

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 970**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2013 PCT/JP2013/079200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14069431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2013 E 13851107 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2915879**

54 Título: **Célula madre neuronal que tiene una capacidad de paso incrementada, método para producir dicha célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, y método para cultivar célula madre neuronal para incrementar la capacidad de paso de dicha célula madre neuronal**

30 Prioridad:

**31.10.2012 JP 2012241366**

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

**08.05.2018**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)  
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku  
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**MIYAMOTO, NORIMASA;  
ONO, YUICHI;  
NAMIKI, KANA y  
KASUYA, YOSHITOSHI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 666 970 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**

Célula madre neuronal que tiene una capacidad de paso incrementada, método para producir dicha célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, y método para cultivar célula madre neuronal para incrementar la capacidad de paso de dicha célula madre neuronal

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a (1) una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada (algunas veces denominada como "capacidad de proliferación de paso potenciada"), (2) un método para fabricar una célula madre neuronal que tiene dicha capacidad de paso incrementada, (3) un método para cultivar células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, (4) el uso de un agente en el cultivo de células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, y similares.

10

Más específicamente, en un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre neuronal que tiene una capacidad de paso incrementada que tiene las siguientes características:

(a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,

15 (b) el flujo de Ca<sup>2+</sup> vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,

(c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones (más preferiblemente, 15 generaciones) o más, y

20 (d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

Técnica antecedente

Se ha pensado convencionalmente que no se produce la regeneración del sistema nervioso central. Sin embargo, el reciente descubrimiento de células madre endógenas en cerebro adulto ha apuntado la posibilidad de que se produce la regeneración nerviosa incluso en un cerebro maduro. Por ejemplo, la neurogénesis constitutiva mediante células madre neuronales se ha mostrado previamente en el sistema nervioso subventricular/olfativo y el giro dentado hipocámpico del cerebro de rata adulta. Además, se sabe que, junto con la lesión cerebral, aparecen y proliferan células madre neuronales en otros sitios tales como la neocorteza cerebral o el estriado, y se espera enormemente la aplicación terapéutica de estas células madre neuronales que aparecieron y proliferaron a daño cerebroespinal o enfermedad neurodegenerativa, etc. (Bibliografías 1 y 2 No de Patente).

25

Se sabe que las células madre neuronales de los animales se diferencian en células nerviosas y gliocitos (astrocitos y oligodendrocitos) (multipotencia). Además, las células madre neuronales de los animales pueden reproducir células que tienen la misma multipotencia mediante división (capacidad de autorrenovación).

30

Las células madre neuronales de los animales se pueden emplear para medicina regenerativa (tal como terapia de trasplante), y también se pueden emplear como una herramienta de ensayo (tal como una herramienta de ensayo para explorar el sistema de control de la diferenciación). En consecuencia, las células madre neuronales de los animales han encontrado una gran atención, y se están llevando a cabo diversos análisis sobre células madre neuronales de animales.

35

Las células madre neuronales de animales se pueden cultivar añadiendo un factor proliferativo (EGF, FGF) (Bibliografías 3 y 4 No de Patente). Cuando las células madre neuronales de animales se emplean para medicina regenerativa, o se emplean como una herramienta de ensayo, es esencial (1) el mantenimiento de la capacidad para ser capaces de proliferar ("capacidad de autopropagación"), o simplemente ("capacidad de proliferación"), o (2) el mantenimiento de la capacidad para ser capaces de producir células nerviosas mediante inducción de la diferenciación ("potencial de diferenciación en una célula nerviosa"), y similares.

40

Sin embargo, se sabe generalmente que las células madre neuronales con paso repetido (1) tienen una capacidad de autopropagación reducida, así como (2) pierden su potencial de diferenciación en una célula nerviosa y tienen más tendencia a diferenciarse en gliocitos (Bibliografía 5 No de Patente). En consecuencia, es esencial una tecnología para el paso continuo de células madre neuronales durante una generación más prolongada, a la vez que mantienen tanto la "capacidad de autopropagación" como el "potencial de diferenciación en una célula nerviosa".

45

Se conoce un animal no humano modificado genéticamente que tiene suprimido el gen del canal de calcio de tipo N. También se sabe que dicho animal se emplea para agentes de cribado implicados en el control de la tensión arterial, transmisión del dolor, control de la glucemia, y similar (Bibliografías 1 y 2 de Patente). También se conoce la inhibición de la función o expresión del canal de calcio de tipo N en células madre neuronales con un inhibidor, para verificar el estado de inhibición de la actividad neuronal (Bibliografía 6 No de Patente).

50

Lista de citas

- [Bibliografía 1 de Patente] Publicación Internacional (WO/2001/030137)
- [Bibliografía 2 de Patente] Publicación de Solicitud de Patente Sin Examinar Publicada Japonesa nº 2007-105046
- 5 [Bibliografía 1 No de Patente] Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 2005; 28:223-250.
- [Bibliografía 2 No de Patente] Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005; 75:321-341.
- 10 [Bibliografía 3 No de Patente] Reynolds B et al. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255,1707-1710.
- [Bibliografía 4 No de Patente] Steven M. Pollard et al. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and Adult forebrain. *Cereb. Cortex*. 2006;16:112-120.
- [Bibliografía 5 No de Patente] Melissa K. et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp. Neurol*. 1999;158:265-278.
- 15 [Bibliografía 6 No de Patente] Stefan A Embryonic Stem-cell derived neurons express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int. J. Devl Neuroscience* 2000;18:201-212.

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 20 La presente invención se ha logrado a la luz de tal situación, y el problema que busca resolver es proporcionar (1) una célula madre neuronal que tiene una capacidad de paso incrementada, (2) un método para fabricar una célula madre neuronal que tiene dicha capacidad de paso incrementada, (3) un método para cultivar células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, (4) el uso de un agente en el cultivo de células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, y
- 25 similares.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores realizaron investigaciones repetidas con animales no humanos genéticamente modificados que tienen suprimido el gen del canal de calcio de tipo N, con el objeto de elucidar patologías relacionadas con el nervio, para desarrollar una terapia para ellas, y similares.

- 30 Como resultado de las intensas investigaciones para resolver los problemas anteriores, se tuvo éxito en el desarrollo de (1) una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, (2) un método para fabricar una célula madre neuronal que tiene dicha capacidad de paso incrementada, (3) un método para cultivar células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, (4) el uso de un agente en el cultivo de células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, y
- 35 similares.

