAGTTCTGCTTTTCTCTACCTCCCTAGCCCTGGGACTGCAGGGGCATGTGCTGGGCCAG
 GCTTTTATGTGGGCTTGGGGATCTGAACCTTAGGTCCCTAGGCCTGAGCACCGTAAGACTCTGCCACATCCCCAGCCTGT
 TTGAGCAAGTGAAACCATTCGCCAGATTCCCCAGTGGGGCTTTCCTACCCCTTTTATTGGCTAGGCATTCATGAGTGGTC
 ACCTCGCCAGAGGAATGAGTGGCCACGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGTACTGGGTTAAGTCTTCTGCCGCTC
 GCTCCCTGCAGCCGCAGACAGAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAGTGGTCAGACAGGACAGAGGCTGAGAGGGTC
 ACAGGGCAGATGTACAGCAGCAGACAGGTTCTCCCTCTGTGGGGAGGGGTGGCCCACTGCAGGTGTAATTGGCCTTCT
 TTGTGCTCCATAGAGGCTTCTGGGTACACAGCAGCTTCCCTGTCTGCTGATTCCCAAGAGAACTCCCTACCACTGGA
 CTTACAGAGTTCTATTGACTGGTGTACCGTTCAACAGCTTTGGCTCTTGGTGGAGGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC
 AAGAGCTCATTCACGAATGACACACACACACACACACACACACACACACACAGCTAATTTTGATATGCCTTAACATA
 GCTCAGTGACTGGGCATTTCTGAACATCCCTGAAGTTAGCACACATTTCCCTCTGGTGTCTCTGGCTTAACACCTTCTAA
 ATCTATATTTTTATTTTGTGCCCCGTGTACCTTCTGAGAAGCCCCCTAGGGCCACTTCCCTTCGCACCTACATTGCTGGAT
 GGTTCCTCTCCTGCAGCTCTTAAATCTGATCCCTCTGCCTCTGAGCCATGGGAACAGCCCATAAAGTGAATTAGACATAA
 AAACGCTCTTAGCCAAAACCTCAGCTAAATTTAGACAATAAATCTTACTGGTTGTGGAATCCTTAAGATTCTTCATGACC
 TCCTTCACATGGCACGAGTATGAAGCTTTATTACAATTGTTTATTGATCAAACTAACTCATAAAAGCCAGTTGTCTTTC
 ACCTGCTCAAGGAAGGAACAAATTTCATCCTTAACCTGATCTGTGCACCTTGACCAATCCATACGAATATCTTAAGAGTAC
 TAAGATTTTGGTTGTGAGAGTCACATGTTACGAATGTACAGCTTTGACAAGGTGCATCCTTGGGATGCCGAAGTGACCT
 GCTGTTCCAGCCCCCTACCTTCTGAGGCTGTTTTGGAAGCAATGCTCTGGAAGCACTTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAC
 AGCGGGTCACTTCAGCATCCCGATGAGGAATCCCGTCAAAGCTGTACATTCTGTAAAGACTGGGAAGCTGCAGACTTT
 AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAATCCCTGTACACCCCAACCGAGCCCTTCTCCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC
 ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGAGGCTTACCCCTTCTCACATGGCAGTGGTTGGTCAT
 CCTCATTCAGGGAACCTCTGGGGCATTCGCTTTACTTCCTCTTTTTGGACTACAGGGAATATATGCTGACTTGTTTTGA
 CCTGTGTATGGGGAGACTGGATCTTTGGTCTGGAATGTTTCTGCTAGTTTTTCCCATCCTTTGGCAACCCCTATCTA

[illegible]

GGCAGCGTGTGAGCTGCCGTGGTGTGGGTGCTGGGAAGCAACTTGAATCTAAGCAAGCACTTTTAACTGCTGAGGCGAGG
TCTCAGTACCCCTTCTTCATTTCTCCGCTGGGTCCATTGTATGACACATGTAGCTAGAATATCTTGCTTATCTAATTA
TGTACATTGTTTTGTGCTAAGAGGAGTAAATGCTCTATAGCCTGAGCTGGCCTCAACCTTGCCATCCTCCTGCCCTCAGCC
TCCTCCTCCTGAGTGCTAGGATGACAGGGAGTGGTAACTTACATGCTTCATGTTTTGTTCAGACTGAAGGATAACAT
TCATACAGAGAAGGTCTGGGTCAAAAGTGTGCAGTTCACTGAATGGGACACCCCTGATCAAGAAACAAAACCTCAGGGG
CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGAGTTCATTTCCAGCAACACATGGTGGCTCAGGCCATCTA
TAAGGAGATCTGACGCCCTCTTCTGGTGTGTCTGAAGACAGCTACAGTCTACTCACATAAABTAAATAAATCTTTAAAGC
ACACACACACACACAATTACACCCAGAAAGCCCACTCTATGTTCCCTCCACGCTCTCTGCCTACAGTACTCCAGGTT
ACCACTCTTCAGGCTTCTAACAACCTGGTTTACTTGGGCTCTTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTTGTGTGCTCAT
ACAGCTTCTTTCTAGTAACTTGCATATTACTCTGCGTTTTTACATGATTTATTTATTGTAGTTGTGTGTGCGTGTGGG
CCATGCATGGCACAGTGTGTGGGATGTGAGATATTGTGAACAGGGGACAGTCTTTTCTTCAATCATGTGGGTTCCAG
AGGTTGAAGTCAAGTCAATGTGTGGGAGCAAAATGCTTTACCCACTGAGACATCTCCATATTCTTTTTTTTCCCTG
AGGTGGGGGCTTGTTCATAGCCCAAACCTGGCTTTGCACCTGCAAGTCACTCCCTGTCTCCACCTCTTAGAGTA
TTGGPATTAGGATGTGTACTACACACCTGACTGGATCATTAAATTCTTTGATGGGGGGGGGAAGGACATGCTGCAGG
TGPAAGGATGACTGGACTGGACATGAGCGTGGAAGCCAGAGGAACAGCTTCAGTCTAATGCTCTCCCACTGAGCTATTTG
GGTTTGCCAGAGAACTTACAGAAAGTTCTCAGTGGCATGTGGATTGGGGTTGGAGTTCACTCATCAGCTTGACAT
TGGCTCCTCTACCCACTGAGCCTTCTCACTACTCTCTACCTAGATCAATTAATTCTTTTTTAAAGAGCTTATTAGGGGGC
TGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTTCCAGAGGTCTGAGTTCATTTCCAGCATGCCATTGCTGG
GCACTAGGGGGGCGAGGTGTTCAAGTGAGTAGCTGTGCCAGTTTTCCGCGGTGGAGAACCTCTTGACACCTGCTGTG
CCTGGTCACTCTGGGTGGGTGCATGGTGATGCTTGTGTATGGAAAGCTTTGACTGTTACAGTGAAGTTGGGCTTCCA
CAGTTACACGTCTCCCTGTTTTCTTGCAGGCCGGGTGCTTGTCCATTGCCGCGAGGGCTACAGCCGCTCCCAACGCTA
GTTATCGCCTACCTCATGATGCGGAGAAAGTGGACGTCAAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAGAACTGTGAGATCGG
CCCCACGATGGCTTCTGGCCCAACTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAGGAGGGCAAGGTGAAGCTCTAGGGTG
CCCACAGCCTCTTTTCCAGAGGTCTGACTGGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTTAGGAACACAGTATACCCACTCCCTGC
ACCACCAGACAGCTGCCACATCTGTCCCACTCTGGTCTCGGGGGCCACTCCACCCTTAGGGAGCACATGAAGAAGCTC
CCTAAGAAAGTTCTGCTCCTTAGCCATCCTTTCTGTAAATTTATGTCTCTCCCTGAGGTGAGGTTTCAGGTTTATGTCCCTG
TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGACCCAGGGTGGGAGGGCTATCAGGGTGCTGGCCCGGGACACGGGCACTCTTCAT
GACCCCTCCCCACCTGGGTCTTCTGTGTGGTCCAGAACACAGGCTGGTAAGGAACTATGCAAAACACAGGCCCTG
ACCTCCCCATGTCTGTTCTGTGCTCACAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGATGACATTAAGTTCTGAAGCAG
AGTGGAGATAGATTAGTACTAGATTTCCAAAAAGAGGAAAAAAGGCTGCATTTTAAATTTATTTCTTAGAATTAA
AGATACTACATAGGGGCCCTTGGGTAAGCAATCCATTTTCCAGAGGCTATCTTGATTCTTTGGAATGTTTAAAGTGT
GCCTTGCCAGAGGCTTACGATCTATATCTGCTGCTTCAGAGCCTTCCCTGAGGATGGCTCTGTTCTTTGCTTGTTAGA
AGAGCGATGCCTTGGGAGGGTTTCCCCCTTTTCCAGAAACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAAACAA
CAAACAAACAAAGGACCTCCATTTGGAGAATTGCAAGGATTTTATCCTGAATTATAGTGTGGTGAGTTCAAGTCATCAC
GCCAAGTGCTTGCCATCCTGGTTGCTATTCTAAGAATAATTAGGAGGAGGAACTAGCCAATTGCAGCTCATGTCCGTGG
GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAAGGGGTGCCTGTCCCTTGGGGACAGAAAGGAAAATGAAGGCCCTCTGCTCAC

CCTGGCCATTTAGGGGAGGCTCTGCTGGTTCCACGGTGTCTGTGCAGGATCCTGAAACTGACTCGCTGGACAGAAACGAG
 ACTTGGCGGCACCATGAGAATGGAGAGAGAGAGAGCAAGAAAGAAACAGCCTTTAAAGAACTTTCTAAGGGTGGTTTT
 TGAACCTCGCTGGACCTTGTATGTGTGCACATTTGCCAGAGATTGAACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT
 TTGTATGTCTCGGGGGTCAGCAGAGCCGTACGCCACCACCCAGCACCCGGCACATAGGCGTCTCATAAAGCCCCATTT
 TATGAGAACAGAGCTGTTTGAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTGTGGGGGACCCGGATCCCAGCAGCCGTGGT
 TGCTTGCCTGTAGGATGTCTTACAGGAGTTTGCAGAGAAACCTTCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTTGTGGA
 ATATTTCAATTCAGCTTTAAGTGTAAAGACTCAGCAGTGTTCATGGTTAAGGTAAAGGACATGCCCTTTCCAGAGCTGCT
 GCAAGAGGCAGGAGAAGCAGACCTGTCTTAGGATGTCACTCCAGGGTAAGACCTCTGATCAGAGCAGGAGCAGAGCTG
 TGCAGCCTGGATGTCATTGTCCCTATTCTGTGTGACCACAGCAACCTTGGTCACATAGGGCTGGTCATCCTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGATGAAGTGACCATAGCCAASTTGTGTACCTCAGTCTTTAGTTTCCAGCGGCT
 CTCTTGCTCAATACAATGTGCATTTCAAAATAACACTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTCATGTGTATGAGAGAGGAAA
 GAGAGGAAAGAACAAACAAACAAACACCAACAACCAAAACATCTGGGCTAGCCAGGCATGATTGCAATGTCTACAG
 GCCAGTTCTATGAGAGGCAGAGACAGGAAGACCGCCGAAAGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGCCA
 GGGCTACGGTCCCAAGATCCTAGSTTTTGGATTTTGGGCTTTGGTTTTTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTG
 TCCTGAACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCTCAAACTTAGAGATCTGCTGACTCTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT
 GCCACCACTGCCCACTAAGATTCCATTAAAAAABAAAAGTTCAAGATAATTAAGAGTTGCCAGCTCGTTAAAGCTAA
 GTAGAGCAGCTCTCAGGCCTGCTGCTTGAGGCTGTTCTTGGCTTGGACCTGAAATCTGCCCCCAACAGTGTCAAAGTGCA
 CATGACTTTGAGCCATCTCCAGAGAAGGAAGTGAAAATTGTGGCTCCCCAGTCGATTGGGACACAGTCTCTCTTTGTCTA
 GGTAAACATAGGTGACACATAGCATTGAACTCTCCACTCTGAGGGTGGGTTTCCCTCCCCCTGCCTCTTCTGGGTTGGTC
 ACCCATAGGACAGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAAACCTCTTTGTGGGACATGAAGAAAGAGCCTTTGGG
 AGATTCTGGCTTTCCATTAGGGCTGAAAGTACAACGTTCTTGGTTGGCTTTGCCTCGTGTATATAAAGTCTAGCTACTA
 TTCTTCAGGTAAATACCGATGTTGTGGAAAGCCAAACCCGTGGCTGCCCGTAGTAGGGGTGGGGTTGGGAATCCTG
 GATAGTGTCTATCCATGGAAGTGGTGGAAATAGGAATTAAGGGTGTCCCCCCCCCCCCAACCTCTTCTCAGACCCAG
 CCACCTTCTATGACTTATAAACATCCAGGTAAAAATTACAAACATAAAAATGGTTTCTCTTCTCAATCTTCTAAAGTCTG
 CCTGCCCTTTCCAGGGGTAGGTCTGTTTCTTGTCTGTTCTATTGTCTTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAATAGAGGG
 AACTCTTGGCCCATACTAAGGCTCTTCTGGGCTCCAGCACTCTTAAGTTATTTTAAAGAAATCTCACTTGGCCTTTAGCAC
 ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGTGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGGCACTGTTGAGGCGGGTGCCCTTTCCACCTTAAG
 TTGCTTATAGTATTTAAGATGCTAAATGTTTTAATCAAGAGAGCACTGATCTTATAATACGAGGATTAAGAGATTTTCTC
 ACAGGAAATGTCTTTTTCATAATTCTTTTACAGGCTTTGTCTGATCGTAGCATAGAGAGAATAGCTGGATATTTAATCT
 TGTATTCCATTTTCTCTGCCAGCGTTAGGTTAACTCCGTAAAGTGAATTCAGTGGACCGAAGAGGCTCAGAGGGCAGG
 GGATGGTGGGGTGAGGCAGAGCACTGTCACTGCCAGGCATGGGAGGTCTGCCATCCGGGAGGAAAGGAAAGTTTAGC
 CTCTAGTCTACCACCACTGTTAAGCACTCTAAGTTGTAAACCAAAATAAATGTCTTACATTACAAAGACGTCTGTTTTG
 TGTTTCTTTTGTGTGTTTGGGCTTTTATGTGTGCTTTATAACTGCTGTGGTGGTGTGTTGTTAGTTTGGAGGTAGGA
 TCTCAGGCTGGCCTTGAATCTGATCGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGTCCCTGCCCTCCAAGTGTCTAGGACT
 AAAAGCACATGCCACCACACAGTACAGCATTTTCTAACATTTAAATAATCACCTAGGGGCTGGAGAGAGGGTTCCA
 GCTAAGAGTGCACACTGCTCTTGGGTAGGACCTGAGTTTASTTCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

TCCAGGACCTCTGGCCTCCATGGGCATCTGCTCTTAGGACATACCCACATACAGATACACACATAAATAAATGAAGC
CTTTAAAACCTCCTAAAACCTAGGCTTGGAGGTACGACTCTGGAAAGCTGGCATACTGTGTAACTCCATCTCATGGT
TTCTGGCTAACCTAGACTTACAGAGACAGAAAGAACTCAGGGTGTGCTGGGGTTGGGATGGAGGAGAGGGATGAGT
AGGGGGAGCAGGGGAACTTGGGCACTGAAATTTCTTTACAGGACACTAGAGGAGGATAAATACCACTCATTGCCACCCAC
TACTGGACACTCCAGGGAATTATGCTGGGTGAAAABAAAGGCCCCAGGTATTGGCTGCATTGGCTGCATTTCGGTAAC
ATTTTTTTAAATTGAAAAGAAABAAAGTGTAAATCAAGCTTAGATGAGTGGTTGCTGTGAGCTGAGAGCTGGGGTGAGTGA
GACATGTGGACACTCCATCAAAAACGACAGAAAGAAAGGGCTGTGGTGACAGCTACCTCTAATCTCCACCTCCGGGAG
GTGATCAAGGTTAGGCTCAGCTAGCTGTGGTGCATGAGACCTGTTTCAAAACCTTTAATAAGAAATATGAAAAA
GACATCAGGGCAGATCCTTGGGGCCAAAGGCGGACAGGCGAGTCTGTGGTAAAGGTGTGTAGAAAGCGGATGCATGAGCA
CGTSCCGCAGGCATCATGAGAGAGGCTAGGTAAAGTAAAGGATGTGAGTGTGTGGCGCTGGGCGCACTGCAGCTCCT
GGCTGTGGTGTGGACTGGCATCTTTGGTGAGCTGTGGAAGGAAATGGGTAGGGAGATCATAAATCCCTCCGATTAT
TTCAAGAACTGTCTATTACAATTATCTCAAAATATTTAAAAAAGAGAGATTAAALAACAAAACCTATCCAGGTGTG
GTGCTGTGCACCTATAGCCACGGGCACTTGGAAAGCTTAGGCAAGAGGATGGCGAGTTTGAAGGTATCTGGGGCTGTACA
GCAGAGCGTGTGCCCCAAACCAACCAACAGCAAAACCATTTATGTACAGCAAGAGTGTATTATAGTGAGCGGCTCGCT
GAGAGCATGGGGTGGGGTGGGGTGGGGGACAGAAATATCTAAACTGCAGTCAATAGGGATCCACTGAGAGCCCTGGGGC
TTGACTGCAGCTTAACCTTGGGAAATGATAAGGGTTTTTGTGTAGGTAAAAGCATCGATTACTGACTTAACCTCAATGA
AGAAAAAGAAAAAAGAAACAAACAAAGCCAAACCAAGGGCTGGTGAGATGGCTCAGTGGGTAAAGGACCCCGACTGC
TCTCCGAGGGTCCAGAGTTCAAACTCCAGCAACCACTGGTGGCTCACAACCATCTGTAAAGAGATATGATGCCCTCTT
CTGGTGTGTCTGAAGACAGCTACAGTGTACTTACATATATTAATAATCTTTAAAAAATAAATAAATAAAGCCAAA
CCGAGCAAAACAGGCCCCCAACAAAGAGGACAGGAGGCGAGGACCCAGGACCATCTGTGAAGGCAAGGCTACC
CATGGGCCGAGGAGGGTCCAGAGAGATAGGCTGGTAAGCTCAGTTTCTCTGTATACCTTTTTCTTGTGACACTACTTC
AATTACAGATATAATAACAAATAAACAATCTAGAGCCTGGCCACTCTCTGCTCGCTTGATTTTTCTGTACGTCCAG
CAGGTGGCGAAGTGTTCAGAGGACAGATCGCATCATTTAGGTGGCCAGCATAATCTCCATCAGCAGGTGGTGTGTGA
GAACCATTTATGGTGTCTACAGAATCCCGGGCCAGGAGCTGCCCTCTCCCAAGTCTGGAGCAATAGGAAGGCTTTCTGGC
CCAGACAGGGTTAACAGTCCACATTCAGAGGAGGGGAAAGGAGACTGGAGGTACAGACAAAAGGGCCAGCTTCTAAC
AATTTCACAGCTCTGGTAGGAGAGATAGATCACCCCCAACAATGGCCACAGCTGGTTTTGTCTGCCCGAAGGAAGTGA
CTTAGGAAGCAGGTATCAGAGTCCCTTCTGAGGGGACTTCTGTCTGCCTTGTAAAGCTGTACAGACAGCTGCATTGAT
GTGTGGGTGACGAAGATGAAAAGGAGGACCCAGGACAGTCCGCCACAGATGGACCGGCCACTTACAAGTCGAGGCAGGTG
GCAGAGCCTTGACAGAGCTCTGCAGGTGGACGACACTGATTCATTACCCAGTTAGCATACCACAGCGGGCTAGGCGGACC
ACAGCCTCCTTCCAGTCTTCTCCAGGGCTGGGAGTCTTCAACCTTCTGTCTCAGTGCAGCTTCCGCCAGCCCTCC
TCCTTTTGCACCTGAGGTGTGAACCTCCCTCCTCTCCTTCTCCCTGTGGCATGGCCCTCCTGCTACTGCAGGCTGAGCA
TTGGATTTCTTTGTGCTTAGATAGACCTGAGATGGCTTTCTGATTTATATATATATATCCATCCCTTGATCTTACATCT
AGGACCCAGAGCTGTTTGTGATACCATAAGAGGCTGGGAGATGATATGTTAAGAGTGTGTGCTGTACAAGCATGAAGAC
ATGAGTTGGAATCCCCAGCAACCATGTGGAAAAATAACCTTCTAACCTCAGAGTTGAGGGGAAAGGCAGGTGGATTCTGG
GGGCTTACTGGCCAGCTAGCCAGCCTAACCTAAATGTCTCAGTCAGAGATCCTGTCTCAGGGAATAACTTGGGAGATGA
CTGAGAAAGACACCTCCTCAGGTCTCCATGCACCCACACAGACACACGGGGGGGGGTAAATGTAATAAGCTAAGAAATA