En otras palabras, en un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, que tiene las siguientes características:

- (a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,
- 40 (b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,
- (c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones (más preferiblemente, 15 generaciones) o más, y
- 45 (d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

Además, en un aspecto de la presente invención, "supresión o inactivación del gen del canal de calcio de tipo N" en dicho (a) puede ser una supresión o inactivación que se dirige al gen que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N. Además, en un aspecto de la presente invención, se muestra que dicha "célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada" es positiva a nestina incluso después del paso durante 4 generaciones (más

preferiblemente 15 generaciones). Además, en un aspecto de la presente invención, dicha “célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada” tiene una capacidad de proliferación elevada y una capacidad elevada para formar esferas, incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

5 Además, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para fabricar una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, en el que dicho método de fabricación comprende:

(A) una etapa de preparar un animal no humano genéticamente modificado que tiene suprimido o inactivado el gen de canal de calcio de tipo N,

(B) una etapa de aislar una célula madre neuronal a partir de tejido obtenido de dicho animal no humano genéticamente modificado, y

10 (C) según se desee, una etapa de subcultivar además dicha célula madre neuronal aislada,

y en el que dicha “célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada” tiene las siguientes características:

(a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,

15 (b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,

(c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones (más preferiblemente, 15 generaciones) o más, y

20 (d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

Aquí, en un aspecto de la presente invención, dicho animal no humano genéticamente modificado puede ser un roedor.

Además, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para fabricar una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, en el que dicho método de fabricación comprende:

25 (J) una etapa de preparar *in vitro* una célula madre neuronal,

(K) una etapa de suprimir o inactivar el gen del canal de calcio de tipo N de dicha célula madre neuronal, y

(H) según se desee, una etapa de subcultivar además dicha célula madre neuronal que tiene suprimido o inactivado el gen del canal de calcio de tipo N,

30 y en el que dicha “célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada” tiene las siguientes características:

(a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,

(b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,

35 (c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones (más preferiblemente, 15 generaciones) o más, y

(d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

40 Aquí, en un aspecto de la presente invención, la célula madre neuronal en dicha etapa (J) puede ser una célula derivada de un ser humano. Además, en un aspecto de la presente invención, la célula madre neuronal en dicha etapa (J) puede ser una célula madre neuronal preparada mediante inducción de la diferenciación de una célula ES o iPS en una célula madre neuronal, o puede ser una célula madre neuronal preparada como una célula iNS.

45 En un aspecto de la presente invención, en los dos métodos de fabricación de una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada descritos anteriormente, dicha “supresión o inactivación del gen del canal de calcio de tipo N” puede ser una supresión o inactivación que selecciona como diana al gen que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N.

Además, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para cultivar células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, que comprende:

(X) una etapa de preparar una célula madre neuronal, e

(Y) una etapa de cultivar dicha célula madre neuronal en condiciones que inhiban la función o expresión del canal de calcio de tipo N.

5 La "etapa de cultivar" en la etapa (Y) anterior puede ser "una etapa de hacer proliferar la célula madre neuronal mediante cultivo".

Además, en un aspecto, la presente invención, además de las etapas (X) e (Y) anteriores, puede comprender además (Z) una etapa de evaluar que dicha célula madre neuronal cultivada en dicha etapa (Y) tiene una capacidad de paso incrementada.

10 Además, en un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre neuronal obtenida mediante el método de cultivo anterior.

En un aspecto del método de cultivo anterior de la presente invención, dicha "etapa de cultivar en condiciones que inhiban la función o expresión del canal de calcio de tipo N" puede comprender una etapa de aplicar a una célula un agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N. Los ejemplos no limitantes de tal agente incluyen  $\omega$ -conotoxina GVIA y/o la proteína ciclina.

15 En un aspecto del método de cultivo anterior de la presente invención, dicha "etapa de cultivar en condiciones que inhiban la función o expresión del canal de calcio de tipo N" puede comprender una etapa de aplicar a una célula un agente que inhibe la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N. Los ejemplos no limitantes de tal agente incluyen ARNhp o ARNpi.

20 Además, en un aspecto, la presente invención se refiere a una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, que tiene las siguientes características:

(a) el canal de calcio de tipo N está inhibido en dicha célula al cultivarla en condiciones que inhiben la función o expresión del canal de calcio de tipo N,

(b) se muestra que dicha célula es positiva a nestina incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones), y

25 (c) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente, 15 generaciones).

Además, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N en el cultivo de células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales. Los ejemplos no limitantes de tal agente incluyen  $\omega$ -conotoxina GVIA y/o la proteína ciclina.

30 Además, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente que inhibe la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N en el cultivo de células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales. Los ejemplos no limitantes de tal agente incluyen ARNhp o ARNpi.

De esta manera, los presentes inventores han encontrado que, con respecto a la célula madre neuronal de la presente invención que tiene capacidad de paso incrementada:

35 • el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,

• el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N está sustancialmente ausente o suprimido en dicha célula,

• dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones) o más,

• dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones),

40 • se muestra que dicha célula es positiva a nestina incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones), y/o

• dicha célula tiene una capacidad de proliferación elevada y una elevada capacidad de formación de esferas incluso después del paso durante 4 generaciones (más preferiblemente 15 generaciones).

Efectos de la invención

45 La célula madre neuronal proporcionada por la presente invención tiene capacidad de paso incrementada con respecto a una célula madre neuronal normal. Además, la célula madre neuronal proporcionada por la presente invención no solamente tiene simplemente una capacidad de paso incrementada, sino que mantiene tanto la "capacidad de autopropagación" como el "potencial de diferenciación en una célula nerviosa".

En consecuencia, empleando la célula madre neuronal proporcionada por la presente invención, se pueden preparar (obtener fácilmente) células madre neuronales o células nerviosas (que se diferencian y se obtienen a partir de aquellas) para diversos experimentos (tales como un experimento para evaluar los efectos del fármacos o los efectos secundarios, etc., relacionados con un agente, y similar). Además, se espera que estas células madre neuronales o células nerviosas (que se diferencian y obtienen a partir de aquellas) se empleen favorablemente para medicina regenerativa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la capacidad formadora de esferas para cada una de las células madre neuronales derivadas de ratón deficientes en NVDCC, y células madre neuronales derivadas de ratón WT (Ejemplo 1).

La Figura 2 muestra que las neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficientes en NVDCC tienen capacidad de proliferación incluso después de pasos repetidos (Ejemplo 1).

La Figura 3 muestra la diferenciación de células madre neuronales en diversos tipos de nervios (Ejemplo 1).

La Figura 4 muestra que las neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficientes en NVDCC mantienen el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después de repetir 80 pasos (Ejemplo 1).

La Figura 5 muestra la capacidad formadora de esferas y la capacidad de proliferación de células madre neuronales derivadas de ratón WT a las que se aplicó un inhibidor específico de NVDCC (Ejemplo 2).

La Figura 6 muestra que las células madre neuronales derivadas de ratón WT a las que se les aplicó un inhibidor específico de NVDCC se diferencian en células nerviosas positivas para Tuj1 y en astrocitos positivos para GFAP (Ejemplo 2).

La Figura 7 muestra que células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó un inhibidor específico de NVDCC mantienen la capacidad para formar repetidamente neuroesferas incluso después del 6° paso (Ejemplo 3).

La Figura 8 muestra que una célula nerviosa diferenciada a partir de una célula madre neuronal derivada del ventrículo lateral de ratón deficiente en NVDCC (neurona diferenciada) se diferencia en una célula nerviosa que tiene un receptor de ácido glutámico que es activado por AMPA (Ejemplo 4).

La Figura 9 muestra que una célula nerviosa diferenciada a partir de una célula madre neuronal derivada del ventrículo lateral de ratón deficiente en NVDCC (neurona diferenciada) se diferencia en una célula nerviosa que tiene un receptor de acetilcolina que comprende un subtipo de receptor de muscarina y un subtipo de receptor de nicotina (Ejemplo 4).

La Figura 10 muestra que el potencial de actividad está significativamente incrementado por 4-AP mediante inducción de la diferenciación de una célula madre neuronal derivada de ratón deficiente en NVDCC (Ejemplo 5).

La Figura 11 muestra que el potencial de actividad está suprimido por TTX mediante inducción de la diferenciación de una célula madre neuronal derivada de ratón deficiente en NVDCC (Ejemplo 5).

La Figura 12 muestra que las células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó un inhibidor específico de NVDCC mantienen la capacidad para formar repetidamente neuroesferas incluso después de 8° paso (Ejemplo 6).

La Figura 13 muestra que células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó un inhibidor específico de NVDCC se diferencian en células nerviosas positivas para Tuj1 y en astrocitos positivos para GFAP (Ejemplo 6)

Descripción de realizaciones

Más abajo se describirán las realizaciones de la presente invención. Las siguientes realizaciones son ejemplificaciones para describir la presente invención, y su fin no es limitar la presente invención solamente a estas realizaciones. La presente invención se puede llevar a cabo en diversas realizaciones.

Nótese que excepto que se mencione particularmente, todos los términos técnicos, términos científicos, y términos especializados usados aquí tienen los mismos significados que los entendidos generalmente por aquellos de pericia normal en el campo técnico al que pertenece la presente invención, y se emplean simplemente para describir aspectos particulares y no pretenden ser limitantes. La presente invención se puede llevar a cabo en diversas realizaciones en tanto que no se separe de su alcance. Todas las bibliografías de la técnica anterior, así como publicaciones de solicitudes de patente no examinadas publicadas, solicitudes de patentes examinadas publicadas, y otras bibliografías de patente citadas aquí, se incorporan aquí como referencia, y se pueden emplear para llevar a

cabo la presente invención.

[1. Célula madre neuronal]

Una célula madre neuronal puede proliferar y pasar repetidamente (capacidad de autorreproducción). Una célula madre neuronal es también una célula no diferenciada que puede crear tres tipos de células que configuran el sistema nervioso central (es decir, células nerviosas, astrocitos, y oligodendrocitos) (multipotencia).

Sin embargo, la célula madre neuronal aquí no está particularmente limitada en tanto que sea una célula que se pueda diferenciar en una célula nerviosa. En consecuencia, la célula madre neuronal aquí es un concepto que comprende una célula progenitora neuronal, etc.

La célula madre neuronal empleada aquí se puede emplear con un método conocido a partir de tejido nervioso embrionario, un tejido nervioso fetal, un tejido nervioso de un individuo después del parto, un tejido nervioso de un individuo joven, o un tejido nervioso de un adulto. Para aislar una célula madre neuronal derivada de tejido cerebral, se pueden emplear los métodos de las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.750.376 y 5.851.832 de Weiss et al., y similares.

Además, como otro método de adquisición, se puede emplear una célula madre neuronal diferenciada a partir de una célula madre tal como una célula ES (célula madre embrionaria) o una célula iPS, mediante un método conocido (tal como Watts C, Anatomical perspectives on adult neural stem cells. *J Anat Sep*; 207(3):197-208. (2005)), o, como la célula madre neuronal empleada aquí, se puede emplear una célula madre neuronal preparada como una célula iNS.

Por ejemplo, una célula ES se puede obtener con un método conocido, tal como haciendo crecer un óvulo fertilizado a partir de un embrión, recuperando la masa celular interna (ICM) que está en el interior, y cultivando ésta en un medio particular.

Por ejemplo, una célula iPS se puede obtener con un método conocido, tal como obteniendo una célula a partir de la piel, cabello, u otros tejidos de un animal, introduciendo varios genes particulares en dicha célula con traducción o un vector vírico, etc., y cultivando ésta en un medio particular.

Una célula iNS (célula madre neuronal inducida) aquí es una célula obtenida a partir de la piel, cabello, u otros tejidos de un animal, que se diferenció directamente en una célula madre neuronal sin sufrir inducción en una célula iPS. Por ejemplo, una célula iNS se puede obtener con un método conocido, tal como obteniendo una célula a partir de la piel, cabello, u otros tejidos de un animal, introduciendo varios genes particulares en dicha célula con transfección o un vector vírico, etc., y cultivando ésta en un medio particular (*Stem Cells*. 2012 Jun; 30(6):1109-1119).