ATGAGGGGAATGATTATTTTGGCTAAGAAATGAAATTCTGTGTTGGCGCGAAGAAGCCTTGGCCAGGGAAGGAAGCTGCTTTG
GCACACCAGGCTATTAAGTCACCATGAGTTCCTCGGCTAAGAATCACATGTAATGGAGGCCAGGTCCCTCTTGCCTGGTGG
TTGCCTCTCCCACTGGTTTTTGAAGAGAAATTCAAGAGASATCTCCTTGGTCAGAAATTGTAGGTGCTGAGCAATGTGGAGC
TGGGGTCAATGGGATTCCTTTAAGGCATCCTTCCCAAGGCTGGGTCTACTTCAATAGTAGGGTGCTTGCACAGCAAGC
GTGAGACCCCTAGGTTAGAGTCCCCAGAATCTGCCCCCAACCCCCCAAAGGCATCCTTCTGCCTCTGGGTGGGTGGGG
GAGCAACACCTTTAACTAAGACCATTAGCTGGCAGGGSTAACAATGACCTTGGCTAGAGGAATTTGGTCAAGCTGGAT
TCCGCTTCTGTAGAAAGCCCACTTSTTTCTTTGTTAAGCTGGCCACAGTTTSTTTTGAGAAATGCTGAGGGGCCAG
GAGGCTAGACAATTAAGAGCCAGGCTCATTTTGATATGTGAAGACACAGCCTGACTGCCCTGCCGTGGGAGGTACTGG
GAGAGCTGCTGTGTCCCTGCCTCACCACGCCCCCCCCCAACACAGCACTCCTCGGGTCACTGGGAGGTGCCAGCAG
CAATTTGGAAGTTTACTGAGCTTGAGAGTCTTGGGAGGGCTGAGCGCTAAGCACACCCCTTCTCCACCCCCCCCCACCCC
ACCCCGGTGAGGAGGAGGTTGAGGAACATGGGACCAACCCCTGCTCCAGCCCGTCTTATTGGCTGGCATGAGGCAGAGG
GGGTTTAAAGAGCAACCGTATCTAGGCTGGACACTGGAGCCTGTGCTACCGAGTGCCCTCTCCACCTGGCAGCATGC
AGCCCTGACTAGCCCGGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCAGCGTGCCTTCTGTGCTGTGAGAGGCCAGGGGTGGCAAGCC
TTGAGGAATGATGCCACAGAGGTCTATCCAGGGCTTGGAGAGTAACCCGAGCCTCCTCCTGAGAGCAACAGACCATGAA
CTGGGAGAGGAATGAGGAGCAGACCTCCCCACCATCCTATGACGCCAAAGGTACGGGATGAGAGAGCACATTAGTGGGG
CATGATGCTGAGAGGTGACTGGGGTGGTTTTAGCATCTTCTTCAGAGGTTTGTGTGGGTGGCTAGCCTCTGCTACATCA
GCTGAGAGGAGCATTTGCCTGGAAGAATACTAGCACAGCATTAGAACCTGGAGGGCAGCATTGGGGGCTGTTAGAGAGC
ACGCAAGGAGGAGGTGGAGGCTGAGGTGAGCGAGAGCTGGCATTAAACCGGGCATGGGCTTGTATGATGGTCCAGAGATC
TCTCTCTAAGGATGAGGACACAGGTGAGATCTAGCTGCTGACCACTGGGGAGTGATATGTTGAGGCTGGATGCCAGATG
CCATCCTGCTGCTGCTACTATATCCACATGACCAACCATGAGGTAAAGAAAGGCCCCAGCTTGAAGATGGAGAAACCGAGA
GGCTCCTGAGGTAAAGTCAACCTGGGAGTAAGAAGAGCTGAGACTGGAAGCTGGTTTGTATCCAGATGCAAGGCAACCCCTAG
ATTGGCTTTGGTGGAAACCTGAAGCCAGGAGGAATCCCTTTAGTTCCCCCTTGCCAGGGTCTGCTCAATGAGCCAGA
GGTTTAACTATTAAAGAACAGGGTTTGTAGGTGGCATGTGACATGAGGGGCAGCTGAGTGAATGTCCCCGTGTATGAGCA
GAGGTGGCACTACTTGGCTGAGCTTGACCCCTGACCCAGCTTTGCCTCATTCTGAGGACAGCAGAACTGTGGAGGC
AGAGCCAGGACAGAGAGATGCCTGGGGTGGGGGTGGGGTATCACGCACGGAACTAGCAGCAATGAATGGGGTGGGGTGG
CAGCTGGAGGGACACTCCAGAGAAATGACCTTGTGGTCAACATTTGTGTGGGAGGAGAGCTCATTTTCCAGCTTGCCAC
CACATGCTGTCTCCTGCTGTCTCCTAGCCAGTAAGGGATGTGGAGGAAGGGGCCACCCCAAGGAGCATGCAATGCAGTCA
CGTTTTTTCAGAGGAGAGTGTGACCTAAGGGCACTATTCTTGAAGAGCCCCAAACTAGTCTTCCCTGGGCAACAGG
CTCCCCCAGCATACCACCTCTGCAGGGGTGAGTAAATTAAGCCAGGCCACAGAAGGGTGGCAGGCTACACCTCCCCCT
GTTGTGCCCCCCCCCCCCCGTGAAGGTGCATCCTGGCCTCTGCCCCCTTGCTTTGGTACTGGGATTTTTTTTTTCTT
TTATGTCATATTGATCCTGACACCATGGAACCTTTGGAGGTAGACAGGACCCACACATGGATTAGTTAAAGCCTCCCAT
CCATCTAAGCTCATGGTAGGAGATAGAGCATGTCCAAGAGAGGAGGGCAGGCATCAGACCTAGAGATATGGCTGGGCAT
CCAAACCAATCTCCTTCCCCGGAGAACAGACTCTAAGTCAGATCCAGCCACCCCTTGAGTAACAGCTCAAGGTACACAGA
ACAGAGAGTCTGGTATACAGCAGGTGCTAACAACATGCTTGTGGTAGCAAAAGCTATAGGTTTTGGGTGAGAACTCCGA
CCCAAGTCGGAGTGAAGAGCGAAAGGCCCTCTACTGCGCACCGCCCCCGCCCCCACCTGGGGTCTATAACAGATCACTT
TCACCCCTTGCGGGAGCCAGAGAGCCCTGGCATCTAGGTAGCCCCCCCCCGCCCCCCCCCGCAAGCAGCCAGCCCTGCC

TTTGGGGCAGTTCTTTTTCTCAGCCTGGACCTGTGTAATGAGGGGGTTGGACGGCCGCCCTTTGGTCCGCTTTCAAGTCT
 AATGAATTCCTTATCCCTACCACTTCCCTTCTACCCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACUATTCATTAACT
 CTCCACTCCTTTCTCCATCTCCTGGATACCGCCCTGTCCAGTGGCTGGTAAGGAGCTTAGGAGGACCAGAGCCAG
 GTGTGGCTAGAGGCTACCAAGCAGGGCTGGGGATGAGGAGCTAACTGGAGAGTGTGTGGTTAGTAGGCACAAAGCCTT
 GGGTGGGATCCCTASTACCGGAGAACTGGAGATGGGGCTGAGAAGTTCAAGACCATCCATCCTTAAGTACACAGCCAGT
 TTGAGGCCAGCCTGGGCTACATAAAACCCCAATCTCAAGAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTGCCCGATGTA
 ATAGTGGATGAAGTGTGAATCCTGGGGCAACCTATTTACAGATGTGGGAAAGCAACTTTAAGTACCCCTGCCACA
 GATCACAAGAAAGTAAAGTACAGAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCAGAGGACAGGGAGAGAGAGGCCAGGGTGGG
 ATCTCACTGCTCCCGGTGCTCCTTCTATATCCATACAGATTGGAAAGCCAGGGCAGGTTTGGAAAGAGAGAGAA
 GGTGGAAAGGAGCAGACCACTCTGGCTAGGCTGCAGCCCTCACGCATCCCTCTCTCCGCAGATGTGTCCGAGTACAGCT
 GCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGTACAGAGCGGCCATGCCGACGSCCAAGCCGCTCACCGAGTTGGTGTCTCC
 GGCAGTGGGCCCGGGGGCTGTGCCAACGCCATCGGGCGGTGAAGTGTGGCGCCCGAAGGACCGGATTTCCG
 CTGCATCCCGATGCTACCGCGCGCAGCGGTGCAGCTGTGTGCCCGGGGGCGCGCGCCGCTCGCGCAAGGTGC
 GTGTGGTGGCTGTGCAAGTGCAAGCGCTCACCCGCTTCCACACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGAGAGCC
 GCGCGCGCAGAAAGGTGGCAAGCGCGCGCCGGCGCGGGGAGCCAAAGCCACACAGGCGGAGCTGGAGAACCCCTA
 CTAGAGCGAGCCCGCCCTATGCAGCCCGCGGATCCGATTGTTTTAGTGTAAAGCCTGCAGCCAGGCCAGGGGT
 GGCCTACTTTCCAGACCGTGTGGAGTTCACAGCCAGTAGAGACCGCAGGTCTTCTGCCCGCTCGCGGGATGGGGAGG
 GGGTGGGTTCCCGGGGCCAGGAGAGGAAGCTTGAGTCCAGACTCTGCTAGCCCCGGGTGGGATGGGGGTCTTTCTA
 CCGTCGCGGACCTATACAGGACAGGCAAGTGTTCACCTTAAGGGGAGGGAGTGTGGAACGAAGACCTGGGACTGG
 TTATGGACGTACAGTAAGATCTACTCCTTCCACCCAAATGTAAAGCCTGCGTGGGCTAGATAGGGTTTCTGACCTGACC
 TGGCCACTGAGTGTGATGTTGGGCTACGTGGTTCTTTTTGTGTACGCTCTCTTTGTAAATAGGGACCGGAATCTGCT
 GAGATTCCAGGATTGGGGTACCCGCTGTAGACTGGTGAGAGAGAGGAGAACAGGGGAGGGTTAGGGGAGAGATTGTGG
 TGGGCAACCGCTAGAAGAGCTGTTTGTGGCTCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTTGGCTTCCCCCACTCCTTCTCTC
 TCAATCTGCTTCAATCCATATCTGGGATAGGGAAGGCCAGGTTCCGAGAGATGGTGAAGGGCCAGAAATCACACTC
 CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCGCCCCCACTGCCTTGTCTATTTGTAAAGGATTTTCTACACAACAGTTTAAAGT
 CTTGGAGGAACTGGGCTTGCACTCACCTCCCATCTTGTCCCTTGCCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCACGG
 ACACATTTCTGTCTAGAACAGAGCGTCGTGCTGTCTCTGAGACAGCATATCTTACATTAAAAAGAAATATACGGG
 GGGGGGGGGCGGAGGGCGCAAGTGTATACATATGCTGAGAAGCTGTGAGGCGCCACAGCACCACCAATCTTTTGT
 AAATCATTTCCAGACACCTCTTACTTTCTGTGTAGATTTTAAATGTAAAGGGGAGGAGAGAGAGCGTTTGTAAACAGAA
 GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGTTGGGGCTGGTGAGTTTGGCGAATTTCCATGTGAGACTCATCCACAAAGACTGA
 AAGCGCGTTTTTTTTTTAAAGAGTTCAGTGACATATTTATTTCTCATTTAAGTTATTTATGCCAACATTTTTTCTTG
 TAGAGAAAGGCAAGTGTAAATATCGCTTGTGAAGCACAAGTGTGTGTGGTTTTTGTTTTTTGTTCCTCCCGACAGAA
 GGCATTGTTAATAAAGACAATGAATCTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTTGTGTGTCAACCACACACAATGTCTCGCCACT
 GTCATCTCACTCCCTTCCCTTGGTCACAAGACCCAAACCTTGACAAACCTCCGACTGCTCTCTGGTAGCCCTTGTGGCA
 ATACGTGTTTCTTTTGAAGTACATTCATCCTTTCTTTTGCAAACTGGCTCTCATTTCCCGAGCTGGGTATCGTCAT
 ACCCTCACCCAGCCTCCCTTTAGCTGACCACTCTCCACACTGTCTTCCAAAAGTGCACGTTTCCCGAGCCAGTTCCCT

GGTCCAGGTGATCCCATTTGCTCCTCCTTGCTCCAGACCCCTCTCCACAAAGATGTTGATCTCCCACTCCATCAAGGCC
AGTGGCCCTGCGGCTATCCCTGTCTCTTCAGTTAGCTGAATCTACTTGCTGACACCACATGAATTCCTTCCCTGTCTTA
AGGTTTCATGGAATCTTGCTGCGGCTGAACCTTCCAGGACTGTCCAGGCTGTGATGTCTCTCTCTTGTAAAGCC
CACCCCACTATTGTGATTCCAAATTCTAGATCTTCCCTTGTTCTATTCTTTCACGGGATAGTGTCTCATCTGGCCAGTCTT
GCTTGATATTGGGATAAATGCAAGGCCAAGTACAAATTGAGGACCAAGTTCATCATTGGGCCAAGCTTTTTCAAAATGTGA
TTTTACACCTATAGAAGTGTAAAGCCCTCCAAAGCAGAGGCATGCTGGCTCTTCTCTCAACATCAGGGCTCCTGCTT
TATGGGTCTGGTGGGCTAGTACATTCATAPACCAACACTAGGGGTGTGAAGCAAGATGATTGGGAGTTCGAGGCCAAT
CTTGGCTATGAGGCCCTGTCTCAACCTCTCCTCCCTCCCTCCAGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTG
CAACACTTTAATCCAGTCAAGTGCACTTTTGGTGAAGGGAATCTATCCTAATATAGCTTCCATCTTGATTGTGT
ATGTGCACACTGGGGGTTGAACCTGGGCTTTGTACCTGCGGGGCAAGCTCTCTACTGCTCTAACCACAGCCCTCACTGG
CTTTCTGTTTCAACTCCCAATGAATTCCTCAATGAATTATCAATATCATGTCTTTGAAAAATACCATTGAGTGCTGCT
GGTGTCCCTGTGGTTCCAGATTCCAGGAAAGGACTTTTCAGGGAATCCAGGCATCCTGAAGAATGTCTTAGAGCAGGAGGC
CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCACAAAGGCAGTGTGGTGCAGAGGCTGAGGATGGAGGCAGGCTTGCATTGAAGCTGAGA
CAGGGTACTCAGGATTAAAGCTTCCCCCAAACCAATTCCAAGATCAGTTCTCTGGTACTTGACCTGTTCAAGCTATGCA
GAGCCCACTGGGCATAGGTGAAGACACCGTTGTACTGTCTGTACTAATGTGCTTCAGAGCCGGCAGAGACAAATAAT
GTTATGTTGACCCAGGGGACAGTGATTCCAGAAGGAACACAGAGAGAGTGTGCTGCTAGAGGCTGCTGAAGGAGAGGG
GTCCCAAGCTCTCTAAGCAAGACTCCACTCACATAAGACACAGGCTGAGCAGAGCTGGCCGTGGATGCAGGGAGCCCA
TCCAGCATCCTTTAGCATGCCCTTGATTTCCCATCACATGCCAGGGATGAGGGGCATCAGAGAGTCCAAGTGATGCCCA
ACCCAAACACACCTAGGACTTGCTTTCTGGGACAGACAGATGCAGGAGAGACTAGGTTGGGCTGTGATCCCATACCA
AAGAGGGAAAAACAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAAC
GGTCAGGTTAGAGTTTATTTATGGAAGTTTATATTCTACCTCCATGGGGTCTACAAGGCTGGCGCCCATCAGAAAGACA
AACAAACAGGCTGATCTGGGAGGGGTGGTACTCTATGGCAGGGAGCACGTGTGCTTGGGGTACAGCCAGACACGGGGCTTG
TATTAAATCACAGGGCTTGTTAATAGGCTGAGAGTCAAGCAGACAGAGAGACGAPAGGAACACACACACACACACACAC
CACACACACACACACACACATGCACACACCACTCACTTCTACTCGAAGAGCCCTACTTACATTCTAAGACAAAC
ATTCTCTCTCATAAAGGAGACAAAGTTGCAGAAACCCAAAGAGCCACAGGGTCCCCACTCTCTTTGAATGACTTGGAC
TTGTTGCAGGGAAGACAGAGGGGTCTGCAGAGGCTTCTGGGTGACCCAGAGCCACAGACACTGAATCTGGTGTGAGA
CCTGTATAAACCTCTTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGCCACATTCCCCAACCTGTCTCCTGACCCTGAGGATGAGA
GCACCTTGGGCTTCCCCATTCTTGGAGTGACCCCTGGTTTCCCCATCTGAGGGACATGAGGTCTCAGGTCTTGGGAAAG
TTCCACAAGTATTGAAGTGTTCTTGTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
GTGTAGCATTTACAAGCCTGGTGCCTGAGGAGATCAGAAGATGGCATCAGATACCCTGGAACTGGACTTGCAGACAGTTA
TGAGCCACTGTGTGGGTGCTAGGAACAGAACCTGGATCCTCCGGAAGAGCAGACAGCCAGCGCTCTTAGCCACTAAGCCA
TCACTGAGGTTCTTTCTGTGGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTTCTTTTAGTCAATAGGACCATGAATGTTCTT
CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGATCCCCAGTGACACCGATGGCCCTGTGTAGTTATTAGCAGCTCTAGTCTTATTC
CTTAATAAGTCCCAGTTTGGGGCAGGAGATATGTATTTCCCTGCTTTGAAGTGGCTGAGGTCCAGTTATCTACTTCCAAGT
ACTTGTGTTCTCTTCTGGAGTTGGGGAAGCTCCCTGCCTGCCTGTAATGTGTCCATTCTTCAACCTTAGACAAGATCAC
TTTCCCTGAGCAGTCAGGCCAGTCCAAAGCCCTTCAATTTAGCTTTTATAAGGAACACCCCTTTTGTGGGTGGAGGTA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

CTGTAGCAACCCCTCCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGGGCGCCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG
 GAGTCACCTCGGGTACCATTTGTTTAGGGAGGTGGGGATTGTGGTGTGGAGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTTCAACA
 ATGGTTGATGAGTTGGAACATAAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGGCTTGCCAGCTTCCACATCTGCC
 CCCCACCCCTGTCTGGCACCAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC
 ACCTCTTCTGGACCATCAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCCTAGGCTCCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC
 AGCTATCTCTGAGCTGGAACTATTTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCGGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC
 TTGCTAAAGCAAGTGCTGTGATTTATCTAAACAGAGCGGTGGACCCACCCACAGGACAAAGTATGTATGCATCTGT
 TTCATGTATCTGAAGAGCGACACAACCATTTTTCACATCATGGCATCTTCTTAACCCCCATTCTTTTTTGTGTGTGT
 TTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGTCTGGCTGTCTGGAACCTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAATCAGAAATC
 CTGGGATTAAAGGTGTGTGCCACCACGCCCGGCCCTAACCCCCATTCTTAATGGTGATCCAGTGGTTGAATTTGGGGCC
 ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGCTGTCTTCTGAGCTACCTGGTACAACTCTTTATCCCTGGGGCCTGGGCTCCTG
 ATCCCTGACTCGGGCCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGCCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGCCCGAACAAAGTCCAGTCCCT
 AGCTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGGCTGTTCTTACTTACACTCTTCCCCTTGCTCTGGACTTGTGCTTTCTTTA
 CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAAGCCACCTCTGTAAAGACAACTAAGATAATACTTCCCTCAAGCACGGAAAGTCTG
 AGTCACCACACCTCTGGAGGTGTGTGGACACATGTTTCATGCGTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

ID de Secuencia Núm. 18: Secuencia Genómica de BEER Humana (Este gen tiene dos exones, en las posiciones 161-427 y 3186-5219)

5

tagaggagaa gtcttttgggg aggggtttgct ctgagcacac ccctttccct ccctccgggg 60
 ctgagggaaa catggggacca gccctgcccc agcctgtcct cattgggtgg catgaagcag 120
 agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180
 ggtggcgtgc cctcctctgg ctggtaccat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240
 cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag ggggtggcagg cgttcaagaa 300
 tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360
 gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc acccctttga 420
 gaccaaaggt atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggtttttaga 480