El animal para suministrar la célula madre neuronal de la presente invención no está particularmente limitado, y los ejemplos incluyen pájaros, anfibios, reptiles, peces, mamíferos, y similares. Un aspecto preferido del animal para suministrar la célula madre neuronal de la presente invención aquí es un mamífero. Se prefieren particularmente un ratón, un hámster, una rata, un cobaya, un conejo, un gato, un perro, una vaca, un caballo, un cerdo, un mono, y un ser humano, y los más preferidos como tal animal son una rata y un ser humano.

[2. Canal de calcio de tipo N (NVDCC)]

Un canal de calcio (también denominado como "canal de Ca" es una proteína de membrana que transmite información a una célula ajustando el flujo de Ca<sup>2+</sup> en la célula.

Un canal de calcio puede comprender ampliamente un receptor ionotrópico, pero generalmente se usa para referirse simplemente a un canal de calcio dependiente del voltaje.

Se han identificado diversos canales de calcio dependientes del voltaje procedentes de células nerviosas y células musculares (Bean, B. P. et al, *Ann. Rev. Physiol.*, 51:367-384, 1989, Hess P., *Ann. Rev. Neurosci.*, 56:337, 1990). El canal de calcio dependiente del voltaje se clasifica en seis tipos de tipo activado transitorio/de bajo umbral (tipo T) y de tipos activados sostenidos/de alto umbral (tipo L, N, P, Q, y R) dependiendo de la naturaleza electrofisiológica, sensibilidad a un antagonista, y similar.

Los canales de calcio de tipo N, P, Q, y R existen todos ellos específicamente en el nervio. Se está centrando la atención en los papeles de estos canales de calcio en la función nerviosa (por ejemplo, Lane D. H. et al, *Science*, 239:57-61, 1988, Diane L, et al, *Nature* 340:639-642, 1989).

Entre estos, el canal de calcio de tipo N es un canal de calcio caracterizado por que el flujo de Ca<sup>2+</sup> está suprimido por una toxina peptídica, ω-conotoxina GVIA, aislada de un caracol de concha cónica. El canal de calcio de tipo N también se denomina como NVDCC (canal de calcio dependiente del voltaje de tipo N).

El gen que codifica el canal de calcio de tipo N se denomina aquí simplemente como el gen del canal de calcio de tipo N.

[3. Supresión e inactivación]

La célula madre neuronal de la presente invención que tiene capacidad de paso incrementada también se puede obtener suprimiendo o inactivando el gen del canal de calcio de tipo N.

[3-1. Supresión (interrupción del gen)]

5 La supresión (algunas veces denominada interrupción del gen) significa introducir una mutación en un gen para hacer que su producto génico pierda función.

Un método de supresión incluye la interrupción dirigida. La interrupción dirigida es un método para interrumpir un gen mediante la selección del gen como diana.

10 Por ejemplo, la interrupción dirigida, con respecto a la secuencia de bases del gen a seleccionar como diana, es un método para integrar cierta clase de secuencia de bases (preferiblemente una secuencia de bases que comprende la secuencia de bases de un gen marcador de selección (muy típicamente un gen de resistencia para un agente)) en la secuencia de bases de dicho gen a seleccionar como diana, o la secuencia de bases en su vecindad, de manera que se perderá la función del producto génico de dicho gen.

15 El gen a seleccionar como diana en la presente invención es el gen del canal de calcio de tipo N. Si se suprime el gen del canal de calcio de tipo N, no se producirá el producto génico del gen del canal de calcio de tipo N, y como resultado obvio de esto, el canal de calcio de tipo N no ejercerá su función.

20 Obsérvese que la interrupción dirigida es una ejemplificación de una tecnología para interrumpir dicho gen en base a la información de la secuencia de bases del gen que codifica el canal de calcio de tipo N. El método de supresión en la presente invención pueden ser otros métodos, en tanto que la interrupción se base en la información de la secuencia de bases de dicho gen.

Además, la función del canal de calcio de tipo N (es decir, el producto génico del gen del canal de calcio de tipo N) en la presente invención es el ajuste del influjo de Ca<sup>2+</sup>. En consecuencia, se puede llevar a cabo la confirmación de que ya no se ejerce la función del canal de calcio de tipo N verificando si el influjo de Ca<sup>2+</sup>, que se suprime de otro modo por la  $\omega$ -conotoxina GVIA, está sustancialmente o no.

25 Aquí, la  $\omega$ -conotoxina GVIA es un péptido purificado a partir de una toxina de caracol de concha cónica (*Conus geographus*) (Baldomero M. O. et al., *Biochemistry* 23, 5087, 1984), que se caracteriza por la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO.7.

30 El gen que codifica la subunidad  $\alpha$ 1B, que es la subunidad del canal de calcio de tipo N (algunas veces denominada aquí como "Cacnalb"), se puede emplear como el gen que codifica el canal de calcio de tipo N que va a ser el objeto de la supresión.

Los ejemplos específicos del gen que codifica la subunidad  $\alpha$ 1B del canal de calcio de tipo N pueden incluir, por ejemplo, un gen que consiste en los siguientes ADN (a)-(d):

(a) un ADN que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NOs. 1, 3, o 5.

35 (b) Un ADN que consiste en una secuencia de bases que se hibrida a un ADN que consiste en una secuencia de bases complementarias a las secuencias de bases expuestas en SEQ ID NOs. 1, 3, o 5, en condiciones restrictivas, en el que la secuencia de bases codifica la subunidad  $\alpha$ 1B del canal de calcio de tipo N que posee una función.

(c) Un ADN que consiste en las secuencias de bases que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs. 2, 4, o 6.

40 (d) Un ADN que consiste en una secuencia de bases que se hibrida a secuencias de bases complementarias a las secuencias de bases que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs. 2, 4, o 6, en condiciones restrictivas, en el que la secuencia de bases codifica la subunidad  $\alpha$ 1B del canal de calcio de tipo N que posee una función.

45 La secuencia de bases de SEQ ID NO. 1 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 están registradas en GenBank como Número de Acceso NM0007183, las secuencias de bases de SEQ ID NO. 3 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 están registradas en GenBank como Número de Acceso NM001042528.1, y la secuencia de bases de SEQ ID NO. 5 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6 están registradas en GenBank como Número de Acceso NM001195199.1.