ES 2 639 020 T3

aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg 540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgcttg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600
gccttcaa at tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtagagc ccagggcagg 660
gaggacgctg gggtaggtgag ggtatggcat caggcatca gaacaggctc aggggctcag 720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctctctct gggaatatag gagccacgct cagctgctgg 780
taccactggg aagggaaaca ggtaaggagg cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840
caccggacac tctatgctgg tggtagctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900
cccaggaggt gaacccccag ctggaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gttgatcca actgcaagat agccctggtg 1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080
ccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccaggagct ggcacttgaa ggaatgggag 1140
ttttcggcac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtctca gcagccacc cagtcaccaac 1260
cttgcctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt gggttcctgg tcaggcctgc 1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tctgaggcc 1380
atqggggcgt ctgaaatgac acttcagact agagcttcc ctgtctctg gccattatcc 1440
aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggaccca gccctccccg cctcacaacc 1500
tgttgggact atggggtgct aaaaaggga actgcatggg aggccagcca ggacctccg 1560

ES 2 639 020 T3

tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620
tgggctccag cgactgcctg aagggtgta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc 1680
tggactccca cgagaggcca cagccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga 1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggcg ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctcccctgc 1920
tgtgcttgc cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980
tcttaagact attttccatt ctttcttgc acattggaac tatccccatg aaacctttgg 2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccaccc atctaagtcc 2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160
tctgcctgcc caggagtat caccatgagg cggccattca gataacacag aacaagaaat 2220
gtgccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag 2280
agtcagggc ccctatggtg ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agtccatcc 2340
cccagcccag cctcccatgg atgctgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400
ggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttgga acactgcctt 2520
tgattccttt caagtcta atgaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctgcct 2580
ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactcctttc tccatcccct 2640

ES 2 639 020 T3

gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700
tgtgctgagt acttaccctg ccagggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaate 2760
ataagaagac ccagaagag aatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820
atatgtgcca aatggatatt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacttqccc aaqatqacac 2940
ctgcagtgag cgatggagcc ctggtgtttg aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000
caggggtgcg aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tgggaccttc ctgcaataga 3060
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120
gacgggcccg tccagggcag ggggtggccag gcgggcccgc accctcacgc gcgcctctct 3180
ccacagacgt gtccgagtac agctgccgcg agctgcactt caccgctac gtgaccgatg 3240
ggcgtgccc cagcgccaag ccggtcaccg agctggtgtg ctccggccag tgcggcccgg 3300
cgcgctgct gcccaacgcc atcgccgcg gcaagtggcg gcgacctagt gggcccgaact 3360
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcg agcgctgca gctgctgtgt cccggtgggtg 3420
aggcgccg cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgaag cgcctcacc 3480
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg 3540
gcccgaagcc ggggccccgc gcccyyagcg ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600
cctactagag cccgcccgcg cccctcccca ccggcgggcg ccccgccct gaaccgcgc 3660
cccacatttc tgcctctgc gcgtggttg attgtttata ttccattgta aatgcctgca 3720

ES 2 639 020 T3

acccagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccggggcg cggaaggcc 3780
ccctcagcc cgccagctga ggggtccac ggggcagggg aggggaattga ggtcacaga 3840
cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacctt tgctgggtccc acttcagagg 3900
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggttttaa gggagcgggtg tgggagtggg 3960
aaagtccagg gactgggttaa gaaagtggga taagattccc cttgcacct cgctgcccac 4020
cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcaca gactgggggc aactgtagat gtggtttcta 4080
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct ccttcgggac 4140
ctcaatttcc actttgtaaa atgaggggtg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt 4200
ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320
gagttgtgat gctctcttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440
ttcccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500
catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgaggggtg gtgggagggg tagaaatcac 4560
atccgccccca acttcccaa gagcagcatc cctccccga cccatagcca tgttttaaag 4620
tcaccttccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgaggagca 4680
gccatcaca actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gcccaccact 4740
cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

ES 2 639 020 T3

ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860
tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920
tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040
aagaatgaaa gtagtgggtt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100
atztatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac 5160
agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220
gatgtggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280
tcttggtcac tagagctcca accttggaaca cacctttgac tgctctctgg tggcccttgt 5340
ggcaattatg tcttcctttg aaaagtcatg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc 5400
atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tctttttagc agcctcccct 5460
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca 5520
tagctcccc ttgccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580
gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640
ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccacca ataactaatc ctctttcttt 5700
aggattcaca ttacttgta tcttttcccc taacctcca gagatgttcc aatctcccat 5760
gatccctctc tctctgagg ttcagcccc tttgtctac accactactt tggttcctaa 5820
ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

ES 2 639 020 T3

ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940
tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaagg gtcttaatag tgctggatgc 6060
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120
ggtagggatgg tcaactggaa agctttaaag taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180
cccacaaaga aagctgaggt cctcctgat gacttgtcag tttaactacc aataaccac 6240
ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccggtcc 6300
cttctggggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgtgttt 6480
tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgcccc ggctggagtg cagtgtcaca 6540
atctcggtt actgcaactt ctgcctccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tatttttgat 6660
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720
gcctgcctcg gcctcccaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccca 6780
ggttggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaagtgtt tgcccacagc 6840
catacttggg ctcagttcct tgcctaccc ctcaattgag ctgcttagaa cctgggtggc 6900
acatgggcaa taaccaggtc acactgtttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960

ES 2 639 020 T3

agtaatttgc tctgtggagg ggatgagggg tagtggttag ggaaagcttc acaaagtggg 7020
 tgttgcttag agattttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080
 caaagactgc aagtgcattg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg 7140
 taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200
 aaacctaggg tctgctttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat 7260
 cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagagggtta 7320
 tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaag 7380
 gaacaaacaa cagacctagc tgggaggggc agcattttgt ttaggggggc ggggcacatg 7440
 ttctgggggt acagccagac tcagggttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500
 gggatagaag gaaataggtc ctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560
 tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa 7620
 gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaactgttg aggagccaca 7680
 ggaccccaaa attccctggt ttcttgaat caggcaggac ttacgcagct gggagggtgg 7740
 agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaagctg 7800
 gtgccatgtc ccacaccgc ccacctcca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860
 aacctggctc ccagatcatt gattatagct ctggggcctg caccgtcctt cctgccacat 7920
 cccacccca ttcttggaaac ctgccctctg tcttctcctt tgtccaaggg caggcaaggg 7980
 ctcagctatt gggcagcttt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040

ES 2 639 020 T3

aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc caggggtggtc 8100
tcgtttacac ctgtaggcca agcgtaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160
gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220
gcgtgggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280
gaggtcacga gttagagact ggcttgcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340
acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgagc gagccaagat tgtgccactg 8460
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaggat actgtcaatc 8520
actgcaggaa gaaccaggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580
cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat ggggtactgaa gggtgccctg 8640
aatgacgttc tgctttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcatgcct gttcatgggt 8700
gagagactaa attcatcatt ccttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgccctcca 8760
atgccaatt tcctacaat tgtctggggg gcctaagctt ctgccacca agagggccag 8820
agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataaggag gtgggaaaga 8880
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgagggc 8940
tggtcatgcc agcagattta aggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga ggggatcat tcattcattc cattgctact 9060
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt 9120

ES 2 639 020 T3

ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180

ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctgggtg 9240

agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300

c 9301

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>Brunkow, Mary E. Galas, David J.	
5	Kovacevich, Brian Mulligan, John T. Paeper, Bryan W. Van Ness, Jeffrey Winkler, David G.	
10	<120> COMPOSICIONES Y METODOS PARA INCREMENTAR LA MINERALIZACION OSEA	
	<130> 240083.508	
15	<140> US <141> 1999-11-24	
	<160> 41	
20	<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0	
	<210> 1 <211> 2301 <212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctccac	60
	tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg	120
	ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180
	agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagAAC ggagggcggc	240
	ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
	tcaccgccta cgtgaccgat gggcgtgcc gcagcgcaa gccggtcacc gagctggtgt	360
30		

ES 2 639 020 T3

gctccggcca	gtgcggcccc	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catcgccgc	ggcaagtgg	420
ggcgacctag	tgggcccag	ttccgctgca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgcgctgc	480
agctgctgtg	tcccgggtgt	gaggcgccgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgcaa	gcgcctcacc	cgcttccaca	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
aggccgctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgccggcccc	cgcccgaggc	gccaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcgcgc	gcccctcccc	accggcgggc	720
gccccggccc	tgaacccgcg	ccccacatct	ctgtcctctg	cgcggtggtt	gattgtttat	780
atttcattgt	aaatgcctgc	aaccagggc	agggggctga	gaccttccag	gccctgagga	840
atccccggcg	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gaggggaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaagcatt	ttcaccgccc	tggggtttta	1020
agggagcggg	gtgggagtgg	gaaagtcag	ggactgggta	agaaagtgg	ataagattcc	1080
cccttgccacc	tcgctgcccc	tcagaaagcc	tgaggcgctg	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtggtttct	agtcctggct	ctgccactaa	cttgcgtgtg	aaccttgaac	1200
tacacaattc	tccttcggga	cctcaatttc	cactttgtaa	aatgaggggtg	gaggtgggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggtcact	tccagaattc	agagttgtga	tgctctcttc	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggctga	catatttacg	gctgacaaac	1500
tcctggaaga	agctatgctg	cttcccagcc	tggtctcccc	ggatgtttgg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgagggg	1620
gggtgggagg	atagaaatca	catccgcccc	aacttcccaa	agagcagcat	ccctcccccg	1680
acccatagcc	atgtttttaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaagggtta	aggacactgg	1740
ccttgaggcg	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atttctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttacctaa	aagaatatta	ttgggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tctttttgaa	1980
aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgtagttttt	aattgttaaa	aaaaaaaagt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcggtttt	ttggcaattc	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
atatttttcc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagttttcc	ttgtagagaa	tgacaatgtt	2220
aatattgctt	tatgaattaa	cagtctgttc	ttccagagtc	cagagacatt	gttaataaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 639 020 T3

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
1 5 10 15
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
20 25 30
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
50 55 60
Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80
Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95
Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110
Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125
Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205
Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 2
<211> 2301
<212> ADN

5

ES 2 639 020 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

agagcctgtg	ctactggaag	gtggcgtgcc	ctcctctggc	tggtaccatg	cagctcccac	60
tggccctgtg	tctcgtctgc	ctgctggtac	acacagcctt	ccgtgtagtg	gagggctagg	120
ggtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccc	cgagctcggg	gagtaccccg	180
agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	cccccttgag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcacccgcta	cgtgaccgat	gggccgtgcc	gcagcgccaa	gccggtcacc	gagctgggtgt	360
gctccggcca	gtgcggcccg	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catcggccgc	ggcaagtggg	420
ggcgacctag	tgggccccgac	ttccgctgca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgcgtgc	480
agctgctgtg	tcccgggtgg	gaggcgccgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgcaa	gcgcctcacc	cgcttcacac	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
aggcgcctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcgcccccg	cgcccgagc	gccaaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcgccg	gccccctccc	accggcgggc	720
gccccggccc	tgaacccgcg	ccccacattt	ctgtcctctg	cgcggtggtt	gattgtttat	780
atttcattgt	aaatgcctgc	aaccagggc	agggggctga	gaccttcacg	gccctgagga	840
atccccggcg	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gagggcaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaaagcatt	ttcacccgcc	tgggggtttta	1020
agggagcggg	gtgggagtgg	gaaagtccag	ggactgggtta	agaaagttag	ataagattcc	1080
cccttgccac	tcgctgcccc	tcagaaagcc	tgaggcgtgc	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtggtttct	agtcctggct	ctgccactaa	cttgctgtgt	aaccttgaa	1200
tacacaattc	tccttcggga	cctcaatttc	cactttgtaa	aatgaggggt	gaggtgggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggctact	tccagaattc	agagttgtga	tgctctcttc	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggctga	catatttacg	gctgacaaac	1500
tcctggaaga	agctatgctg	cttcccagcc	tggcttcccc	ggatgtttgg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgagggg	1620
ggtgggaggg	atagaaatca	catccgcccc	aacttcccaa	ayaycaycal	cccccccccy	1680
acccatagcc	atgtttttaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgccaggc	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atttctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttacactaa	aagaatatta	ttgggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tctttttgaa	1980

ES 2 639 020 T3

```
aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tctagttttt aattgttaaa aaaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttaacat 2160
atttattttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gtaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301
```

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
1 5 10 15
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly
```

20

<210> 5
<211> 2301
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctccac 60
tgccctgtg tctcatctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccg cgagctcgga gactaccccg 180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagaac ggagggcggc 240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact 300
tcaccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctgggtg 360
gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtgg 420
ggcgacctag tgggcccagc ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgcgcg gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcacac accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc gcgcgccccg cggccggagc gccaaagcca 660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgccccg gccctcccc accggcgggc 720
```

ES 2 639 020 T3

gccccggccc tgaacccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat	780
atttcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga	840
atccccggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg	900
gaggggaattg agagtacag acactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct	960
ttgctgggcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgccc tggggtttta	1020
agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactgggta agaaagttgg ataagattcc	1080
cccttgacc tcgctgccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg	1140
caactgtaga tgtgggttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggtg gaggtgggaa	1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga tcccaaggac tccagtgcct tttgaatggg	1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc	1380
caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa	1440
caaacagaaa aaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac	1500
tcctggaaga agctatgtcg cttccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggg	1620
gggtgggagg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctcccccg	1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaagggttca aggacactgg	1740
ccttgcaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga	1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc	1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt	1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc caccacaaaa tctttttgaa	1980
aatcattttc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaaa aaaaaaagt	2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc	2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat	2160
atttattttc tcaactaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatgtt	2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gtttaataaag	2280
acaatgaatc atgaccgaaa g	2301

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Thr

1

5

10

15

10

ES 2 639 020 T3

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
20 25 30
Ala Thr Glu Ile Ile Arg Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
50 55 60
Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80
Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95
Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110
Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125
Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205
Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 7
<211> 2301
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctctcttggc tggtagcatg cagctcccac 60
tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120
10 ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aatcatccg cgagctcgga gattaccccg 180

ES 2 639 020 T3

agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	cccctttgag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcacccgcta	cgtgaccgat	gggccgtgcc	gcagcgccaa	gccggtcacc	gagctggtgt	360
gctccggcca	gtgcggcccc	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catcggccgc	ggcaagtggc	420
ggcgacctag	tggggccgac	ttccgctgca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgctgac	480
agctgctgtg	tcccgggtgt	gaggcgccgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgcaa	gcgcctcacc	cgcttcacaa	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
aggccgctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcggccccc	cgcccgagac	gccaaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gctactaga	gcccgccgcg	gcccctcccc	accggcgggc	720
gccccggccc	tgaacccgcg	ccccacattt	ctgtctctct	cgcgtgggtt	gattggttat	780
atttcattgt	aaatgcctgc	aaccagggc	agggggctga	gaccttccag	gccctgagga	840
atccccggcg	cgggcaaggc	ccccctcagc	ccgccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gaggggaattg	agagtacacg	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaaagcatt	ttcaccgccc	tggggtttta	1020
agggagcggc	gtgggagtg	gaaagtccag	ggactgggtt	agaaagttgg	ataagattcc	1080
cccttgccac	tcgctgcccc	tcagaaagcc	tgaggcgctg	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtggtttct	agtctctggt	ctgccactaa	cttgctgtgt	aaccttgaac	1200
tacacaattc	tccttcggga	cctcaatttc	cactttgtaa	aatgaggggt	gaggtgggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggtcact	tccagaattc	agagttgtga	tgctctcttc	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggctga	catattttac	gctgacaaac	1500
tcctggaaga	agctatgctg	cttcccagcc	tggcttcccc	ggatgttttg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgagggc	1620
ggtgggaggg	atagaaatca	catccgcccc	aacttcccaa	agagcagcat	ccctcccccg	1680
acccatagcc	atgtttttaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgtaggc	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atttctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttactacta	aagaatatta	ttgggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tctttttgaa	1980
aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgtagttttt	aattgtttaa	aaaaaaaggt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcgttttt	ttggcaattc	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
atttattttc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagtttttc	ttgtagagaa	tgacaatggt	2220
aatattgctt	tatgaattaa	cagtctgttc	ttccagagtc	cagagacatt	gttaataaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

<210> 8

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 8

ES 2 639 020 T3

Met	Gln	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Val	His	Thr
1				5					10					15	
Ala	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Gly	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp
			20					25					30		
Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro
		35					40					45			
Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Lys	Thr	Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg
	50					55					60				
Pro	Pro	His	His	Pro	Phe	Glu	Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser	Cys
65					70					75					80
Arg	Glu	Leu	His	Phe	Thr	Arg	Tyr	Val	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ser
			85					90					95		
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Leu	Val	Cys	Ser	Gly	Gln	Cys	Gly	Pro	Ala
		100						105					110		
Arg	Leu	Leu	Pro	Asn	Ala	Ile	Gly	Arg	Gly	Lys	Trp	Trp	Arg	Pro	Ser
	115						120						125		
Gly	Pro	Asp	Phe	Arg	Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val
	130					135						140			
Gln	Leu	Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Arg
145					150					155					160
Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Phe	His	Asn	Gln
			165					170					175		
Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Lys	Gly
		180						185					190		
Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Lys	Ala	Asn	Gln	Ala	Glu
		195					200						205		
Leu	Glu	Asn	Ala	Tyr											
	210														

ES 2 639 020 T3

<210> 9
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Cercopithecus pygerythrus

5

<400> 9
 atgcagctcc cactggccct gtgtcttgtc tgccctgctgg tacacgcagc cttccgtgta 60
 gtggagggcc aggggtggca ggccttcaag aatgatgcc a cggaatcat ccccgagctc 120
 ggagagtacc ccgagcctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa ccgggaggag 180
 aatggagggc ggcctcccca ccaccccttt gagaccaag acgtgtccga gtacagctgc 240
 cgagagctgc acttcacccg ctacgtgacc gatgggcccgt gccgcagcgc caagccagtc 300
 accgagttgg tgtgtctccgg ccagtgcggc ccggcacgcc tgctgcccga cgccatcggc 360
 cgcggaagt ggtggcgccc gagtgggccc gacttccgct gcatccccga ccgctaccgc 420
 gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccggg ggtgcccgcgc cgcgcgcgcg caaggtgcgc 480
 ctgggtggcct cgtgcaagtg caagcgcctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag 540
 gacttcggtc ccgaggccgc tcggccgcag aagggccgga agccgcggcc ccgcgcccgg 600
 ggggccaaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag 642

<210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Cercopithecus pygerythrus

10

<400> 10

15

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60
 Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
 65 70 75 80
 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
 85 90 95

ES 2 639 020 T3

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110
Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125
Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205
Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 11
<211> 638
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 11

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgct	60
gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagaggtcat ccagggcctt	120
ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga	180
ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgcc aaaggtgtgt ccgagtacag ctgccgag	240
ctgcactaca cccgcttcc gacagacggc ccatgccgca gcgccaagcc ggtcaccgag	300
ttggtgtgct ccggccagtg cggccccgcg cggtgtgtgc ccaacgcat cgggcgcgtg	360
aagtgggtggc gcccgaaagg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta ccgcgcgag	420
cgggtgcagc tgctgtgccc cgggggcgcg gcgccgcgct cgcgcaaggt gcgtctggtg	480
gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgcg ttccacaacc agtcggagct caaggacttc	540
gggccggaga ccgcgcggcc gcagaagggc cgcaagccgc ggcccggcgc ccggggagcc	600
aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactagag	638

<210> 12
<211> 211
15 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

ES 2 639 020 T3

Met Gln Pro Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Ala
1 5 10 15
Ala Phe Cys Ala Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Arg Asn Asp
20 25 30
Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45
Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro
50 55 60
His His Pro Tyr Asp Ala Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu
65 70 75 80
Leu His Tyr Thr Arg Phe Leu Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys
85 90 95
Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu
100 105 110
Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro
115 120 125
Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu
130 135 140
Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val
145 150 155 160
Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu
165 170 175
Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys
180 185 190
Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu
195 200 205
Asn Ala Tyr
210

<210> 13

<211> 674

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

ES 2 639 020 T3

```

gaggaccgag tgccttcct cttcttgga ccatgcagct ctactagcc cctgccttg      60
cctgcctgct tgtacatgca gccttcgttg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca    120
agaatgatgc cacagaaatc atcccgggac tcagagagta cccagagcct cctcaggaac    180
tagagaacaa ccagaccatg aaccggggccg agaacggagg cagaccccc caccatcctt    240
atgacaccaa agacgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc cgcttcgtga    300
ccgacggccc gtgcgcagct gccaaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg    360
gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc ccgaacggac    420
ccgacttcctg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg    480
gcggcgcggc gccgcgctcg cgcaagggtc gtctggtggc ctctgcaag tgcaagcgcc    540
tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggccgc    600
agaagggctc caagccgcgg ccccgcgccc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg    660
agaacgccta ctag                                     674

```

<210> 14
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5

```

Met Gln Leu Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ala Cys Leu Leu Val His Ala
  1              5              10              15
Ala Phe Val Ala Val Glu Ser Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
      20              25              30
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln
      35 -              40              45
Glu Leu Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
      50              55              60
Pro Pro His His Pro Tyr Asp Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
      65              70              75              80
Arg Glu Leu His Tyr Thr Arg Phe Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
      85              90              95
Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala

```

10

ES 2 639 020 T3

100 105 110
 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn
 115 120 125
 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
 130 135 140
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
 165 170 175
~~Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly~~
 180 185 190
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195 200 205
 Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

<210> 5
 <211> 2301
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

agaatgatgc cacagaaatc atccccgagc tgggcgagta ccccgagcct ctgccagagc 60
 tgaacaacaa gaccatgaac cgggcggaga acggagggag acctccccac caccctttg 120
 agaccaaaaga cgcctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcacccgc tacgtgaccg 180
 atggggcgtg ccgcagcgcc aagccgggtca ccgagctggg gtgctcgggc cagtgcggcc 240
 cggcgcgccct gctgcccac gccatcgccc gcggcaagtg gtggcgccca agcgggcccc 300
 acttccgctg catccccgac cgctaccgcg cgcagcgggt gcagctgttg tgcctggcg 360
 gcgcggcgcc gcgcgcgcgc aaggtgcgcc tgggtggcctc gtgcaagtgc aagcgccctca 420
 ctcgcttcca caaccagtc gagctcaagg acttcgggcc cgaggccgcg cggccgcaaa 480
 cgggcccqaa actgcggccc cgcgcgcggg gcaccaaagc cagccgggccc ga 542

<210> 16
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Bos torus

<400> 16

ES 2 639 020 T3

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

<210> 17

<211> 35828

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> rasgos_misc

<222> (1)...(35828)

10 <223> n=A,T,C o G

<400> 17

ES 2 639 020 T3

cgcggttttg	tgagcagcaa	tattgcgctt	cgatgagcct	tggcggttgag	attgatacct	60
ctgctgcaca	aaaggcaatc	gaccgagctg	gaccagcgca	ttcgtgacac	cgtctccttc	120
gaacttattc	gcaatggagt	gtcattcacc	aaggacngcc	tgatcgcaaa	tgggtgctatc	180
cacgcagcgg	caatcgaaaa	ccctcagccg	gtgaccaata	tctacaacat	cagccttggt	240
atcctgcgtg	atgagccagc	gcagaacaag	gtaaccgtca	gtgccgataa	gttcaaagtt	300
aaacctgggtg	ttgataccaa	cattgaaacg	ttgatcgaaa	acgcgctgaa	aaacgctgct	360
gaatgtgcgg	cgctggatgt	cacaaagcaa	atggcagcag	acaagaaagc	gatggatgaa	420
ctggcttcct	atgtccgcac	ggccatcatg	atggaatgtt	tccccgggtg	tgttatctgg	480
cagcagtgcc	gtcgatagta	tgaattgat	aattattatc	atttgcggtt	cctttccggc	540
gatecgctt	gttaaggggc	ggcgacctcg	cggttttctg	ctatttatga	aaattttccg	600
gtttaaggcg	tttccgttct	tcttcgctcat	aacttaatgt	ttttatttaa	aataccctct	660
gaaaagaaag	gaaacgacag	gtgctgaaag	cgagcttttt	ggcctctgtc	gtttcctttc	720
tctgtttttg	tccgtggaat	gaacaatgga	agtcaacaaa	aagcagagct	tatcgatgat	780
aagcggtcaa	acatgagaat	tgcgggccgc	ataatacgac	tactataggt	gatcgacgcc	840
tactccccgc	gcatgaagcg	gaggagctgg	actccgcatg	cccagagacg	ccccccaacc	900
cccaaagtgc	ctgacctcag	cctctaccag	ctctggcttg	ggcttggggc	gggtcaaggc	960
taccacgttc	tcttaacagg	tggctgggct	gtctcttgcc	cgcgcgtcat	gtgacagctg	1020
cctagtcttg	cagtgaagtc	accgtggaat	gtctgccttc	gttgccatgg	caacgggatg	1080
acgttacaat	ctgggtgttg	agcttttcct	gtccgtgtca	ggaaatccaa	ataccctaaa	1140
ataccctaga	agaggaagta	gctgagccaa	ggcttttcctg	gcttctccag	ataaagtttg	1200
acttagatgg	aaaaaaacaa	aatgataaag	acccgagcca	tctgaaaatt	cctcctaatt	1260
gcaccactag	gaaatgtgta	tattattgag	ctcgtatgtg	ttcttatttt	aaaaagaaaa	1320
ctttagtcac	gttattaata	agaatttctc	agcagtggga	gagaaccaat	attaacacca	1380
agataaaagt	tggcatgac	cacattgcag	gaagatccac	gttgggtttt	catgaatgtg	1440
aagaccccat	ttattaaagt	cctaagctct	gtttttgcac	actaggaagc	gatggccggg	1500
atggctgagg	ggctgtaagg	atctttcaat	gtcttacatg	tgtgtttcct	gtcctgcacc	1560
taggacctgc	tgcctagcct	gcagcagagc	cagaggggtt	tcacatgatt	agtctcagac	1620
acttgggggc	aggttgcacg	tactgcatcg	cttattttcca	tacggagcac	ctactatgtg	1680
tcaaacacca	tatggtgttc	actcttcaga	acgggtgggtg	tcatcatggt	gcatttgctg	1740
acggttggat	tgggtgtaga	gagctgagat	atatggacgc	actcttcagc	attctgtcaa	1800
cgtggctgtg	cattcttgct	cctgagcaag	gggttaaaaca	gactcacagg	gtcagcctcc	1860
agctcagtcg	ctgcatagtc	ttaggggaacc	tctcccagtc	ctccctacct	caactatcca	1920
agaagccagg	gggcttggcg	gtctcaggag	cctgcttgct	gggggacagg	ttgttgagtt	1980
ttatctgcag	taggttgcct	aggcatagtg	tcaggactga	tggctgcctt	ggagaacaca	2040
tcctttgccc	tctatgcaaa	tctgaccttg	acatgggggc	gctgctcagc	tgggaggatc	2100
aactgcatac	ctaaagccaa	gcctaaagct	tcttcgtcca	cctgaaactc	ctggaccaag	2160

ES 2 639 020 T3

gggcttccgg	cacatcctct	caggccagt	agggagtctg	tgtgagctgc	actttccaat	2220
ctcagggcgt	gagaggcaga	gggaggtggg	ggcagagcct	tgcagctctt	tcctcccatc	2280
tggacagcgc	tctggctcag	cagcccatat	gagcacaggc	acatccccac	cccaccccca	2340
cctttcctgt	cctgcagaat	ttaggctctg	ttcacggggg	gggggggggg	ggggcagtcc	2400
tatcctctct	taggtagaca	ggactctgca	ggagacactg	ctttgtaaga	tactgcagtt	2460
taaatttgga	tgttgtaggg	ggaaagcgaa	gggcctcttt	gaccattcag	tcaaggtacc	2520
ttctaactcc	catcgtattg	gggggctact	ctagtgctag	acattgcaga	gagcctcaga	2580
actgtagtta	ccagtgtggg	aggattgatc	cttcagggag	cctgacatgt	gacagttcca	2640
ttcttcaccc	agtcaccgaa	catttattca	gtacctaccc	cgtaacaggc	accgtagcag	2700
gtactgaggg	acggaccact	caaagaactg	acagaccgaa	gccttggaat	ataaacacca	2760
aagcatcagg	ctctgccaac	agaacactct	ttaacactca	ggccctttaa	cactcaggac	2820
ccccaccccc	acccaagca	gttggcactg	ctatccacat	tttacagaga	ggaaaaacta	2880
ggcacaggac	gatataagt	gcttgcttaa	gcttgctctg	atggtaaatg	gcagggctgg	2940
attgagaccc	agacattcca	actctagggt	ctatttttct	ttttctctgt	tgttcgaatc	3000
tgggtcttac	tgggtaaact	caggctagcc	tcacactcat	atccttctcc	catggcttac	3060
gagtgttagg	attccagggt	tgtgtacca	tgtctgactc	cctgtagctt	gtctatacca	3120
tcctcacaac	ataggaattg	tgatagcagc	acacacaccg	gaaggagctg	gggaaatccc	3180
acagagggct	ccgcaggatg	acaggcgaat	gcctacacag	aaggtgggga	agggaaagcag	3240
agggaaacagc	atgggcgtgg	gaccacaagt	ctatttgggg	aagctgccgg	taaccgtata	3300
tggctggggg	gaggggagag	gtcatgagat	gaggcaggaa	gagccacagc	aggcagcggg	3360
tacgggctcc	ttattgccaa	gaggctcgga	tcttcctcct	cttcctcctt	ccggggctgc	3420
ctgttcattt	tccaccactg	cctcccatcc	aggtctgtgg	ctcaggacat	caccagctg	3480
cagaaaactg	gcatcaccca	cgctcctgaat	gctgccgagg	gcaggctcct	catgcacgtc	3540
aacaccagt	ctagcttcta	cgaggattct	ggcatcacct	acttgggcat	caaggccaat	3600
gatacgcagg	agttcaacct	cagtgtctac	tttgaaaggg	ccacagattt	cattgaccag	3660
gcgctggccc	ataaaaatgg	taaggaaagt	acattccggc	acccatggag	cgtaagccct	3720
ctgggacctg	cttcctccaa	agaggccccc	acttgaaaaa	ggttccagaa	agatcccaaa	3780
atatgccacc	aactagggat	taagtgtcct	acatgtgagc	cgatgggggc	cactgcatat	3840
agtctgtgcc	atagacatga	caatggataa	taatatttca	gacagagagc	aggagttagg	3900
tagctgtgct	cctttccctt	taattgagt	tgccattttt	tttattcatg	tatgtgtata	3960
catgtgtgtg	cacacatgcc	ataggttgat	actgaacacc	gtcttcaatc	gttccccacc	4020
ccaccttatt	ttttgaggca	gggtctcttc	cctgatcctg	gggctcattg	gtttatctag	4080
gctgctggcc	agttagctct	ggagtctctg	ttttctctac	ctccctagcc	ctgggactgc	4140
aggggcatgt	gctggggccag	gcttttatgt	cgcttgggg	atctgaactt	aggtccctag	4200
gcctgagcac	cgtaaagact	ctgccacatc	ccagcctgt	ttgagcaagt	gaaccattcc	4260
ccagaattcc	cccagtgggg	ctttcctacc	cttttattgg	ctaggcattc	atgagtggtc	4320

ES 2 639 020 T3

acctcgccag	aggaatgagt	ggccacgact	ggctcaggg	cagcagccta	gagatactgg	4380
gttaagtctt	cctgccgctc	gctccctgca	gccgcagaca	gaaagtagga	ctgaatgaga	4440
gctggctagt	ggtcagacag	gacagaaggc	tgagagggct	acagggcaga	tgtcagcaga	4500
gcagacaggt	tctccctctg	tgggggaggg	gtggcccaact	gcaggtgtaa	ttggccttct	4560
ttgtgctcca	tagaggcttc	ctgggtacac	agcagcttcc	ctgtcctgg	gattcccaaa	4620
gagaactccc	taccactgga	cttacagaag	ttctattgac	tgggtgaacg	gttcaacagc	4680
tttggctctt	ggtaggacgt	gcatactgct	gtatcagctc	aagagctcat	tcacgaatga	4740
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacaagcta	atcttgatat	gccttaacta	4800
gctcagtgac	tgggcatttc	tgaacatccc	tgaagttagc	acacatttcc	ctctgggtgt	4860
ectggettaa	caecttctaa	atctatatatt	tatctttgct	gccctgttac	cttctgagaa	4920
gcccttaggg	ccacttccct	tcgcacctac	attgctggat	ggtttctctc	ctgcagctct	4980
taaatctgat	ccctctgcct	ctgagccatg	ggaacagccc	aataactgag	ttagacataa	5040
aaacgtctct	agccaaaact	tcagctaaat	ttagacaata	aatcttactg	gttgtggaat	5100
ccttaagatt	cttcatgacc	tccttcacat	ggcacgagta	tgaagcttta	ttacaattgt	5160
ttattgatca	aactaactca	taaaaagcca	gttgtctttc	acctgctcaa	ggaaggaaca	5220
aaattcatcc	ttaactgatc	tgtgcacctt	gcacaatcca	tacgaatata	ttaagagtac	5280
taagattttg	gttgtgagag	tcacatgtta	cagaatgtac	agctttgaca	aggtgcatcc	5340
ttgggatgcc	gaagtgcact	gctgttccag	ccccctacct	tctgaggctg	ttttggaagc	5400
aatgctctgg	aagcaacttt	aggaggtagg	atgctggaac	agcgggtcac	ttcagcatcc	5460
cgatgacgaa	tcccgtcaaa	gctgtacatt	ctgtaacaga	ctgggaaagc	tgcagacttt	5520
aaggccaggg	ccctatggct	cctcttaatc	cctgtcacac	ccaacccgag	cccttctcct	5580
ccagccgttc	tgtgcttctc	actctggata	gatggagaac	acggccttgc	tagttaaagg	5640
agtgaggctt	cacccttctc	acatggcagt	ggttgggtcat	cctcattcag	ggaactctgg	5700
ggcattctgc	ctttacttcc	tctttttgga	ctacagggaa	tatatgctga	cttgttttga	5760
ccttgtgtat	ggggagactg	gatctttgg	ctggaatgtt	tcctgctagt	ttttcccat	5820
cctttggcaa	accctatcta	tatcttacca	ctaggcatag	tggccctcgt	tctggagcct	5880
gccttcaggc	tggttctcgg	ggaccatgtc	cctggtttct	ccccagcata	tgggtgtcac	5940
agtgttctact	gcgggtgggt	gctgaacaaa	gcggggattg	catcccagag	ctccggtgcc	6000
ttgtgggtac	actgctaaga	taaaatggat	actggcctct	ctctgaccac	ttgcagagct	6060
ctgggtgcctt	gtgggtacac	tgctaagata	aaatggatac	tggcctctct	ctatccactt	6120
gcaggactct	agggaacaqq	aatccattac	tggagaaaac	aggggctagg	agcagggagg	6180
tagctgggca	gctgaagtgc	ttggcgacta	accaatgaat	accagagttt	ggatctctag	6240
aatactctta	aaatctgggt	gggcagagtg	gcctgcctgt	aatcccagaa	ctcgggaggg	6300
ggagacaggg	aatcatcaga	gcaaaactgg	taaccagaat	agcaaaacac	tgagctctgg	6360
gctctgtgag	agatcctgcc	ttaacatata	agagagagaa	taaaacattg	aagaagacag	6420
tagatgccaa	ttttaagccc	ccacatgcac	atggacaagt	gtgcgtttga	acacacatat	6480

ES 2 639 020 T3

gcactcatgt	gaaccaggca	tgcacactcg	ggcttatcac	acacataatt	tgaaagagag	6540
agtgagagag	gagagtgcac	attagagttc	acaggaaagt	gtgagtgagc	acacccatgc	6600
acacagacat	gtgtgccagg	gagtaggaaa	ggagcctggg	tttgtgtata	agagggagcc	6660
atcatgtgtt	tctaaggagg	gcgtgtgaag	gaggcgttgt	gtgggctggg	actggagcat	6720
ggttgtaact	gagcatgctc	cctgtgggaa	acaggagggt	ggccaccctg	cagaggggtcc	6780
cactgtccag	cgggatcagt	aaaagccctc	gctgagaact	ttaggtaata	gccagagaga	6840
gaaaggtagg	aaagtggggg	gactcccatc	tctgatgtag	gaggatctgg	gcaagtagag	6900
gtgcgtttga	ggtagaaaaga	ggggtgcaga	ggagatgctc	ttaattctcg	gtcagcagtt	6960
tctttccaaa	taatgcctgt	gaggaggtgt	aggtgggtggc	cattcactca	ctcagcagag	7020
ggatgatgat	gcccgggtga	tgctggaaat	ggccgagcat	caaccctggc	tctggaagaa	7080
ctccatcttt	cagaaggaga	gtggatctgt	gtatggccag	cggggtcaca	ggtgcttggg	7140
gccctcgggg	gactcctagc	actgggtgat	gtttatcgag	tgctcttgtg	tgccaggcac	7200
tggcctgggg	ctttgtttct	gtctctgttt	tgtttcgttt	tttgagacag	actcttgcta	7260
tgtatccgtg	tcaatcttgg	aatctcactg	catagcccag	gctgcggaga	gaggggaggg	7320
caataggcct	tgtaaagcaag	ccacacttca	gagactagac	tccaccctgc	gaatgatgac	7380
aggtcagagc	tgagtcccg	aagatttttt	ttccagctgc	caggtggagt	gtggagtggc	7440
agctagcggc	aagggtagag	ggcgagctcc	ctgtgcagga	gaaatgcaag	caagagatgg	7500
caagccagtg	agttaagcat	tctgtgtggg	gagcaggtgg	atgaagagag	aggctgggct	7560
ttcgccctctg	gggggggggt	gaggggtggg	gatgaggtga	gaggagggca	gctccctgca	7620
gtgtgatgag	atttttcctg	acagtgacct	ttggcctctc	cctccccac	ttcccttctt	7680
tcctttcttc	ccaccattgc	tttccttgtc	cttgagaaat	tctgagtttc	cacttcactg	7740
gtgatgcaga	cggaaacaga	agccgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	7800
gtgtgtgtgt	ctgtgtgtat	gtgtgtgtgt	gtgtttgtgt	gtatgtgtgt	cagtgggaat	7860
ggctcatagt	ctgcaggaag	gtgggcagga	aggaataagc	tgtaggctga	ggcagtgtgg	7920
gatgcaggga	gagaggagag	gagggatacc	agagaaggaa	attaaggagag	ctacaagagg	7980
gcattgttgg	ggtgtgtgtg	tgtgtgtgtt	gtttatatatt	gtattggaaa	tacattcttt	8040
taaaaaatac	ttatccattt	atttattttt	atgtgcacgt	gtgtgtgcct	gcatgagttc	8100
atgtgtgcc	cgtgtgtgcg	ggaacccttg	gaggccacaa	gggggcatct	gatccctgg	8160
aactggagtt	ggaggaggtt	gtgagtcccc	tgacatgttt	gctgggaact	gaaccccggt	8220
cctatgcaag	agcaggaagt	gcagttatct	gctgagccat	ctctccagtc	ctgaaatcca	8280
ttctcttaaa	atcacagtg	cagagacatg	atgggattta	cgtatggatt	taatgtggcg	8340
gtcattaagt	tccggcacag	gcaagcacct	gtaaagccat	caccacaacc	gcaacagtga	8400
atgtgaccat	caccccatg	ttcttcattg	cccctgtccc	ctccatcctc	cattctcaag	8460
cacctcttgc	tctgcctctg	tcgctggaga	acagtgtgca	tctgcacact	cttatgtcag	8520
tgaagtcaca	cagcctgcac	cccttcctgg	tctgagtatt	tgggttctga	ctctgctatc	8580
acacactact	gtactgcatt	ctctcgctct	cttttttttaa	acatattttt	atttgtttgt	8640