50 Aquí, una "condición restrictiva" se refiere a una condición en la que solamente se producen hibridaciones específicas, y no se producen hibridaciones no específicas. Las condiciones de hibridación aquí pueden incluir condiciones tales como "2×SSC, 0,1% SDS, 50°C", "2×SSC, 0,1% SDS, 42°C", y "1×SSC, 0,1% SDS, 37°C", y una condición más restrictiva puede incluir, por ejemplo, "2×SSC, 0,1% SDS, 65°C", "0,5×SSC, 0,1% SDS, 42°C", y

"0,2×SSC, 0,1% SDS, 65°C".

[3-2. Animal con gen suprimido (gen interrumpido)]

5 El animal no humano con el gen suprimido, para aislar la célula madre neuronal de la presente invención, es un animal no humano que tiene suprimido el gen que codifica el canal de calcio de tipo N, y se puede crear según un método para crear un animal no humano genosuprimido mediante selección génica convencional.

El animal que tiene suprimido el gen del canal de calcio de tipo N, usado aquí, es un animal no humano. Un aspecto preferido del animal no humano que tiene suprimido el gen del canal de calcio de tipo N usado aquí es un roedor. Se prefiere particularmente como tal animal un ratón.

10 La clonación del gen de la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N, la construcción del vector seleccionador de diana empleado para la interrupción dirigida, la adquisición de una célula madre embrionaria (célula ES) que ha sufrido recombinación homóloga, y la adquisición de un animal no humano genosuprimido se describirán más abajo en ese orden, con la interrupción dirigida del gen que codifica el canal de calcio de tipo N como el ejemplo.

1. Clonación de ADN que comprende parte del gen de la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N

15 El ADN que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N se puede obtener diseñando cebadores en base a la secuencia de bases del ADN que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N descrita en Thierry C. et. al, FEBS Letters, 338, 1, 1994, y llevando a cabo la PCR en base al ADN genómico o ADNc de un animal no humano, o llevando a cabo la RT-PCR con dichos cebadores en base al ARN de un animal no humano.

20 Como otro método, el gen de la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N, o una parte del mismo, preferiblemente un clon que comprende una secuencia de bases de 500 pb o mayor, y además preferiblemente 1 kpb o mayor, se puede seleccionar sintetizando una sonda en base a las secuencias de bases del ADN que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N descrita en el mencionado Thierry C. et al, seleccionando un clon que se hibrida a dicha sonda de la biblioteca de ADN genómico o de la biblioteca de ADNc de un animal no humano, y determinando la secuencia de bases del clon seleccionado.

25 Se puede crear el mapa de enzimas de restricción de dicho ADN clonado confirmando los sitios de las enzimas de restricción que están comprendidos en las secuencias de bases de dicho ADN clonado.

30 Cuando no se pudo obtener un ADN de longitud suficiente para la recombinación homóloga, preferiblemente un clon de 7 kpb o mayor, y además preferiblemente 10 kpb o mayor, se puede crear el ADN de longitud suficiente para la recombinación homóloga escindiendo los ADN de múltiples clones en los sitios de las enzimas de restricción apropiados, y conectándolos.

2. Construcción del vector seleccionador de diana

Un vector seleccionador de diana se refiere aquí a un vector empleado para la selección de un gen, que tiene integrada una secuencia de bases de manera que se produce la recombinación homóloga del ADN cuando se pone en contacto con el gen a seleccionar.

35 El ADN empleado para la recombinación homóloga se puede obtener introduciendo un marcador de selección positivo, tal como un gen de resistencia a fármaco, preferiblemente un gen de resistencia a neomicina, en el sitio de la enzima de restricción de la región exónica en el ADN de longitud suficiente para la recombinación homóloga obtenido por dicha clonación. Además, se puede eliminar una porción del exón a partir de dicho ADN empleado para la recombinación homóloga, y sustituirlo en su lugar por un gen de resistencia a fármaco. Cuando no hay sitios de enzimas de restricción apropiados en las secuencias de bases del ADN obtenido mediante dicha clonación, se puede introducir un sitio de enzimas de restricción apropiado, y este sitio de enzimas de restricción se puede emplear para introducir un gen de resistencia a fármaco, etc., en el ADN empleado para la recombinación homóloga mediante PCR empleando cebadores diseñados para comprender un sitio de enzimas de restricción. Mediante ligación de un oligonucleótido que comprende un sitio de enzimas de restricción, y similares.

45 El vector seleccionador de diana comprende preferiblemente aquí un marcador de selección negativo, tal como un gen de timidina cinasa, y un gen de la toxina de la difteria, etc., a fin de eliminar las células ES en las que no se produce recombinación homóloga entre el ADN en el vector seleccionador de diana introducido en una célula y el gen de la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N de la célula ES que tiene introducido el vector seleccionador de diana, sino que en su lugar, el ADN en el vector seleccionador de diana introducido se insertó en un sitio distinto del gen de la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N.

50 Estas tecnologías de ADN recombinante se pueden realizar mediante el método descrito, por ejemplo, en Sambrock, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pero no se limita a ellos, en tanto que se pueda obtener un ADN recombinante apropiado.

3. Adquisición de células madre embrionarias (células ES) que han sufrido recombinación homóloga

5 El mencionado vector seleccionador de diana creado se obtiene en un ADN lineal escindiendo con una enzima de restricción, y se purifica mediante un método tal como extracción con fenol/cloroformo, electroforesis en agarosa, ultracentrifugación, y similar. El mencionado ADN lineal purificado se transfiere entonces a una célula ES, tal como TT2. Los ejemplos del método de transfección pueden incluir electroporación, lipofección, y similar, pero el método de transfección aquí no está limitado a estos métodos.

Una célula ES que tiene el vector seleccionador de diana transfectada se cultiva en un medio de selección apropiado (por ejemplo, en un medio de selección que comprende neomicina y ganciclovir en el medio cuando se construyó un vector seleccionador de diana que tiene integrado un gen de resistencia a neomicina y un gen de timidina cinasa).

10 La confirmación de que está ocurriendo la recombinación homóloga apropiada al ADN de dicha célula ES que ha proliferado con resistencia a fármaco en el medio de selección se puede hacer, por ejemplo, mediante un método como sigue.