ES 2 639 020 T3

gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggccg	8700
tccctggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tgggaaccaa	8760
acttgaatct aaagcaagca cttttaactg ctgaggcagc tctcagtacc cttcttcatt	8820
tctccgcctg ggttccattg tatggacaca tgtagctaga atatcttgct tatctaatta	8880
tgtacattgt tttgtgctaa gagagagtaa tgcctctatag cctgagctgg cctcaacctt	8940
gccatcctcc tgcctcagcc tcctcctcct gagtgcctagg atgacaggcg agtggtaact	9000
tacatggttt catgttttgt tcaagactga aggataacat tcatacagag aaggtctggg	9060
tcacaaagtg tgcagttcac tgaatggcac aacccgtgat caagaaacaa aactcagggg	9120
ctggagagat ggcactgact gctcttcag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca	9180
tggtggetea eageeateta taaegagate tgacgccctc ttctggtgtg tctgaagaca	9240
gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaaac acacacacac acacaattac	9300
cacccagaa agccactcc atgttccctc ccacgtctct gcctacagta ctcccaggtt	9360
accactgttc aggtcttctaa caacctgggt tacttgggcc tctttctgc tctgtggagc	9420
cacacatttg tgtgcctcat acacgttctt tctagtaagt tgcataattac tctgctttt	9480
tacatgtatt tattttattgt agttgtgtgt gcgtgtgggc ccatgcatgg cacagtgtgt	9540
ggggatgtca gagtattgtg aacaggggac agttcttttc ttcaatcatg tgggttcag	9600
aggttgaact caggtcatca tgtgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca	9660
tattcttttt ttttccctg aggtgggggc ttgttccata gcccaaactg gctttgcact	9720
tgcagttcaa agtgactccc tgtctccacc tcttagagta ttggaattac gatgtgtact	9780
accacacctg actggatcat taattctttg atgggggcgg ggaagcgac atgctgcagg	9840
tgaagggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaatgc	9900
tctcccaact gagctatttc ggtttgccag agaacaactt acagaaagt ctcagtgcc	9960
tgtggattcg gggttggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctct accactgag	10020
ccttctcact actctctacc tagatcatta attctttttt aaaaagactt attagggggc	10080
tggagagatg gctcagccgt taagagcacc gaatgccctt ccagaggtcc tgagttcaat	10140
tcccagcatg ccattgctgg gcagtagggg gcgcaggtgt tcaacgtgag tagctgttgc	10200
cagttttccg cggtagagaa cctcttgaca ccctgctgtc cctggtcatt ctgggtgggt	10260
gcattggtgat atgcttgctg tatggaagac tttgactgtt acagtgaagt tgggcttcca	10320
cagttaccac gtctccctg tttcttgag gccgggtgct tgtccattgc cgcgagggt	10380
acagccgtc cccaacgcta gttatgcct acctcatgat gcggcagaag atggacgtca	10440
agtctgctct gagtactgtg aggcagaatc gtgagatcgg ccccaacgat ggttccctgg	10500
cccaactctg ccagctcaat gacagactag ccaaggaggg caaggtgaaa ctctaggggtg	10560
cccacagcct cttttgcaga ggtctgactg ggagggccct ggcagccatg tttaggaaac	10620
acagtatacc cactccctgc accaccagac acgtgcccac atctgtccca ctctggtcct	10680
cgggggccac tccaccctta gggagcacat gaagaagctc cctaagaagt tctgctcctt	10740
agccatcctt tcctgtaatt tatgtctctc cctgaggtga ggttcaggtt tatgtccctg	10800

ES 2 639 020 T3

tctgtggcat	agatacatct	cagtgaacca	gggtgggagg	gctatcaggg	tgcattggccc	10860
gggacacggg	cactcttcat	gacccctccc	ccacctgggt	tcttcctgtg	tgggccagaa	10920
ccacgagcct	ggtaaaggaa	ctatgcaaac	acaggccctg	acctcccat	gtctgttcct	10980
ggctctcaca	gcccgacacg	ccctgctgag	gcagacgaat	gacattaagt	tctgaagcag	11040
agtggagata	gattagtgc	tagatttcca	aaaagaagga	aaaaaaaggc	tgcattttta	11100
aattatttcc	ttagaattaa	agatactaca	tagggggccct	tgggtaagca	aatccatttt	11160
tcccagaggc	tatcttgatt	ctttggaatg	tttaaagtgt	gccttgccag	agagcttacg	11220
atctatatct	gctgcttcag	agccttcctt	gaggatggct	ctgttccttt	gcttggttaga	11280
agagcgatgc	cttgggcagg	gtttccccct	tttcagaata	cagggtgtaa	agtccagcct	11340
attacaaaca	aacaaacaaa	caaacaaaca	aaggacctcc	atttgagaa	ttgcaaggat	11400
tttatcctga	attatagtgt	tggtgagtgc	aagtcacac	gccaaagtgc	tgccatcctg	11460
gttgctattc	taagaataat	taggaggagg	aacctagcca	attgcagctc	atgtccgtgg	11520
gtgtgtgcac	gggtgcata	gttggaagg	gtgcctgtcc	ccttggggac	agaaggaaaa	11580
tgaaggccc	ctctgctcac	cctggccatt	tacgggaggc	tctgctggtt	ccacgggtgc	11640
tgtgcaggat	cctgaaactg	actcgctgga	cagaaacgag	acttggcggc	accatgagaa	11700
tggagagaga	gagagcaaa	aaagaaacag	cctttaaaag	aactttctaa	gggtggtttt	11760
tgaacctcgc	tggaccttgt	atgtgtgcac	atttgccaga	gattgaacat	aatcctcttg	11820
ggacttcacg	ttctcattat	ttgtatgtct	ccggggctac	gcagagccgt	cagccaccac	11880
cccagcacc	ggcacatagg	cgtctcataa	aagcccattt	tatgagaacc	agagctgttt	11940
gagtacccc	tgtatagaga	gagttgttgt	cgtggggcac	ccggatccca	gcagcctggt	12000
tgctgcctg	taggatgtct	tacaggagtt	tgagagaaaa	ccttccttgg	agggaagaa	12060
atatcaggga	tttttgttga	atatttcaaa	ttcagcttta	agtgtgaag	tcagcagtgt	12120
tcattggttaa	ggtaaggaa	atgccttttc	cagagctgct	gcaagaggca	ggagaagcag	12180
acctgtctta	ggatgtcact	cccagggtaa	agacctctga	tcacagcagg	agcagagctg	12240
tgcagcctgg	atggctattg	tcccctattc	tgtgtgacca	cagcaaccct	ggtcacatag	12300
ggctggctcat	cctttttttt	tttttttttt	tttttttttg	gccagaatg	aagtgaccat	12360
agccaagttg	tgtacctcag	tccttagttt	ccaagcggct	ctcttgctca	atacaatgtg	12420
catttcaaaa	taacactgta	gagttgacag	aactggttca	tgtgttatga	gagaggaaaa	12480
gagaggaaag	aacaaaacaa	aacaaaacac	cacaaaccaa	aaacatctgg	gctagccagg	12540
catgattgca	atgtctacag	gcccagttca	tgagaggcag	agacaggaag	accgccgaaa	12600
ggtaaggat	agcatggtct	acgtatcgag	actccagcca	gggctacggt	cccaagatcc	12660
taggttttgg	attttgggct	ttggtttttg	agacagggtt	tctctgtgta	gccctggctg	12720
tcctggaact	cgctctgtag	accaggctgg	cctcaaaact	agagatctgc	ctgactctgc	12780
ctttgagggc	tgggacgaat	gccaccactg	cccaactaag	attccattaa	aaaaaaaaaa	12840
agttcaagat	aattaagagt	tgccagctcg	ttaaagctaa	gtagaagcag	tctcaggcct	12900
gctgcttgag	gctgttcttg	gcttggacct	gaaatctgcc	cccaacagtg	tccaagtgca	12960

ES 2 639 020 T3

catgactttg	agccatctcc	agagaaggaa	gtgaaaattg	tggctcccca	gtcgattggg	13020
acacagtctc	tctttgtcta	ggtaacacat	ggtgacacat	agcattgaac	tctccactct	13080
gaggggtggg	ttccctcccc	ctgcctcttc	tgggttgggc	accccatagg	acagccacag	13140
gacagtcact	agcacctact	ggaaacctct	ttgtgggaac	atgaagaaag	agccttttgg	13200
agattcctgg	ctttccatta	gggctgaaag	tacaacgggt	cttgggtggc	tttgctcgt	13260
gtttataaaa	ctagctacta	ttcttcaggt	aaaataccga	tgttgtggaa	aagccaaccc	13320
cgtggctgcc	cgtgagtagg	gggtgggggt	gggaatcctg	gatagtgttc	tatccatgga	13380
aagtgggtga	ataggaatta	aggggtgttc	ccccccccc	aacctcttcc	tcagaccag	13440
ccactttcta	tgacttataa	acatccaggt	aaaaattaca	aacataaaaa	tggtttctct	13500
tctcaatctt	ctaaagtctg	cctgcctttt	ccaggggtag	gtctgtttct	ttgctgttct	13560
attgtcttga	gagcacagac	taacacttac	caaagtggg	aactcctggc	ccatactaag	13620
gctcttctgg	gctccagcac	tcttaagtta	ttttaagaat	tctcacttgg	ccttttagcac	13680
acccgccacc	cccaagtggg	tgtggataat	gccatggcca	gcagggggca	ctgttgaggc	13740
gggtgccttt	ccaccttaag	ttgcttatag	tatttaagat	gctaaatgtt	ttaatcaaga	13800
gaagcactga	tcttataata	cgaggataag	agattttctc	acaggaaatt	gtctttttca	13860
taattctttt	acaggctttg	tctgatcgt	agcatagaga	gaatagctgg	atatttaact	13920
tgtattccat	tttctctg	cagcgttagg	ttaactccgt	aaaaagtgat	tcagtggacc	13980
gaagaggctc	agagggcagg	ggatggtggg	gtgaggcaga	gcactgtcac	ctgccaggca	14040
tgggaggtcc	tgccatccgg	gagggaaaagg	aaagtttagc	ctctagtcta	ccaccagtgt	14100
taacgcactc	taaagtgtga	accaaataa	atgtcttaca	ttacaaagac	gtctgttttg	14160
tgtttccttt	tgtgtgtttg	ggctttttat	gtgtgcttta	taactgctgt	gggtgtgtgt	14220
ttgttagttt	tgaggtagga	tctcaggctg	gccttgaact	tctgatcgcc	tgccccctgcc	14280
cctgccccctg	cccctgtccc	tgccctcaag	tgctaggact	aaaagcacat	gccaccacac	14340
cagtacagca	tttttctaac	atttaaaaat	aatcacctag	gggctggaga	gaggggtcca	14400
gctaagagtg	cacactgctc	ttgggttagga	cctgagttta	gttcccagaa	cctatactgg	14460
gtggctccag	gtccagagga	tccaggacct	ctggcctcca	tgggcatctg	ctcttagcac	14520
ataccacat	acagatacac	acataaaaaat	aaaatgaagc	ctttaaaaac	ctcctaaaaac	14580
ctagcccttg	gaggtacgac	tctggaaaagc	tggcatactg	tgtaaagtc	tctcatgggtg	14640
ttctggctaa	cgtaagactt	acagagacag	aaaagaactc	aggggtgtgt	gggggttggg	14700
atggaggaag	agggatgagt	agggggagca	cggggaactt	gggcagtga	aattctttgc	14760
aggacactaq	aqqaggataa	ataccagtrc	ttgcacccac	tactggacaa	ctccagggaa	14820
ttatgctggg	tgaaaagaga	aggccccagg	tattggctgc	attggctgca	tttgcgtaac	14880
atttttttta	attgaaaaga	aaaagatgta	aatcaagggt	agatgagtgg	ttgctgtgag	14940
ctgagagctg	gggtgagtga	gacatgtgga	caactccatc	aaaaagcgac	agaaagaacg	15000
ggctgtgggtg	acagctacct	ctaactctcca	cctccgggag	gtgatcaagg	ttagccctca	15060
gctagcctgt	ggtgcatgag	accctgtttc	aaaaacttta	ataaagaaat	aatgaaaaaa	15120

ES 2 639 020 T3

gacatcaggg	cagatccttg	gggccaaagg	cggacaggcg	agtctcgtgg	taaggtcgtg	15180
tagaagcggg	tgcattgagca	cgtgccgcag	gcatcatgag	agagccctag	gtaagtaagg	15240
atggatgtga	gtgtgtcggc	gtcggcgcac	tgcacgtcct	ggctgtgggtg	ctggactggc	15300
atctttgggtg	agctgtggag	gggaaatggg	tagggagatc	ataaaatccc	tccgaattat	15360
ttcaagaact	gtctattaca	attatctcaa	aatattaaaa	aaaaagaaga	attaaaaaac	15420
aaaaaaccta	tccaggtgtg	gtgggtgtgca	cctatagcca	cgggcacttg	gaaagctgga	15480
gcaagaggat	ggcgagtttg	aagggtatctg	gggctgtaca	gcaagaccgt	cgtccccaaa	15540
ccaaacccaaa	cagcaaaccc	attatgtcac	acaagagtgt	ttatagttag	cggcctcgtc	15600
gagagcatgg	gggtgggggtg	gggggtggggg	acagaaatat	ctaaactgca	gtcaataggg	15660
atccactgag	accctggggc	ttgactgcag	cttaaccttg	ggaaatgata	agggttttgt	15720
gttgagtaaa	agcatcgatt	actgacttaa	cctcaaataga	agaaaaagaa	aaaaagaaaa	15780
caacaaaagc	caaaccaagg	ggctgggtgag	atgggtcagt	gggtaagagc	acccgactgc	15840
tcttccgaag	gtccagagtt	caaatcccag	caaccacatg	gtgggtcaca	accatctgta	15900
acgagatatg	atgccctctt	ctgggtgtgtc	tgaagacagc	tacagtgtac	ttacatataa	15960
taaataaatc	ttaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaagccaaa	ccgagcaaac	caggccccca	16020
aacagaaggc	aggcacgacg	gcaggcacca	cagagccatcc	tgtgaaaagg	cagggctacc	16080
catggggccga	ggaggggtcca	gagagatagg	ctggtaagct	cagtttctct	gtataccctt	16140
tttcttgttg	acactacttc	aattacagat	aaaataacaa	ataaacaaaa	tctagagcct	16200
ggccactctc	tgtctgcttg	atctttctctg	ttacgtccag	caggtggcgg	aagtgttcca	16260
aggacagatc	gcatcattaa	gggtggccagc	ataatctccc	atcagcaggt	gggtgctgtga	16320
gaaccattat	gggtgtcaca	gaatcccggg	cccaggagct	gccctctccc	aagtctggag	16380
caataggaaa	gcttttctggc	ccagacaggg	ttaacagtcc	acattccaga	gcaggggaaa	16440
aggagactgg	aggtcacaga	caaaaggggc	agcttctaac	aacttcacag	ctctggtagg	16500
agagatagat	cacccccaac	aatggccaca	gctgggttttg	tctgccccga	aggaaactga	16560
cttaggaagc	aggtatcaga	gtcccccttc	tgaggggact	tctgtctgcc	ttgtaaagct	16620
gtcagagcag	ctgcattgat	gtgtgggtga	cagaagatga	aaaggaggac	ccaggcagat	16680
cgccacagat	ggaccggcca	cttacaagtc	gaggcagggtg	gcagagcctt	gcagaagctc	16740
tgcaggtgga	cgacactgat	tcattaccca	gttagcatatc	cacagcgggc	taggcggacc	16800
acagcctcct	tcccagtcct	cctccagggc	tggggagtcc	tccaaccttc	tgtctcagtg	16860
cagcttccgc	cagccccctc	tccttttgca	cctcagggtgt	gaacctccc	tcctctcctt	16920
ctccctgtgg	catggccctc	ctgctactgc	aggctgagca	ttggatttct	ttgtgcttag	16980
atagacctga	gatggctttc	tgatttatat	atatatatcc	atcccttggg	tcttacatct	17040
aggacctcaga	gctgtttgtg	ataccataag	aggctgggga	gatgatattg	taagagtgtc	17100
tgtgtgacaa	gcatgaagac	atgagttcga	atccccagca	accatgtgga	aaaataacct	17160
tctaacctca	gagttgaggg	gaaaggcagg	tggattctgg	gggcttactg	gccagctagc	17220
cagcctaacc	taaatgtctc	agtcagagat	cctgtctcag	ggaataactt	gggagaatga	17280

ES 2 639 020 T3

ctgagaaaga	cacctcctca	ggtctcccat	gcacccacac	agacacacgg	ggggggggta	17340
atgtaataag	ctaagaaata	atgagggaaa	tgattttttg	ctaagaaatg	aaattctgtg	17400
ttggccgcaa	gaagcctggc	caggggaagga	actgcctttg	gcacaccagc	ctataagtca	17460
ccatgagttc	cctggctaag	aatcacatgt	aatggagccc	aggccccctc	tgcttggtgg	17520
ttgcctctcc	cactggtttt	gaagagaaat	tcaagagaga	tctccttggg	cagaattgta	17580
ggtgctgagc	aatgtggagc	tgggttcaat	gggatttcct	taaaggcatc	cttcccaggg	17640
ctgggtcata	cttcaatagt	aggggtgctt	cacagcaagc	gtgagaccct	aggtttaggt	17700
ccccagaatc	tgcccccaac	cccccaaaaa	ggcatccttc	tgctcttggg	tgggtggggg	17760
gagcaaacac	ctttaactaa	gaccattagc	tggcaggggt	aacaaatgac	cttggctaga	17820
ggaatttggg	caagctggat	tccgccttct	gtagaagccc	cacttggttc	ctttgttaag	17880
ctggcccaca	gtttgttttg	agaatgcctg	agggggccag	ggagccagac	aattaaaagc	17940
caagctcatt	ttgatattct	aaaaccacag	cctgactgcc	ctgcccgtgg	gaggtactgg	18000
gagagctggc	tgtgtccctg	cctcaccaac	gccccccccc	ccaacacaca	ctcctcgggt	18060
cacctgggag	gtgccagcag	caatttggaa	gtttactgag	cttgagaagt	cttgggaggg	18120
ctgacgctaa	gcacacccct	tctccacccc	ccccacccc	acccccgtga	ggaggagggg	18180
gaggaaacat	gggaccagcc	ctgctccagc	ccgtccttat	tggctggcat	gaggcagagg	18240
gggctttaa	aaggcaaccg	tatctaggct	ggacactgga	gcctgtgcta	ccgagtgcc	18300
tcctccacct	ggcagcatgc	agccctcact	agccccgtgc	ctcatctgcc	tacttgtgca	18360
cgctgccttc	tgtgctgtgg	agggccaggg	gtggcaagcc	ttcaggaatg	atgccacaga	18420
ggtcatccca	gggcttgag	agtaccccg	gcctcctcct	gagaacaacc	agaccatgaa	18480
ccgggcgagg	aatggaggca	gacctcccca	ccatccctat	gacgccaag	gtacgggatg	18540
aagaagcaca	ttagtggggg	ggggggctct	gggaggtgac	tgggggtggt	ttagcatctt	18600
cttcagaggt	ttgtgtgggt	ggctagcctc	tgctacatca	gggcagggac	acatttgctt	18660
ggaagaatac	tagcacagca	ttagaacctg	gagggcagca	ttggggggct	ggtagagagc	18720
acccaaggca	gggtggaggc	tgaggtcagc	cgaagctggc	attaacacgg	gcatgggctt	18780
gtatgatggt	ccagagaatc	tcctcctaag	gatgaggaca	caggtcagat	ctagctgctg	18840
accagtgggg	aagtgatatg	gtgaggctgg	atgccagatg	ccatccatgg	ctgtactata	18900
tcccacatga	ccaccacatg	aggtaaagaa	ggccccagct	tgaagatgga	gaaaccgaga	18960
ggctcctgag	ataaagtcac	ctgggagtaa	gaagagctga	gactggaagc	tggtttgatc	19020
cagatgcaag	gcaaccctag	attgggtttg	ggtgggaacc	tgaagccagg	aggaatccct	19080
ttagttcccc	cttggccagg	gtctgctcaa	tgagcccgag	gggtttagcat	taaaagaaca	19140
gggtttgtag	gtggcatgtg	acatgagggg	cagctgagtg	aaatgtcccc	tgtatgagca	19200
caggtggcac	cacttgccct	gagcttgcac	cctgacccca	gctttgcctc	attcctgagg	19260
acagcagaaa	ctgtggaggc	agagccagca	cagagagatg	cctgggggtgg	gggtgggggt	19320
atcacgcacg	gaactagcag	caatgaatgg	ggtgggggtg	cagctggagg	gacactccag	19380
agaaatgacc	ttgtggttca	ccatttgtgt	gggaggagag	ctcattttcc	agcttgccac	19440

ES 2 639 020 T3

cacatgctgt ccctcctgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccaccccaa	19500
aggagcatgc aatgcagtca cgtttttgca gaggaagtgc ttgacctaaag ggcactatcc	19560
ttggaaaaggcc ccaaaaactag tccttccctg ggcaaacagg cctccccccac ataccacctc	19620
tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaaggggtggc aaggcctaca cctccccctc	19680
gttgtgcccc cccccccccc gtgaagggtgc atcctggcct ctgcccctct ggcttttgta	19740
ctgggatttt ttttttccct ttatgtcata ttgatcctga caccatggaa cttttggagg	19800
tagacaggac ccacacatgg attagttaaa agcctcccat ccatctaagc tcatggtagg	19860
agatagagca tgtccaagag aggagggcag gcatcagacc tagaagatat ggctgggcat	19920
ccaacccaat ctcttccccc ggagaacaga ctctaagtca gatccagcca cccttgagta	19980
accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggtataca gcagggtgcta aacaaatgct	20040
tgtggttagca aaagctatag gttttgggtc agaactccga cccaagtcgc gagtgaagag	20100
cgaaaggccc tctactcgcc accgccccgc cccacactgg ggtcctataa cagatcactt	20160
tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atcctaggta gcccccccg ccccccccc	20220
gcaagcagcc cagccctgcc tttggggcaa gttcttttct cagcctggac ctgtgataat	20280
gaggggggtg gacgcgccgc ctttgggtgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc	20340
acctgccctt ctaccccgct cctccacagc agctgtcctg atttattacc ttcaattaac	20400
ctccactcct ttctccatct cctgggatac cgccctgtgc ccagtggctg gtaaaggagc	20460
ttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggtctaccag gcagggtctg ggatgaggag	20520
ctaaactgga agagtgtttg gttagtaggc acaaagcctt ggggtgggatc cctagtaccg	20580
gagaagtgga gatgggcgct gagaagtcca agaccatcca tccttaacta cacagccagt	20640
ttgaggccag cctgggctac ataaaaacc aatctcaaaa gctgccatt ctgattctgt	20700
gccacgtagt gcccgatgta atagtggatg aagtcgttga atcctggggc aacctatttt	20760
acagatgtgg ggaaaagcaa ctttaagtac cctgcccaca gatcacaaag aaagtaagtg	20820
acagagctcc agtgtttcat cctgggttc caaggacagg gagagagaag ccagggtggg	20880
atctcaactgc tccccggtgc ctcttcccta taatccatac agattcgaaa gcgcagggca	20940
ggtttggaag aagagagaag ggtggaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc	21000
tcacgcatcc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc	21060
cgcttccctga cagacggccc atgccgcagc gccaaagccg tcaccgagtt ggtgtgctcc	21120
ggccagtgcg gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgctgaa gtggtggcgc	21180
ccgaacggac cggatttccg ctgcatcccc gategctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg	21240
ctgtgccccg ggggcgcggc gccgcgctcg cgaaaggtgc gtctgggtggc ctctgcaag	21300
tgaagcgcc tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gccggagacc	21360
gcgcggccgc agaagggtcg caagccgcgg cccggcgccc ggggagccaa agccaaccag	21420
gcggagctgg agaacgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcagcccc gcgcgatccg	21480
attcgtttct agtgtaaagc ctgcagccca ggccaggggt gccaaacttt ccagaccgtg	21540
tggagttccc agcccagtag agaccgcagg tccttctgcc cgctgcgggg gatggggagg	21600

ES 2 639 020 T3

gggtgggggtt	cccgcggggcc	aggagaggaa	gcttgagtcc	cagactctgc	ctagccccgg	21660
gtgggatggg	ggtctttcta	ccctcgccgg	acctatacag	gacaaggcag	tgtttccacc	21720
ttaaaggga	gggagtgtgg	aacgaaagac	ctgggactgg	ttatggacgt	acagtaagat	21780
ctactccttc	cacccaaatg	taaagcctgc	gtgggctaga	tagggtttct	gaccctgacc	21840
tggccactga	gtgtgatgtt	gggctacgtg	gttctctttt	ggtagcgtct	tctttgtaaa	21900
atagggaccg	gaactctgct	gagattccaa	ggattggggg	accccgtgt	gactggtgag	21960
agagaggaga	acaggggagg	ggttagggga	gagattgtgg	tgggcaaccg	cctagaagaa	22020
gctgtttgtt	ggctcccagc	ctcgccgcct	cagaggtttg	gcttccccca	ctccttcctc	22080
tcaaactctgc	cttcaaattc	atatctggga	tagggaaggc	cagggtccga	gagatggtgg	22140
aagggccaga	aatcacactc	ctggcccccc	gaagagcagt	gtcccgcgcc	caactgcctt	22200
gtcatattgt	aaagggattt	tctacacaac	agtttaaggt	cgttggagga	aactgggctt	22260
gccagtcacc	tcccatcctt	gtcccttgcc	aggacaccac	ctcctgcctg	ccaccacagg	22320
acacatttct	gtctagaaac	agagcgtcgt	cgtgctgtcc	tctgagacag	catatcttac	22380
attaaaaaga	ataatacggg	gggggggggc	ggagggcgca	agtgttatat	atatgctgag	22440
aagctgtcag	gcgccacagc	accaccacac	atctttttgt	aaatcatttc	cagacacctc	22500
ttactttctg	tgtagatttt	aattgttaaa	aggggaggag	agagagcgtt	tgtaacagaa	22560
gcacatggag	gggggggtag	gggggttggg	gctggtgagt	ttggcgaaact	ttccatgtga	22620
gactcatcca	caaagactga	aagccgcgtt	ttttttttta	agagttcagt	gacatattta	22680
ttttctcatt	taagttattt	atgccaacat	ttttttcttg	tagagaaagg	cagtgttaat	22740
atcgctttgt	gaagcacaa	tgtgtgtggg	tttttgtttt	ttgttttttc	cccgaccaga	22800
ggcattgtta	ataaagacaa	tgaatctcga	gcaggaggct	gtggtcttgt	tttgtcaacc	22860
acacacaatg	tctcgccact	gtcatctcac	tcccttcctt	tggtcacaag	acccaaacct	22920
tgacaacacc	tccgactgct	ctctggtagc	ccttgtggca	atacgtgttt	cctttgaaaa	22980
gtcacattca	tcccttcctt	tgcacacctg	gtctctcatc	cccagctggg	tcatcgcat	23040
accctcacc	cagcctccct	ttagctgacc	actctccaca	ctgtcttcca	aaagtgcacg	23100
tttcaccgag	ccagttccct	gggtccaggtc	atcccattgc	tccctcctgc	tccagaccct	23160
tctcccacaa	agatgttcat	ctcccactcc	atcaagcccc	agtggccctg	cggctatccc	23220
tgtctcttca	gttagctgaa	tctacttgct	gacaccacat	gaattccttc	ccctgtctta	23280
aggttcatgg	aactcttgcc	tgccccgtga	ccttcacagg	ctgtcccagc	gtctgatgtg	23340
tccctctctc	tgtaaagccc	cacccacta	tttgattccc	aattctagat	cttcccttgt	23400
tcatctcttc	acgggatagt	gtctcatctg	gccaagtccc	gcttgatall	yygataaatg	23460
caaagccaag	tacaattgag	gaccagttca	tcatggggcc	aagctttttc	aaaatgtgaa	23520
ttttacacct	atagaagtgt	aaaagccttc	caaagcagag	gcaatgcctg	gtctctcctt	23580
caacatcagg	gtcctgtgct	tatgggtctg	gtggggtagt	acattcataa	acccaacact	23640
aggggtgtga	aagcaagatg	attgggagtt	cgaggccaat	cttggctatg	aggccctgtc	23700
tcaacctctc	ctccctccct	ccagggtttt	gttttgtttt	gtttttttga	tttgaaactg	23760

ES 2 639 020 T3

caacacttta	aatccagtca	agtgcattctt	tgcgtgaggg	gaactctatc	cctaataataa	23820
gcttccatct	tgatttgtgt	atgtgcacac	tgggggttga	acctgggcct	ttgtacctgc	23880
cgggcaagct	ctctactgct	ctaaaccag	ccctcactgg	ctttctgttt	caactcccaa	23940
tgaattcccc	taaatgaatt	atcaatatca	tgtctttgaa	aaataccatt	gagtgtgtct	24000
ggtgtccctg	tggttccaga	ttccaggaag	gacttttcag	ggaatccagg	catcctgaag	24060
aatgtcttag	agcaggaggc	catggagacc	ttggccagcc	ccacaaggca	gtgtggtgca	24120
gagggtgagg	atggaggcag	gcttgcaatt	gaagctgaga	cagggctactc	aggattaaaa	24180
agcttcccc	aaaacaattc	caagatcagt	tcctgggtact	tgcacctgtt	cagctatgca	24240
gagcccagtg	ggcatagggtg	aagacaccgg	ttgtactgtc	atgtactaac	tgtgtcttcag	24300
agccggcaga	gacaaataat	gttatgggtga	ccccagggga	cagtgtattcc	agaaggaaca	24360
cagaagagag	tgctgctaga	ggctgcctga	aggagaaggg	gtcccagact	ctctaagcaa	24420
agactccact	cacataaaga	cacaggctga	gcagagctgg	ccgtggatgc	agggagccca	24480
tccaccatcc	tttagcatgc	ccttgtattc	ccatcacatg	ccagggatga	ggggcatcag	24540
agagtccaag	tgatgcccc	acccaaacac	acctaggact	tgctttctgg	gacagacaga	24600
tgcaggagag	actaggttgg	gctgtgatcc	cattaccaca	aagagggaaa	aaacaaaaaa	24660
caaacaaaca	aacaaaaaaa	aacaaaacaa	aacaaaaaaa	aacccaaggt	ccaaattgta	24720
ggtcaggtta	gagtttattt	atggaaagtt	atattctacc	tccatgggggt	ctacaaggct	24780
ggcggccatc	agaaagaaca	aacaacaggc	tgatctggga	ggggtggtac	tctatggcag	24840
ggagcacgtg	tgcttgggggt	acagccagac	acggggcttg	tattaatcac	agggcttgta	24900
ttaataggct	gagagtcaag	cagacagaga	gacagaagga	aacacacaca	cacacacaca	24960
cacacacaca	cacacacaca	catgcacaca	ccactcactt	ctcactcgaa	gagcccctac	25020
ttacattcta	agaacaaacc	attcctcctc	ataaaggaga	caaagttgca	gaaacccaaa	25080
agagccacag	ggtccccact	ctctttgaaa	tgacttggac	ttgttgcagg	gaagacagag	25140
gggtctgcag	aggcttcctg	ggtgaccag	agccacagac	actgaaatct	ggtgtctgaga	25200
cctgtataaa	ccctcttcca	caggttccct	gaaaggagcc	cacattcccc	aacctgtct	25260
cctgaccact	gaggatgaga	gcacttgggc	cttccccatt	cttggagtgc	acctgtgttt	25320
ccccatctga	gggcacatga	ggtctcaggt	cttgggaaag	ttccacaagt	attgaaagtg	25380
ttcttgtttt	gtttgtgatt	taatttaggt	gtatgagtgc	ttttgcttga	atatatgcct	25440
gtgtagcatt	tacaagcctg	gtgcctgagg	agatcagaag	atggcatcag	ataccctgga	25500
actggacttg	cagacagtta	tgagccactg	tgtgggtgct	aggaaacagaa	cctggatcct	25560
ccggaagagc	agacagccag	cgctcttagc	cactaagcca	tactgaggt	tctttctgtg	25620
gctaaagaga	caggagacaa	aggagagttt	cttttagtca	ataggaccat	gaatgttcct	25680
cgtaacgtga	gactagggga	gggtgatccc	ccagtgcac	cgatggccct	gtgtagtatt	25740
tagcagctct	agtcttattc	cttaataagt	cccagtttgg	ggcaggagat	atgtattccc	25800
tgctttgaag	tggctgaggt	ccagttatct	acttccaagt	acttgtttct	ctttctggag	25860
ttggggaagc	tcctgcctg	cctgtaaatg	tgtccattct	tcaaccttag	acaagatcac	25920

ES 2 639 020 T3

tttccttgag	cagtcaggcc	agtccaaagc	ccttcaattt	agctttcata	aggaacaccc	25980
cttttgttgg	gtggaggtag	cacttgccct	gaatcccagc	attaagaagg	cagagacagt	26040
cggatctctg	tgagttcaca	gccagccctg	tctacggagt	gagttccaag	acagccaggc	26100
ctacacagag	aaaccctgtc	tcgaaaaaaa	caaaaacaaa	agaaataaag	aaaaagaaaa	26160
caaaaacgaa	caaacagaaa	aacaagccag	agtgtttgtc	cccgtatttt	attaatcata	26220
tttttgtccc	tttgccattt	tagactaaaa	gactcgggaa	agcaggcttc	tctctgtttc	26280
tcacccggac	acaccagaaa	ccagatgtat	ggaagatggc	taatgtgctg	cagttgcaca	26340
tctggggctg	ggtggattgg	ttagatggca	tgggctgggt	gtggttacga	tgactgcagg	26400
agcaaggagt	atgtggtgca	tagcaaacga	ggaagtttgc	acagaacaac	actgtgtgta	26460
ctgatgtgea	ggtatgggca	catgcaagca	gaagccaagg	gacagcctta	gggtagtgtt	26520
tccacagacc	cctccccctt	tttaacatgg	gcatctctca	ttggcctgga	gcttgccaac	26580
tgggctgggc	tggctagctt	gtaggtccca	gggatctgca	tatctctgcc	tccctagtgc	26640
tgggattaca	gtcatatatg	agcacacctg	gcttttttat	gtgggttctg	ggctttgaac	26700
ccagatctga	gtgcttgcaa	ggcaatcggg	tgaatgactg	cttcatctcc	ccagaccctg	26760
ggattctact	ttctattaaa	gtatttctat	taaatcaatg	agccccctgc	cctgcactca	26820
gcagttctta	ggcctgctga	gagtcaagtg	gggagtgaga	gcaagcctcg	agaccccatc	26880
agcgaagcag	aggacaaaga	aatgaaaact	tgggattcga	ggctcgggat	atggagatac	26940
agaaagggtc	agggaaggaa	atgaaccaga	tgaatagagg	caggaagggt	agggccctgc	27000
atacatggaa	cctggtgtac	atgttatctg	catggggttt	gcattgcaat	ggctcttcag	27060
caggttcacc	acactgggaa	acagaagcca	aaaagaagag	taggtggtgt	tggagtccga	27120
tactgtcagt	catgcctgaa	gaaatggaag	caattaacga	tgcgccgcaa	ttaggatatt	27180
agctccctga	agaaaggcaa	gaagctgggc	tgtgggcact	gaaggagact	ttgaatgatg	27240
tcacattctc	tgtatgccta	gcagggcagt	attggagact	gagacttgac	ttgtgtgtcc	27300
atatgattcc	tccttttctt	acagtcatct	ggggctcctg	agcttcgtcc	ttgtccaaga	27360
acctggagct	ggcagtgggc	agctgcagtg	atagatgtct	gcaagaaaaga	tctgaaaaga	27420
gggaggaaga	tgaaggaccc	agaggaccac	cgacctctgc	tgccctgacaa	agctgcagga	27480
ccagtctctc	ctacagatgg	gagacagagg	cgagagatga	atggtcaggg	gaggagtccg	27540
agaaaggaga	gggtgaggca	gagaccaaag	gagggaaaca	cttgtgctct	acagctactg	27600
actgagtacc	agctgcgtgg	cagacagcca	atgccaaagg	tcggctgacg	atggcacctc	27660
gtgggactcc	tagcccagtg	ctggcagagg	ggagtgtctg	atgggtgcatg	gtttggatat	27720
gatctgaatg	tqqtccaqcc	ctagtttctt	tccagttgct	gggataaagc	acctgacca	27780
aagctacttt	tttgtttgtt	tgttttgggt	tggttttgtt	tggtttttctg	aggcagggtt	27840
tctctgtatc	acctagctg	tcctggaact	cactctgtag	accaggctgg	cctcgaaactc	27900
agaaatcccc	ctgcctctgc	ctcctaagtg	ctggaattaa	aggcctgcgc	caaccactgcc	27960
ggcccaaagc	tactttaaga	gagagagagg	aatgtataag	tattataatt	ccaggttata	28020
gttcattgct	gtagaattgg	agtcttcata	ttccaggtaa	tctccacag	acatgccaca	28080

ES 2 639 020 T3

aaacaacctg ttctacgaaa tctctcatgg actcccttcc ccagtaattc taaactgtgt	28140
caaactctaca agaaatagtg acagtcacag tctctaacgt tttgggcatg agtctgaagt	28200
ctcattgcta agtactggga agatgaaaac tttacctagt gtcagcatth ggagcagagc	28260
ctttgggatt tgagatgggc ttttgagag ctcctaattg ctacatggag agagggggcc	28320
tgggagagac ccatacacct tttgctgcct tatgtcacct gacctgctcc ttgggaagct	28380
ctagcaagaa ggccttccct ggatcaccca ccaccttgca cctccagaac tcagagccaa	28440
attaaacttt cttgttactg tctgcaaagc acagtcgggc tgggttgat cactgtcaat	28500
gggaaacaga cttgcctgga tggataactt gtacattgca taatgtctag aaatgaaaag	28560
tcctatagag aaaaagaaaa ttagctggca cacagataga ggccctggag gaggttggt	28620
ttgtcctccc cgaggaggtg gcgagtaagg tgtaaattgt catggatgta aatgggccc	28680
tatatgaggg tctggggtaa caagaaggcc tgtgaatata aagcactgaa ggtatgtcta	28740
gtctggagaa ggtcactaca gagagtctc caactcagtg ccatacaca cacacacaca	28800
cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacaaagaa aaaaaggaag aaaaatctga	28860
gagcaagtac agtacttaaa attgtgtgat tgtgtgtgtg actctgatgt cacatgctca	28920
tcttgcccta tgagttgaaa accaaatggc ccttgagagg cataacaacc acactgttgg	28980
ctgtgtgtc acgtttttct taaagcgtct gtctggtttg ctgctagcat caggcagact	29040
tgcagcagac tacatatgct cagccctgaa gtccttctag ggtgcatgtc tcttcagaat	29100
ttcagaaagt catctgtggc tccaggaccg cctgcactct cctctgccg cgaggctgca	29160
gactctaggc tgggggtgaa gcaacgctta cctctgggac aagtataaca tgttggttt	29220
tctttccctc tgtggctcca acctggacat aaaatagatg caagctgtgt aataaatatt	29280
tcctcccgtc cacttagttc tcaacaataa ctactctgag agcacttatt aataggtggc	29340
ttagacataa gctttggctc attccccac tagctcttac ttctttaact ctttcaaac	29400
attctgtgtc ttccacatgg ttagttacct ctcttccat cctggttcgc tcttccctc	29460
gagtcgccct cagtgtctct aggtgatgct tgtaagatat tctttctaca aagctgagag	29520
tgggtggcact ctgggagttc aaagccagcc tgatctacac agcaagctcc aggatatcca	29580
gggcaatgtt gggaaaacct ttctcaaaca aaaagagggg ttcagttgtc aggaggagac	29640
ccatgggtta agaagtctag acgagccatg gtgatgcata cctttcatcc aagcacttag	29700
gaggcaaaga aaggtgaaac tctttgactt tgaggccagc taggttacat agtgataccc	29760
tgcttagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgttaatt taaaagtcta	29820
aaaatgcatt cttttaaaaa tatgtataag tatttgcctg cacatatgta tgatgtatg	29880
tataccatgt gtgtgtctgg tgctgaagga ctaggcatag actccctaga actagagtca	29940
tagacagttg tgacactccc caacccccca ccatgtgggt gcttgaagct aaactcctgt	30000
cctttgtaaa gcagcaggtg tctatgaacc ctgaaccatc tctccagtct ccagatgtgc	30060
attctcaaag aggagtcctt catatttccc taaactgaac atccttatca gtgagcatcc	30120
tcgagtcacc aaagctactg caaacctct tagggaacat tcaactattca cttctacttg	30180
gctcatgaaa cttaagtaca cacacacaaa cacacacaca cacacagagt catgcactca	30240