15 (i) La integración de un gen de resistencia a neomicina y un gen de timidina cinasa (estos genes se denominan a veces aquí como "transgenes") se puede confirmar fácilmente mediante PCR, etc. (ii) Además, el hecho de que haya ocurrido o no recombinación homóloga se puede confirmar llevando a cabo el análisis de transferencia Southern del ADN de dicha célula ES usando como sonda una parte del ADN en dirección 5' o en dirección 3' en el exterior del vector seleccionador de diana. (iii) Además, la confirmación de que el vector seleccionador de diana no está insertado en ninguna porción distinta de la del sitio del gen diana se puede realizar llevando a cabo el análisis de transferencia Southern usando como sonda el ADN dentro del vector seleccionador de diana. Combinando estos métodos, se pueden adquirir células ES que han sufrido recombinación homóloga.

20 El método de introducir una mutación en un gen diana introduciendo un gen insertado de manera que la función del producto génico se perderá en una célula madre embrionaria, y seleccionando una célula madre embrionaria que ha sufrido recombinación homóloga entre el gen introducido y el gen diana, también se puede llevar a cabo mediante el método descrito, por ejemplo, en Suzanne L. et. al., Nature, 336,348,1988.

25 4. Método para crear un animal no humano genosuprimido

Un aspecto preferido de un animal no humano que tiene suprimido el gen del canal de calcio de tipo N, que se puede usar aquí, es un roedor. Como tal animal, el más preferido es un ratón.

El método para crear un animal no humano genosuprimido se describirá más abajo con un ratón como ejemplo.

30 Un ratón genosuprimido se crea a través de las siguientes etapas: la recogida de embriones de 8 etapas celulares tras la fertilización o blastocitos, la microinyección de células ES que han sufrido recombinación homóloga, el trasplante de óvulos manipulados mediante ingeniería a un ratón pseudopreñado, el parto del ratón pseudopreñado y el amamantamiento de la camada, la selección de los ratones transgénicos mediante métodos de PCR y de transferencia Southern, y el establecimiento de una estirpe de ratón que posea un transgén (Yagi T. et. al., Analytical Biochem. 214, 70, 1993).

35 (1) Recogida de embriones de 8 etapas celulares o de blastocitos

40 Los embriones de ocho etapas celulares se obtuvieron administrando intraperitonealmente cada una de 5 unidades internacionales de gonadotropina de suero de yegua preñada y 2,5 unidades internacionales de gonadotropina coriónica humana a un ratón hembra, a fin de inducir la superovulación, y entonces apareándola con un ratón macho, extirpando la trompa de Falopio y el útero del ratón hembra a los 2,5 días tras el apareamiento, y entonces perfusionando. Cuando se emplean blastocitos, los embriones se obtienen extirpando el útero del ratón hembra a los 3,5 días tras el apareamiento, y entonces perfusionando.

(2) Microinyección de células ES que han sufrido recombinación homóloga

45 Células ES que han sufrido recombinación homóloga, adquiridas mediante el método descrito en dicho "3. Adquisición de células madre embrionarias (células ES) que han sufrido recombinación homóloga", se microinyectan en los embriones de 8 etapas celulares o en blastocitos obtenidos en (1). La microinyección se puede realizar, por ejemplo, en base al método descrito en Hogan, B. L. M., A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986, Yagi T. et. al., Analytical Biochem. 214, 70, 1993, bajo un microscopio invertido, con un micromanipulador, un microinyector, una pipeta de inyección, y una pipeta de soporte. Además, como cápsula para inyección, se puede emplear una gotita de 5 µl del medio y una gotita de células ES suspendidas creadas en Falcon 3002 (Becton Dickinson Labware) en capas con parafina líquida.

50 El embrión de 8 etapas celulares o blastocito microinyectado con una célula ES que ha sufrido recombinación homóloga se denomina aquí como un "óvulo manipulado mediante ingeniería".

(3) Trasplante de óvulos manipulados mediante ingeniería en un ratón pseudopreñado

Un ratón pseudopreñado se crea apareándolo con un ratón macho vasoligado y un ratón hembra de tipo salvaje, y

una vez que está en un estado pseudopreñado, se transplantan los óvulos manipulados mediante ingeniería creados en (2).

5 El trasplante de los óvulos manipulados mediante ingeniería se puede realizar en base a los métodos descritos en, por ejemplo, Hogan, B. L M, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986 o Yagi T. et. al., Analytical Biochem. 214, 70, 1993.

Más abajo se describirá un ejemplo de la operación específica, pero el trasplante de los óvulos manipulados mediante ingeniería no está limitado aquí a aquél.

10 Un ratón pseudopreñado se somete a anestesia general con, por ejemplo, 50 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico, alrededor de 1 cm de ambos flancos se cortan para exponer el ovario y la trompa de Falopio, y la bolsa ovárica se corta con un estereomicroscopio con pinzas para exponer la fimbria de la trompa de Falopio. A continuación, los óvulos manipulados mediante ingeniería se suministran desde la fimbria de la trompa de Falopio a una tasa de 7 a 8 óvulos por trompa de Falopio. En este momento, la confirmación del trasplante dentro del tubo de Falopio se puede hacer observando visualmente microburbujas insertadas junto con el óvulo manipulado mediante ingeniería, bajo un estereomicroscopio.

15 La trompa de Falopio y el ovario del ratón que tiene transplantados los óvulos manipulados mediante ingeniería se devuelven a la cavidad peritoneal, se suturan ambos sitios de incisión, y entonces se despierta de la anestesia.

En algunos casos, los óvulos manipulados mediante ingeniería se pueden cultivar hasta el día después de la creación, y se pueden desarrollar hasta una etapa de blastocito antes de transplantarlos al útero de un ratón pseudopreñado.

20 (4) Parto de ratón pseudopreñado y cuidado de la camada

25 En muchos casos, los bebés de ratones se pueden obtener hacia el día 17 tras el trasplante de los óvulos manipulados mediante ingeniería. Los bebés de ratones son normalmente quimeras de una célula derivada de una célula ES que ha sufrido recombinación homóloga y una célula derivada del ratón a partir del cual se recogió el óvulo fertilizado. Por ejemplo, cuando se empleó TT2 como célula ES, y se inyectó TT2, que ha sufrido recombinación homóloga, en el embrión de 8 etapas celulares recogido de un ratón ICR, el color del pelo corporal de los bebés de los ratones con quimerismo elevado se hizo agutí dominante, y el color del pelo corporal con bajo quimerismo se hizo blanco dominante.