ES 2 639 020 T3

caaaagcatg	catgtacacc	attcttatta	gactatgctt	tgctaaaaga	ctttcctaga	30300
tacttttaaaa	catcacttct	gccttttgg	gggcaggttc	caagattgg	actggcgtag	30360
tggaaactga	acaaggtaga	gatctagaaa	tcacagcagg	tcagaagggc	cagcctgtac	30420
aagagagagt	tccacacctt	ccaggaacac	tgagcagggg	gctgggacct	tgctctctag	30480
cccaagaaac	tagtgcggtt	cctgtatgca	tgctctctag	agattccata	agatctgcct	30540
tctgccataa	gatctcctgc	atccagacaa	gcctagggga	agttgagagg	ctgcctgagt	30600
ctctcccaca	ggccccctt	tgctggcag	tattttttta	tctggaggag	aggaatcagg	30660
gtgggaatga	tcaaatataa	ttatcaagga	aaaagtaaaa	aacatatata	tatatatatt	30720
aactgatcta	gggagctggc	tcagcagtta	agagttcttg	ctgcccttgc	ttcagatctt	30780
gctttgattc	ccagcaccca	catgatggct	ttcaactgta	tctctgcttc	caggggatcc	30840
aacagcctct	tctgacctcc	atagacaaga	cctagtcctc	tgcaagagca	ccaaatgctc	30900
ttatctgttg	atccatctct	ctagcctcat	gccagatcat	ttaaaactac	tggacactgt	30960
cccattttac	gaagatgtca	ctgccagtc	atctgccatg	agtggatatt	tcgattcttt	31020
ctatgttctc	acccttgcaa	tttataagaa	agatatctgc	atctgtctcc	tgagagaaca	31080
aagggtggag	ggctactgag	atggctctag	gggtaaaggt	gcttgccaca	aaatctgaca	31140
acttaagttt	ggtcttgtaa	tccacatggt	ggagagagag	aagagattcc	cgtaagttgt	31200
cctcaaaact	cccacacatg	tgctgtggct	tatgtgtaac	cccaataagt	aaagatagtt	31260
ttaaacacta	cataaggtag	ggtttcttca	tgaccccaag	gaatgatgcc	cctgatagag	31320
cttatgctga	aaccccatct	ccattgtgcc	atctggaaag	agacaattgc	atcccggaaa	31380
cagaatcttc	atgaatggat	taatgagcta	ttaagaaagt	ggcttggtta	ttgcacatgc	31440
tggcggcgta	atgacctcca	ccatgatgtt	atccagcatg	aaggtcctca	ccagaagtca	31500
tacaaatctt	cttaggcttc	cagagtcgtg	agcaaaaaaa	gcacacctct	aaataaatta	31560
actagcctca	ggtagttaac	caccgaaaat	gaaccaaggc	agttctaata	caaaaccact	31620
tcccttccct	gttcaaacca	cagtgcctta	ttatctaaaa	gataaaactc	aagccaagct	31680
tttaggttgc	cagtatttat	gtaacaacaa	ggcccgttga	cacacatctg	taactcctag	31740
tactgggcct	caggggcaga	gacaggtgga	gcctggaggt	ttgaattcca	ggttctgtga	31800
gaaactctgt	ctgaaaagac	aatatggtga	gtgacccggg	aggatatctg	atattgactt	31860
ctggccaaca	cacagccatc	tctgcacatc	tgtagttgca	agccttttgc	actaagtttg	31920
gccagagtca	gagtttgcaa	gtgtttgtgg	actgaatgca	cgtgttgctg	gtgatctaca	31980
aagtcacctt	ccttctcaag	ctagcagcac	tggtctcggc	cagctgctca	ttcaagcctc	32040
tttgacaggt	catcacgggg	atgggggagc	aggggccctc	cctagaaccac	caagcctgtg	32100
gttggtttatt	caggacatta	ttgaggccca	agatgacaga	taactctatc	acttggccaa	32160
cagtcgggtg	ttgcgggtgt	aggttatttc	tgtgtctgca	gaaaacagtg	caacctggac	32220
aaaagaaata	aatgatataa	tttttcattc	aggcaactag	attccgtggg	acaaaaggct	32280
ccctggggaa	cgaggccggg	acagcgcggc	tcctgagtcg	ctatttccgt	ctgtcaactt	32340
ctctaattct	ttgatttcct	ccctctgtct	gtttccttcc	tcttgctggg	gccagtgga	32400

ES 2 639 020 T3

gtctgtgtac tcacagggag gaggggtggca aagccctggt cctctacggg ctgggggaag	32460
gggggaagct gtcggcccag tgactttttc ccctttctct ttttcttaga aaccagtctc	32520
aatttaagat aatgagtctc ctcatctacg tgtgctcact attcataggg acttatccac	32580
ccccgccctg tcaatctggc taagtaagac aagtcaaatt taaaaggga cgtttttcta	32640
aaaatgtggc tggaccgtgt gccggcacga aaccagggat ggcggtctaa gttacatgct	32700
ctctgccagc cccggtgcct tttcctttcg gaaaggagac ccggaggtaa aacgaagttg	32760
ccaacttttg atgatgggtg gcgccgggtg actcttttaa atgtcatcca tacctgggat	32820
agggaaggct cttcagggag tcatctagcc ctcccttcag gaaaagattc cacttccggt	32880
ttagttagct tccacctggt cccttatccg ctgtctctgc ccactagtcc tcatccatcc	32940
ggtttccgcc ctcatccacc ttgccctttt agttcctaga aagcagcacc gtagtcttgg	33000
caggtgggcc attggtcact ccgctaccac tgttaccatg gccaccaagg tgtcatttaa	33060
atatgagctc actgagtcct gcgggatggc ttggttggtg atatgcttgc tgcaaaatcg	33120
tgagaactgg agttcaattc ccagcacatg gatgtatttc cagcacctgg aaggcagggg	33180
gcagagatct taaagctcct ggccagacag cccagcctaa ttagtaatca gtgagagacc	33240
ctgtctcaag aaacaagatg gaacatcaaa ggtcaacctc ttgtctccac acacacaaat	33300
acacacatgc acatacatcc acacacaggc aaacacatgc acacacctga acacctcca	33360
caaatacata cataaaaaaa taaatacata cacacataca tacatacacc aacattccct	33420
ctccttagtc tcttggtac gctcttgta cccccactaa ggcttcaact tcttctattt	33480
cttcatcttg actcctctgt actttgcatg ccttttccag caaaggcttt tctttaaatc	33540
tccgtcatte ataaactccc tctaaatttc ttcccctgcc cttttctttc tctctagggg	33600
gataaagaca cactactaca agtcaccgtg ggaccagttt attcaccac ccacctctgc	33660
ttctgttcat ccggccagct aagtagtcca acctctctgg tgcgtgacct tggacctgg	33720
cttcaccaca gctcctccat gctaccacgc cctgcaaacc ttcagcctag cctctggttc	33780
tccaaccagc acaggcccag tctggcttct atgtcctaga aatctccttc attctctcca	33840
tttccctcct gaatctacca ccttctttct cccttctcct gacctcta atgttgggtca	33900
aacgattaca aggaagccaa tgaaattagc agtttggggt acctcagagt cagcagggga	33960
gctgggatga attcacattt ccaggccttt gctttgctcc ccggattctg acaggcagtt	34020
ccgaagctga gtccaggaag ctgaatttaa aatcacactc cagctgggtt ctgaggcagc	34080
cctaccacat cagctggccc tgactgagct gtgtctgggt ggcagtggtg ctggtggtgc	34140
tggtggtgct ggtggtggtg gtggtggtgg tggtggtggt ggtggtggtg tgtgtgtgtg	34200
ttttctgctt ttacaaaact tttctaattc ttatacaaag gacaaatctg cctcatatag	34260
gcagaaagat gacttatgcc tatataagat ataaagatga ctttatgcc cttattagca	34320
atagttactg tcaaaagtaa ttctatttat acacccttat acatgggtatt gcttttgttg	34380
gagactctaa aatccagatt atgtatttaa aaaaaattc ccagtcctt aaaagggtgaa	34440
gaatggaccc agatagaagg tcacggcaca agtatggagt cggagtgtgg agtcctgcc	34500
atggtctgga cagaagcatc cagagagggt ccaagacaaa tgcctcgcct cctaaggaac	34560

ES 2 639 020 T3

actggcagcc	ctgatgaggt	accagagatt	gctaagtgga	ggaatacagg	atcagaccca	34620
tggaggggct	taaagcgtga	ctgtagcagc	cctccgctga	ggggctccag	gtgggcgccc	34680
aaggtgctgc	agtgggagcc	acatgagagg	tgatgtcttg	gagtcacctc	gggtaccatt	34740
gttttagggag	gtggggatct	gtgggtgtgga	gacaggcagc	ctcaaggatg	cttttcaaca	34800
atgggtgatg	agttggaact	aaaacagggg	ccatcacact	ggctcccata	gctctgggct	34860
tgccagcttc	cacatctgcc	ccccaccccc	tgtctggcac	cagctcaagc	tctgtgatct	34920
tacacatcca	aaagaggaag	agtagcctac	tgggcatgcc	acctcttctg	gaccatcagg	34980
tgagagtgtg	gcaagcccta	ggctcctgtc	caggatgcag	ggctgccaga	taggatgctc	35040
agctatctcc	tgagctggaa	ctatctttagg	aataaggatt	atgcccgcgc	gggggttgcc	35100
agcaccctag	cagcctgtgc	ctgcgtaaaa	gcaagtgtctg	ttgatttatc	taaaaacaga	35160
gccgtggacc	caccacacagg	acaagtatgt	atgcatctgt	ttcatgtatc	tgaaaagcga	35220
cacaaccatt	tttcacatca	tggcatcttc	ctaaccccc	ttcttttttg	ttttgttttt	35280
ttgagacagg	gtttctctgt	gtagtctctg	ctgtcctgga	actcactttg	tagaccaggc	35340
tggcctcgaa	ctcagaaatc	ctgggattaa	agggtgtgtc	caccacgccc	ggccctaacc	35400
cccattctta	atgggtgatcc	agtggttgaa	atttcggggc	acacacatgt	ccattagggg	35460
ttagctgctg	tcttctgagc	tacctgggtac	aatctttatc	ccctggggcc	tgggctcctg	35520
atccctgact	cgggcccgat	caagtccagt	tcctggggcc	gatcaagtcc	agttcctggg	35580
cccgaacaag	tccagtcctt	agctcgatta	gtcctcctg	gtccctggc	ctgttcttac	35640
ttacactctt	ccccttgctc	tggacttggt	gctttcttta	ctcaagttgt	ctgccacagt	35700
ccctaagcca	cctctgtaag	acaactaaga	taatacttcc	ctcaagcacg	gaaagtcctg	35760
agtcaccaca	ccctctggag	gtgtgtggac	acatgttcat	gcgtgtggtt	gcgcttacgt	35820
acgtgtgc						35828

<210> 18
 <211> 9301
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18

tagaggagaa	gtcttttggg	agggtttgct	ctgagcacac	ccctttccct	ccctccgggg	60
ctgagggaaa	catgggacca	gccctgcccc	agcctgtcct	callygttg	catgaagcag	120
agaggggctt	taaaaaggcg	accgtgtctc	ggctggagac	cagagcctgt	gctactggaa	180
gggtggcgtgc	cctcctctgg	ctgggtaccat	gcagctccca	ctggccctgt	gtctcgtctg	240
cctgctggta	cacacagcct	tccgtgtagt	ggagggccag	gggtggcagg	cgttcaagaa	300
tgatgccacg	gaaatcatcc	ccgagctcgg	agagtacccc	gagcctccac	cggagctgga	360
gaacaacaag	accatgaacc	gggcggagaa	cggagggcgg	cctccccacc	acccctttga	420

ES 2 639 020 T3

gaccaaaggt atggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggttttaga	480
aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg	540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctgggtgca	600
gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtagagagc ccagggcagg	660
gaggacgctg gggtaggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag	720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaatatag gagccacgct cagctgctgg	780
taccactggg aaggggaacaa ggtaaggagg cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg	840
caccggacac tctatgctgg tggtaggtgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc	900
cccaggaggt gaacccccag ctcgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt	960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctgggt	1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtggt ggaggaaggc cagagaggca	1080
cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatgggag	1140
ttttcggcac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag	1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac	1260
cttgctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt gggttcctgg tcaggcctgc	1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc	1380
atgggggctg ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc	1440
aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggacccca gccctccccg cctcacaacc	1500
tgttgggact atgggggtgct aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggaccctccg	1560
tcttcaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc	1620
tgggtccag cgactgcctg aagggtgtga aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc	1680
tggactccca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgctcaaac aaagtcatga	1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggag ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct	1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc	1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccccctgc	1920
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtccctc tctggtttgg	1980
tcttaagact atttttcatt ctttcttgtc acattggaac tatccccatg aaacctttgg	2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctccccccc atctaagtc	2100
accataggag acatgggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc	2160
tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcctatcca gataacacag aacaagaaat	2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtagg tttgggtcag	2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc	2340
cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa	2400
ggtagctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc	2460
ttttctctgg ctgggctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac aactgcctt	2520
tgattccttt caagtctaata gaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctgcct	2580

ES 2 639 020 T3

ccacagcagc	tgccctgatt	tattaccttc	aattaacctc	tactcctttc	tccatcccct	2640
gtccaccccct	cccaagtggc	tggaaaagga	atattgggaga	agccagagcc	aggcagaagg	2700
tgtgctgagt	acttacccctg	cccaggccag	ggaccctgcg	gcacaagtgt	ggcttaaattc	2760
ataagaagac	cccagaagag	aaatgataat	aataatacat	aacagccgac	gctttcagct	2820
atatgtgcc	aatggatatt	tctgcattgc	gtgtgtaatg	gattaactcg	caatgcttgg	2880
ggcggcccat	tttgagagca	ggaagaagag	agagggttaag	gaacttgccc	aagatgacac	2940
ctgcagttag	cgatggagcc	ctgggtgttg	aaccccagca	gtcatttggc	tccgagggga	3000
cagggctgcg	aggagagcct	tccaccagct	ctagagcatc	tgggaccttc	ctgcaataga	3060
tgttcagggg	caaaagcctc	tggagacagg	cttggaacaa	gcagggctgg	ggtggagaga	3120
gacgggccc	tccagggcag	gggtggccag	gcgggcccgc	accctcacgc	gcgcctctct	3180
ccacagacgt	gtccgagtag	agctgccgcg	agctgcactt	cacccgctac	gtgaccgatg	3240
ggccgtgccc	cagcgccaag	ccggtcaccg	agctgggtgtg	ctccggccag	tgcggcccgg	3300
cgcgcctgct	gcccacgccc	atcggccgcg	gcaagtgggtg	gcgacctagt	gggcccgcact	3360
tccgctgcat	ccccgaccgc	taccgcgcgc	agcgcgtgca	gctgctgtgt	cccgggtgggtg	3420
aggcgccgcg	cgcgcgcaag	gtgcgcctgg	tggcctcggtg	caagtgcgaag	cgcctcaccc	3480
gcttccacaa	ccagtccgag	ctcaaggact	tccggaccga	ggccgctcgg	ccgcagaagg	3540
gccggaagcc	gcggccccgc	gcccggagcg	ccaaagccaa	ccaggccgag	ctggagaacg	3600
cctactagag	cccgcgccgc	cccctcccca	ccggcgggcg	ccccggccct	gaacccgcgc	3660
cccacatttc	tgtcctctgc	gcgtgggttg	attgtttata	tttcattgta	aatgcctgca	3720
acccagggca	gggggctgag	accttccagg	ccctgaggaa	tcccggggcg	cggcaaggcc	3780
cccctcagcc	cgcagctga	gggggtccac	ggggcagggg	aggggaattga	gagtcacaga	3840
cactgagcca	cgcagccccg	cctctggggc	cgcctacctt	tgctgggtccc	acttcagagg	3900
aggcagaaat	ggaagcattt	tcaccgccct	gggtttttaa	gggagcggtg	tgggagtggg	3960
aaagtccagg	gactgggttaa	gaaagtggga	taagattccc	ccttgacact	cgtgcccatt	4020
cagaaagcct	gaggcggtgc	cagagcacia	gactgggggc	aactgtagat	gtgggtttcta	4080
gtcctggctc	tgccactaac	ttgctgtgta	accttgaaact	acacaattct	ccttcggggac	4140
ctcaatttcc	actttgtaaa	atgagggttg	aggtgggaat	aggatctcga	ggagactatt	4200
ggcatatgat	tccaaggact	ccagtgcctt	ttgaatgggc	agagggtgaga	gagagagaga	4260
gaaagagaga	gaatgaatgc	agttgcattg	attcagtgcc	aaggtcactt	ccagaattca	4320
gagttgtgat	gctctcttct	gacagccaaa	gatgaaaaac	aaacagaaaa	aaaaaagtaa	4380
agagtctatt	tatggctgac	atattttacg	ctgacaaacl	cttgyaayaa	gctatgctgc	4440
ttcccagcct	ggcttccccg	gatgtttggc	tacctccacc	cctccatctc	aaagaaataa	4500
catcatccat	tggggtagaa	aaggagaggg	tccgaggggtg	gtgggagggga	tagaaatcac	4560
atccgcccc	acttcccaaa	gagcagcatc	cctcccccca	cccatagcca	tgttttaaa	4620
tcaccttccg	aagagaagtg	aaagggtcaa	ggacactggc	cttgaggcc	caggggagca	4680
gccatcacia	actcacagac	cagcacatcc	cttttgagac	accgccttct	gcccaccact	4740

ES 2 639 020 T3

cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc	4800
ttacactaaa agaattattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac	4860
tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct	4920
tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca	4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgctccac	5040
aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt	5100
atztatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac	5160
agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaaag	5220
gatgtgggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc	5280
tcttggtcac tagagctcca accttggaca cacctttgac tgctctctgg tggcccttgt	5340
ggcaattatg tcttcctttg aaaagtcattg tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc	5400
atctcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctcccct	5460
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgctcaa aagccttcca	5520
tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggcttctct	5580
gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat	5640
ccctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccacca ataactaatc ctctttcttt	5700
aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctcccat	5760
gatccctctc tctctgagg ttccagccc ttttgtctac accactactt tgggttctaa	5820
ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta	5880
ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct	5940
tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggccc	6000
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaagt gtcttaatag tgctggatgc	6060
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa	6120
gggtgggatgg tcaactggaa agcttttaaat taagtccagc ctacctggg ggaaccacc	6180
cccacaaaga aagctgaggt cctcctgat gacttgtcag tttaactacc aataaccac	6240
ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccggtcc	6300
cttctgaggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagttagcc cctgcagaaa atccatgcat	6360
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc	6420
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgtgtt	6480
tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgccc ggtggagtg cagtgtcaca	6540
atctcggtt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctctg cctcagcctc	6600
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tatttttgat	6660
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct	6720
gcctgcctcg gcctcccaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccca	6780
ggttggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaattgtt tgcccacagc	6840
catacttggg ctcagttcct tgccctaccc ctcaattgag ctgcttagaa cctgggtggg	6900

ES 2 639 020 T3

acatgggcaa	taaccaggtc	acactgtttt	gtaccaagtg	ttatgggaat	ccaagatagg	6960
agtaatttgc	tctgtggagg	ggatgagggg	tagtgggttag	ggaaagcttc	acaaagtggg	7020
tgttgcttag	agattttcca	ggaggagaag	ggggcttcta	ggcagaaggc	atagcccaag	7080
caaagactgc	aagtgcattg	ctgctcatgg	gtagaagaga	atccaccatt	cctcaacatg	7140
taccgagtc	ttgccatgtg	caaggcaaca	tgggggtacc	aggaattcca	agcaatgtcc	7200
aaacctaggg	tctgctttct	gggacctgaa	gatacaggat	ggatcagccc	aggctgcaat	7260
cccattacca	cgagggggaa	aaaaacctga	aggctaaatt	gtaggtcggg	ttagagggtta	7320
tttatggaaa	gttatattct	acctacatgg	ggcttataag	cctggcgcca	atcagaaaag	7380
gaacaaacaa	cagacctagc	tgggaggggc	agcattttgt	tgtagggggc	ggggcacatg	7440
ttctgggggt	acagccagac	tcagggtctg	tattaatagt	ctgagagtaa	gacagacaga	7500
gggatagaag	gaaataggtc	cctttctctc	tctctctctc	tctctctctc	actctctctc	7560
tctctcacac	acacacacag	acacacacac	acgctctgta	gggtctact	tatgctccaa	7620
gtacaaatca	ggccacattt	acacaaggag	gtaaaggaaa	agaacgttgg	aggagccaca	7680
ggaccccaaa	attccctgtt	ttccttgaat	caggcaggac	ttacgcagct	gggaggggtg	7740
agagcctgca	gaagccacct	gcgagtaagc	caagttcaga	gtcacagaca	ccaaaagctg	7800
gtgccatgtc	ccacacccgc	ccacctccca	cctgctcctt	gacacagccc	tgtgctccac	7860
aaccggctc	ccagatcatt	gattatagct	ctggggcctg	caccgtcctt	cctgccacat	7920
ccccacccca	ttcttggaac	ctgccctctg	tcttctccct	tgtccaaggg	caggcaaggg	7980
ctcagctatt	gggcagcttt	gaccaacagc	tgaggctcct	tttgtggctg	gagatgcagg	8040
aggcagggga	atattcctct	tagtcaatgc	gaccatgtgc	ctggtttgcc	cagggtggtc	8100
tcgtttacac	ctgtaggcca	agcgtaat	ttaacagctc	ccacttctac	tctaaaaaat	8160
gacccaatct	gggcagtaaa	ttatatgggtg	cccatgctat	taagagctgc	aacttgctgg	8220
gcgtgggtgg	tcacacctgt	aatcccagta	ctttgggacg	tcaaggcggg	tggatcacct	8280
gaggtcacga	gttagagact	ggcctggcca	gcatggcaaa	accccatctt	tactaaaaat	8340
acaaaaatta	gcaaggcatg	gtggcatgca	cctgtaatcc	caggtaactc	ggaggctgag	8400
acaggagaat	ggcttgaacc	caggaggcag	aggttgcagt	gagccaagat	tgtgccactg	8460
ccctccagcc	ctggcaacag	agcaagactt	catctcaaaa	gaaaaaggat	actgtcaatc	8520
actgcaggaa	gaaccaggt	aatgaatgag	gagaagagag	gggctgagtc	accatagtgg	8580
cagcacccgac	tcctgcagga	agggcgagac	actgggtcat	gggtactgaa	gggtgccctg	8640
aatgacgttc	tgttttagag	accgaacctg	agccctgaaa	gtgcatgcct	gttcatgggt	8700
gagagactaa	attcatcatt	ccttggcagg	tactgaatcc	tttcttaagg	ctgccctcca	8760
atgcccaatt	tcctacaaat	tgtctgggg	gcctaagctt	ctgccacca	agagggccag	8820
agctggcagc	gagcagctgc	aggtaggaga	gataggtagc	cataaggag	gtgggaaaga	8880
gagatggaag	gagaggggtg	cagagcacac	acctcccctg	cctgacaact	tcctgagggc	8940
tggatcatgcc	agcagattta	agggcgaggc	aggggagatg	gggcgggaga	ggaagtga	9000
aaggagaggg	tggggatgga	gaggaagaga	gggtgatcat	tcattcattc	cattgctact	9060