(5) selección de ratones transgénicos mediante métodos de PCR y de transferencia Southern

30 La confirmación de si el transgén se inserta en la célula germinal de dicho ratón quimérico se puede realizar, por ejemplo, mediante un método como sigue.

35 (i) Cuando dicho ratón quimérico se apareó con un ratón que tiene color blanco de pelo corporal (tal como ICR), la presencia o ausencia del transgén se puede confirmar fácilmente verificando el color del pelo corporal del bebé de ratón obtenido. (ii) La presencia o ausencia del transgén también se puede confirmar extrayendo ADN de la cola del bebé de ratón obtenido y sometiéndolo a PCR. (iii) Además, se puede llevar a cabo una identificación genotípica más auténtica llevando a cabo el análisis de transferencia Southern en lugar de la PCR.

Aquí, puesto que se espera que un ratón quimérico con quimerismo elevado comprenda asimismo el transgén en la célula germinal, se prefiere someter a apareamiento a un ratón con quimerismo que sea tan elevado como sea posible.

40 (6) Establecimiento de una estirpe de ratón que posee el transgén

45 Un ratón genosuprimido del canal de calcio de tipo N, en el que el transgén existe en homo (algunas veces denominado aquí como un "ratón N-KO" o un "ratón deficiente en NVDCC") se puede obtener apareando entre sí ratones genosuprimidos del canal de calcio de tipo N hetero (algunas veces denominados aquí como un "ratón He"). El ratón N-KO se puede obtener mediante cualquiera de apareamientos de ratones He entre sí, un ratón He y un ratón N-KO, y ratones N-KO entre sí.

Una célula madre neuronal que tiene suprimido el canal de calcio de tipo N se puede obtener de tejido nervioso embrionario, de un tejido nervioso fetal, de un tejido nervioso de un individuo post-parto, de un tejido nervioso de un individuo joven, o de un tejido nervioso adulto de un animal genosuprimido obtenido como tal con un método de preparación descrito más abajo.

50 [3-3. Inactivación]

La inactivación se refiere aquí a disminuir la cantidad de transcripción o inhibir la traducción de un gen particular mediante transformación. En otras palabras, se refiere a aquellos que no extinguen completamente la función génica, sino que disminuyen (atenúan) la función génica seleccionada como diana.

Como método para inactivar un gen, se puede emplear el método antisentido, que introduce un ARN correspondiente en la cadena antisentido del ARNm en una célula. Como método para inactivar un gen, también se puede utilizar la ARNi (interferencia del ARN), que emplea un ARN bicatenario (ARNhp, ARNpi) o un microARN, etc.

5 Más específicamente, como método para inactivar un gen, se puede emplear un método para disminuir la cantidad de transcripción o inhibir la traducción de un gen particular transformando una célula con un vector de expresión de ARNhp o ARNpi, o transformando una célula con un ARNpi.

En células de mamífero, se sabe que la expresión de solamente una única proteína o ARNm es suprimida específicamente con interferencia de ARN mediante un ARN corto de 30 pb o menos.

[3-4. Animal genoinactivado]

10 Un animal genoinactivado es un animal en el que se introduce artificialmente un ARN bicatenario corto (ARNhp, ARNpi) o un ácido nucleico antisentido que corresponde al ARNm del gen diana, y se expresa en una célula que configura a dicho animal para suprimir la expresión del gen diana mediante la acción de dicho ARNpi o ácido nucleico antisentido. Tal animal genoinactivado se puede crear empleando, por ejemplo, un sistema de expresión de ARNpi mediante un sistema de vector (por ejemplo, Science 296:550-553 (2002), Nature Biotech. 20:500-505  
15 (2002)).

Obsérvese que un animal que tiene inactivado el gen del canal de calcio de tipo N que se puede usar aquí es un animal no humano. Se prefiere particularmente un roedor, y como tal animal, el más preferido es un ratón.

Más abajo se describe un ejemplo de un método para crear un animal que tiene genoinactivado el canal de calcio de tipo N. En el ejemplo mostrado más abajo, el gen que codifica el canal de calcio de tipo N que va a ser el objeto de la inactivación es el gen que codifica la subunidad  $\alpha 1B$ , que es la subunidad del canal de calcio de tipo N.  
20

El ARNpi, ARNhp, etc., para inhibir el gen del canal de calcio de tipo N, no está particularmente limitado en tanto que sea un ácido nucleico que pueda inhibir la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N, y aquellos expertos en la técnica serán capaces de diseñar y fabricar apropiadamente la secuencia del ARNpi, ARNhp, etc.

25 Un vector que expresa un ARNhp que inhibe la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N se puede diseñar de manera que la secuencia de la región que codifica ARNhp tenga, por ejemplo, las siguientes características que comprendan:

(i): una secuencia de 11 a 30 bases contiguas (preferiblemente 21 a 25 bases) en la secuencia de bases que codifica el gen del canal de calcio de tipo N,

(ii): una secuencia de bases complementaria a la secuencia de (i) y en orientación inversa, y

30 (iii): una secuencia de bases que enlaza la secuencia de bases de (i) y la secuencia de bases de (ii), y

cuando las regiones (i)-(iii) se transcriben en un ARN, la porción de ARN transcrita a partir de (i) y la porción de ARN transcrita a partir de (ii) forma un ARN bicatenario, y la porción de ARN transcrita a partir de (iii) forma una región de bucle que enlaza el mencionado ARN bicatenario.

35 El vector de expresión de ARNhp anterior comprende preferiblemente además un promotor en base a la polimerasa II o un promotor específico del proceso de desarrollo, y un ejemplo de tal promotor puede incluir el promotor del gen temprano de citomegalovirus (CMV).

Además, el vector de expresión de ARNhp anterior comprende preferiblemente además una secuencia que escinde autocatalíticamente el ARN, tal como un sitio de ribozima, etc., en dirección 5' de la secuencia de bases de dichas regiones (i)-(iii).

40 El vector de expresión de ARNhp anterior comprende preferiblemente además una secuencia que detiene la ARN polimerasa, tal como una secuencia de dominio MAZ, etc., en dirección 3' de la secuencia de bases de dichas regiones (i)-(iii).