ES 2 639 020 T3

		gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt	9120
		ggagcctcat ggagctcaca gggagtgtctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa	9180
		ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctggtg	9240
		agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag	9300
		c	9301
		<210> 19	
		<211> 21	
5		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
10		<223> Cebador para PCR	
		<400> 19	
		ccggagctgg agaacaacaa g	21
15		<210> 20	
		<211> 19	
		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
20		<220>	
		<223> Cebador para PCR	
		<400> 20	
25		gcactggccg gagcacacc	19
		<210> 21	
		<211> 23	
		<212> ADN	
30		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Cebador para PCR	
		<400> 21	
35		aggccaaccg cgagaagatg acc	23
		<210> 22	
		<211> 21	
		<212> ADN	
40		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Cebador para PCR	
45		<400> 22	
		gaagtccagg gcgacgtagc a	21
		<210> 23	
		<211> 25	
50		<212> ADN	
		<213> Secuencia Artificial	
		<220>	
		<223> Cebador para PCR	
55		<400> 23	

ES 2 639 020 T3

	aagcttggtgta ccatgcagct cccac	25
	<210> 24	
	<211> 50	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
10	<400> 24	
	aagctttctac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgtaggcg ttctccagct	50
	<210> 25	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
20	<400> 25	
	gcactggccg gagcacacc	19
	<210> 26	
25	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador para PCR	
	<400> 26	
	gtcgtcggat ccatgggggtg gcaggcgttc aagaatgat	39
35	<210> 27	
	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
	<400> 27	
	gtcgtcaagc ttctacttgt catcgtcctt gtagtcgtag gcgttctcca gtcgggc	57
45	<210> 28	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
	<400> 28	
	gacttgatc ccaggggtgg caggcgttc	29
55	<210> 29	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador para PCR	

	<400> 29		
	agcataagct tctagtaggc gttctccag	29	
5	<210> 30 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <223> Cebador para PCR		
	<400> 30		
	gacttggatc cgaaggga aagaaagg	29	
15	<210> 31 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
20	<220> <223> Cebador para PCR		
	<400> 31		
	agcataagct tttaatccaa atcgatgga	29	
25	<210> 32 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
30	<220> <223> Cebador para PCR		
	<400> 32		
	actacgagct cggccccacc acccatcaac aag	33	
35	<210> 33 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Cebador para PCR		
	<400> 33		
45	acttagaagc tttagtcct cagccccctc ttcc	34	
50	<210> 34 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
	<220> <223> Cebador para PCR		
55	<400> 34		
	aatctggatc cataacttcg tatagcatatc attatacgaa gttatctgca ggattcgagg	60	
	gccct	66	

ES 2 639 020 T3

	<210> 35	
	<211> 82	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
	<400> 35	
	aatctgaatt ccaccggtgt taattaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta	60
10	tagatctaga gtcagcttct ga	82
	<210> 36	
	<211> 62	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
20	<400> 36	
	atctaggtga cactatagaa ctcgagcagc tgaagcttaa ccacatggtg gctcacaacc	60
	at	62
	<210> 37	
	<211> 54	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
30	<400> 37	
	aacgacggcc agtgaatccg taatcatggt catgctgcca ggtggaggag ggca	54
	<210> 38	
	<211> 31	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
40	<400> 38	
	attaccaccg gtgacaccg cttcctgaca g	31
	<210> 39	
	<211> 61	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
50	<400> 39	
	attacttaat taaacatggc gcgccatatg gccggcccct aattgcggcg catcggttaat	60
	t	61
55	<210> 40	
	<211> 34	
	<212> ADN	

ES 2 639 020 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

5

<400> 40

attacggccg gccgcaaagg aattcaagat ctga - 34

<210> 41

<211> 34

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

15

<400> 41

attacggcgc gcccctcaca ggccgcaccc agct 34

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se unen a una proteína codificada por el SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde la proteína codificada es la del SEQ ID NO: 2.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, en donde el anticuerpo o fragmento se unen a dicha proteína cuando son expresados por células de insecto.
- 10 4. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo o fragmento se unen a dicha proteína cuando son expresados utilizando un sistema de baculovirus en células Sf9.
5. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, en donde el anticuerpo o fragmento se unen a dicha proteína cuando son expresados por células de mamífero.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, en donde el anticuerpo o fragmento se unen a dicha proteína cuando son expresados por células de riñón embrionario humano u osteoblastos primarios.
- 20 7. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 6, en donde las células de riñón embrionario humano son células 293-HEK.
8. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se unen a una proteína que tiene una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 2 y que aumentan el contenido mineral del hueso.
- 25 9. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, o Fv.
10. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que son monoclonales.
- 30 11. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 10, que son murinos o humanos.
12. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que están humanizados.
- 35 13. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que son policlonales.
14. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que son un anticuerpo o fragmento de la clase IgG.
- 40 15. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 14, en donde la clase de IgG es IgG₂ o IgG₄.
16. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el anticuerpo o fragmento son un anticuerpo o fragmento IgE, IgM o IgA.
- 45 17. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que están conjugados con una molécula efectora o informadora.
18. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 17, en donde el anticuerpo o fragmento están conjugados con un polímero.
- 50 19. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo o fragmento están conjugados con polietilenglicol.
20. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 55 21. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 20.
22. Una célula que produce un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 60 23. La célula de acuerdo con la reivindicación 22, que es un hibridoma.
24. Un método para producir un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal como se define en la reivindicación 10, comprendiendo el método:
- 65 (i) inmunizar una rata o ratón con una proteína codificada por el SEQ ID NO: 1 o una porción de la misma;

- (ii) sacrificar la rata o ratón y recoger el bazo y/o los ganglios linfáticos de la rata o ratón; y
- (iii) fusionar las suspensiones de células de bazo o ganglio linfático con células de mieloma para generar hibridomas.

- 5 25. El método de la reivindicación 24, en donde el método comprende adicionalmente escrutar los hibridomas para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo contra dicha proteína.
26. El método de la reivindicación 24, en donde el ratón ha sido modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.
- 10 27. Un método para producir un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende aislar y purificar el anticuerpo o fragmento de un hibridoma como se define en la reivindicación 23, o preparar uno o más vectores de expresión replicables que contienen ADN que codifica las regiones variable y/o constante del anticuerpo y transformar una línea celular apropiada
- 15 en la que tiene lugar la producción del anticuerpo.
28. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso en un método para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente.
- 20 29. El anticuerpo o fragmento para el uso de la reivindicación 28, en donde el animal de sangre caliente tiene osteopenia o fractura ósea.
30. El anticuerpo o fragmento para el uso de la reivindicación 29, donde la osteopenia está causada por un estado anémico, esteroides, heparina, un trastorno de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia y osteoporosis congénitas, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes melitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria u osteomalacia.
- 30 31. El anticuerpo o fragmento para el uso de la reivindicación 28, en donde el animal tiene osteoporosis.
32. El anticuerpo o fragmento para el uso de la reivindicación 28, en donde el animal el animal tiene acondroplasia.
- 35 33. El anticuerpo o fragmento para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en donde el animal de sangre caliente es un ser humano.
34. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 40 35. Un método *in vitro* para detectar una proteína codificada por el SEQ ID NO: 1, que comprende incubar un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo o fragmento se unan a dicha proteína, y detectar dicha unión.
- 45 36. El método de la reivindicación 35, en donde dicho anticuerpo o fragmento están unidos a un soporte sólido.
- 50 37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde dicho anticuerpo o fragmento están marcados.
38. El método de la reivindicación 37, en donde dicho anticuerpo o fragmento están marcados con un marcador seleccionado entre una enzima, una proteína fluorescente y un radioisótopo.
- 55 39. Un kit para la detección de una proteína codificada por el SEQ ID NO: 1, que comprende un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
40. El uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la fabricación de un medicamento para incrementar la mineralización ósea en un mamífero de sangre caliente.
- 60 41. El uso de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el mamífero tiene osteopenia o fractura ósea.
- 65 42. El uso de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el mamífero tiene osteoporosis.

Esqueleto de Cisteína Común

1				50	
human_gremlin.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	MHLLLFQLLV	LLPLGKTTRH	QDGRQNQSSL	SPVLLPRNQ	ELPTGNHEEA
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
human_gremlin.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLLPA	AEGKKKGSQG
human_cerberus.pro	EEKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	----MQLPLA	LCLVCLLVHT
	101				150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QQPGSRNRGR	GQGRGTAMPG	EEVLESSQEA
human_cerberus.pro	SDSEPFPPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLRE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV
human_dan.pro	-----	-----	-----	MLRVLVGAVL	PAMLLAAPPP
human_beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATET	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGGRPP
	151	↓	↓	↓	↓
human_gremlin.pro	LHVTERKYLK	RDWCKTQPLK	QTIHEEGCNS	RTIINRF.CY	GQCNSFYIPR
human_cerberus.pro	ILPIKSHEVH	WETCRTVPFS	QTITHEGCEK	VVVQNNL.CF	GKCGSVHFP.
human_dan.pro	INKLALFPDK	SAWCEAKNIT	QIVGHSGCEA	KSIQNRA.CL	GQCFSYSVPN
human_beer.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTELVCS	GQCGPARLLP
	201	↓	↓		250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPPTK	K.KRVTRVKQ
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE
human_dan.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHHEVPR	VDKLVEKILH
human_beer.pro	NAIGRGKWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGGEAPRA	RKVRLVAS..
	↓↓				
human_gremlin.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	300
human_cerberus.pro	CQCKVKTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGVSA-	-----	-----
human_dan.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH	PGQTPEPED
human_beer.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQKGRK	PRPRARSAKA	NQAELENAY~
	301	314			
human_gremlin.pro	-----	-----			
human_cerberus.pro	-----	-----			
human_dan.pro	PPGAPHTEEE	GAED			
human_beer.pro	-----	-----			

Figura 1

Expresión del Gen Beer Humano por RT-PCR

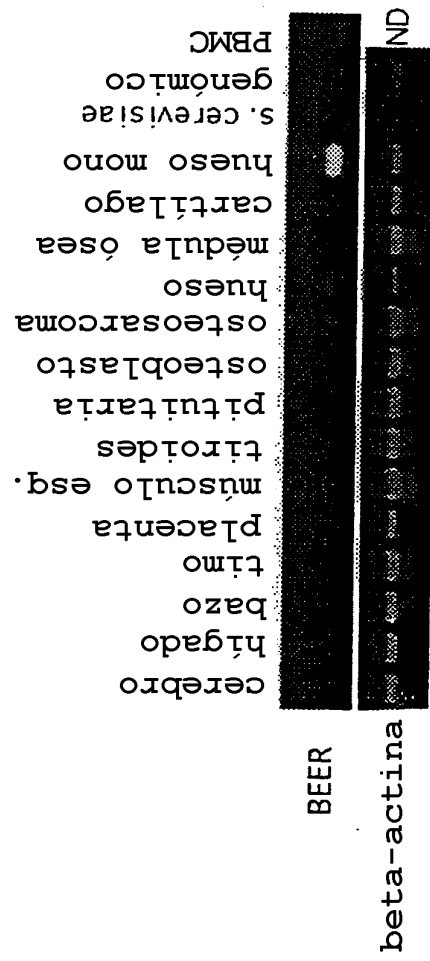


Fig. 2

Hibridación In Situ de ARN de Secciones de Embrión de Ratón

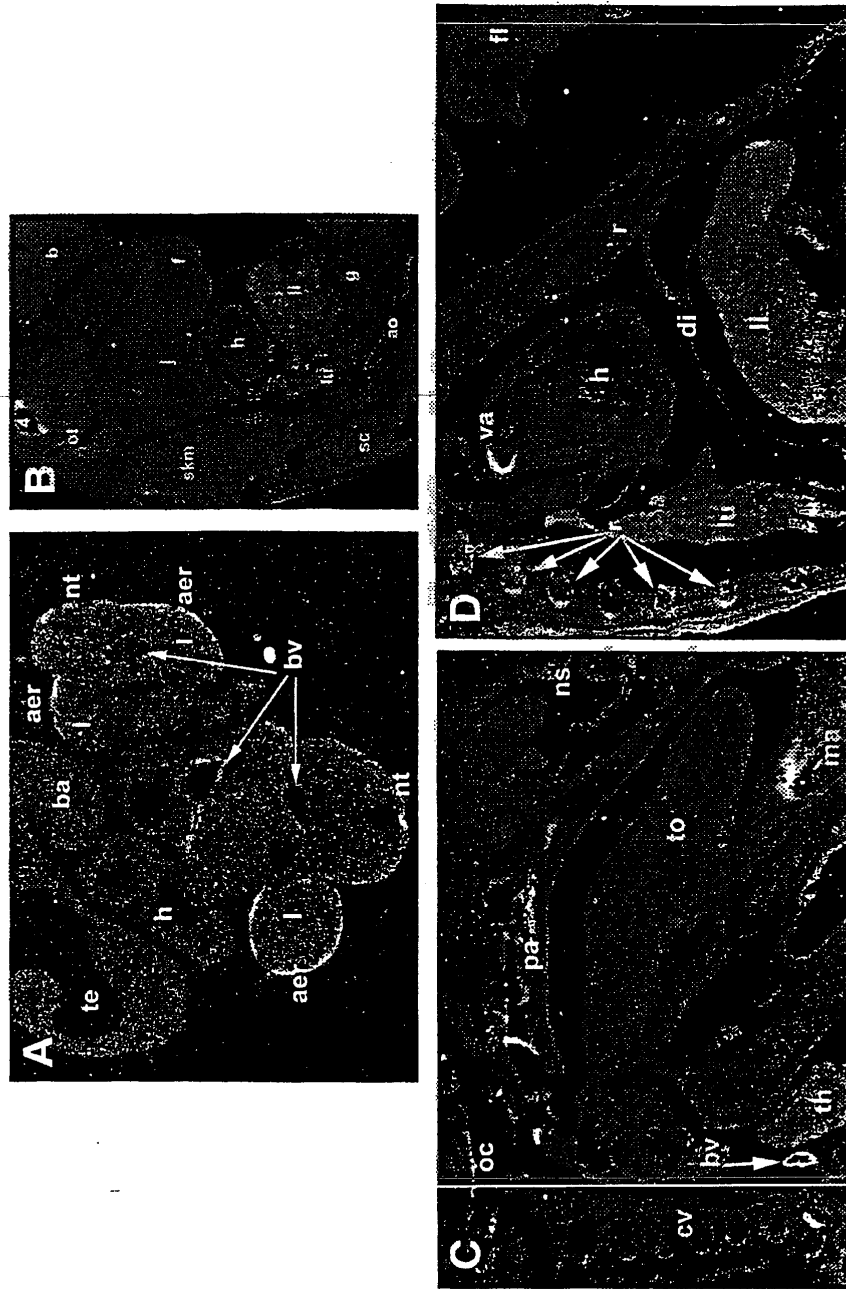


Fig. 3

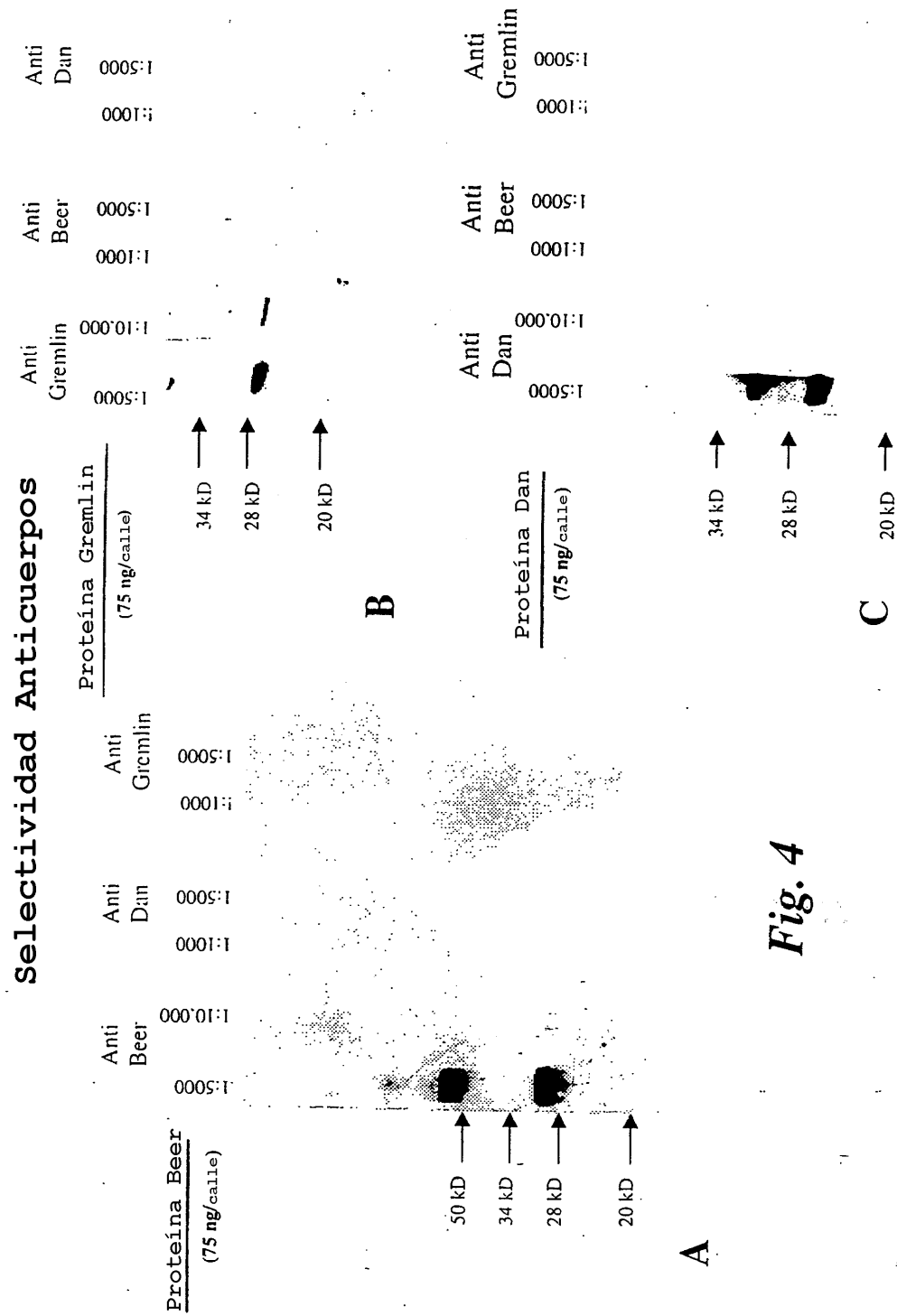


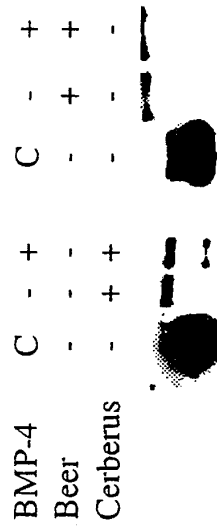
Fig. 4

Evaluación de la unión Beer a miembros de la familia BMP Inmunoprecipitación Anti-FLAG



*transferencia western Anti-BMP-6

*transferencia western Anti-BMP-5



*transferencia western Anti-BMP-4

Fig. 5

Caracterización de la Constante de Disociación de BMP-5/Beer

75 1,5 7,5 15 30 60 120 nM BMP-5



*Inmunoprecipitación Anti-FLAG *Transferencia
western anti-BMP-5

Desorganización Iónica de la Unión BMP-5/Beer

NaCl(mM)	500	150	150	BMP-5
Beer	+	+	-	western
BMP-5	+	+	+	control



* Inmunoprecipitación anti-FLAG

* Western anti-BMP-5

Fig. 6