Además, la secuencia de bases de (iii) en el vector de expresión de ARNhp anterior no está particularmente limitada en tanto que pueda tomar una estructura de bucle apropiada.

45 Un animal no humano genoinactivado del canal de calcio de tipo N se puede crear empleando, por ejemplo, un método similar al método descrito en "3-2. Animal genosuprimido (genointerrumpido)" aquí. En este caso, un animal no humano genosuprimido del canal de calcio de tipo N se puede crear empleando un vector de expresión de ARNhp en lugar del vector seleccionador de diana empleado en el método descrito en "3-2. Animal genosuprimido (genointerrumpido)".

50 Una célula madre neuronal que tiene genoinactivado el canal de calcio de tipo N se puede obtener a partir de un tejido nervioso embrionario, un tejido nervioso fetal, un tejido nervioso de un individuo post-parto, un tejido nervioso

de un individuo joven, o un tejido nervioso adulto de un animal no humano genoinactivado obtenido como tal con un método de preparación descrito más abajo.

[4. Agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N]

5 Un agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N que se puede usar aquí no está particularmente limitado en tanto que inhiba transitoriamente o disminuya (atenúe) el canal de calcio de tipo N de la célula madre neuronal, cuyos ejemplos pueden incluir una sustancia química, una proteína, un gen, y similares. Más específicamente, se puede incluir la  $\omega$ -conotoxina GVIA, la proteína ciclina, y similar.

10 Un agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N aquí también incluye un agente que inhibe la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N. Más específicamente, se puede incluir un ARNpi químicamente sintetizado, un ARNpi transcrito *in vitro* usando una enzima, una mezcla de ARNpi producida escindiendo un ARNbc con Dicer o ARNasa III, un casete de expresión de ARNpi sintetizado mediante PCR, y similar.

15 La inhibición del canal de calcio de tipo N de la célula madre neuronal con estos agentes que inhiben la función o expresión del canal de calcio de tipo N se puede lograr añadiendo dicho agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N a una célula madre neuronal a una temperatura apropiada en un medio apropiado, tal como DMEM/F12 (DMEM/F-12 de Ham).

[5. Preparación de célula madre neuronal]

La célula madre neuronal de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, mediante un método mostrado más abajo.

20 [5-1. Preparación de célula madre neuronal derivada de animal no humano genosuprimido o genoinactivado]

El cerebro, preferiblemente el cerebro, el hipocampo, y el ventrículo lateral, etc., de un animal no humano que tiene suprimido o inactivado el gen del canal de calcio de tipo N mediante el método descrito en [3. Supresión e inactivación] aquí se extirparon por medios convencionales, se liberaron en un medio apropiado, tal como medio DMEM/F12 (DMEM/F-12 de Ham) para preparar una sola suspensión celular. Dicha suspensión celular sola se filtra subsiguientemente con, por ejemplo, una malla de nailon, y entonces el tejido se somete a varios minutos de centrifugación a, por ejemplo, alrededor de 100 a 300 g, y se recoge como un precipitado. A continuación, las células recogidas como dicho precipitado se resuspenden en un medio apropiado, tal como medio DMEM/F12 (DMEM/F-12 de Ham). Dichas células resuspendidas se centrifugan adicionalmente, se recoge el precipitado, y la operación de resuspensión se repite varias veces para lavar las células. A continuación, dichas células lavadas se suspenden en un medio apropiado, tal como medio DMEM/F12 (DMEM/F-12 de Ham) que comprende un factor de crecimiento tal como EGF o FGF, un suplemento de sustitución del suero, tal como suplemento N2, así como un antibiótico, tal como penicilina G, estreptomycin, y anfotericina B, según sea necesario.

35 Cuando se cultivan las células suspendidas en dicho medio, algunas células comienzan a proliferar y comienzan a formar esferas (masas celulares). Las esferas (masas celulares) se pueden obtener en alrededor de dos semanas continuando adicionalmente el cultivo con intercambio de medio a una velocidad de varias veces a la semana.

[5-2. Preparación de célula madre neuronal obtenida a partir de célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente suprimiendo el gen del canal de calcio de tipo N]

40 Una célula madre neuronal derivada de un animal no modificado genéticamente se puede obtener mediante un método similar al método descrito en [5-1. Preparación de célula madre neuronal derivada de animal no humano genosuprimido o genoinactivado] aquí, a partir de un tejido derivado de animal no modificado genéticamente.

Además, suprimiendo el gen del canal de calcio de tipo N de la célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente preparada como antes con una tecnología tal como nucleasa de dedos de cinc o TALEN, se puede obtener una célula madre neuronal deseada. Además, suprimiendo el gen del canal de calcio de tipo N con un método conocido en la etapa de célula ES o iPS, y llevando a cabo la inducción de la diferenciación con, por ejemplo, el método descrito en [8. Potencial de diferenciación] más abajo, se puede obtener una célula madre neuronal deseada.

[5-3. Preparación de célula madre neuronal obtenida a partir de célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente inactivando el gen del canal de calcio de tipo N]

50 Una célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente se puede preparar mediante un método similar al método descrito en [5-1. Preparación de célula madre neuronal derivada de animal no humano genosuprimido o genoinactivado] aquí, a partir de un tejido derivado de animal no modificado genéticamente.

Además, inactivando el gen del canal de calcio de tipo N de la célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente preparada como antes con un vector de expresión de ARNhp o un vector de expresión de ARNpi, o transformando la célula con un ARNpi, se puede obtener una célula madre neuronal deseada.

Como dicho vector de expresión de ARNhp o de ARNpi, se puede emplear un vector de expresión de ARN de tipo horquilla de pelo o un vector de expresión de ARN de tipo tándem.

5 Un vector de ARN de tipo horquilla de pelo es un vector de expresión que tiene la secuencia de bases de ARNhp insertada en dirección 3' de la secuencia promotora, y el ARNhp transcrito a partir del vector de expresión introducido es transportado desde el núcleo al citoplasma y recibe procesamiento mediante Dicer para convertirse en un ARNpi bicatenario similar a ARNpi. Un vector de ARN de tipo tándem es un vector que tiene las secuencias molde de cadenas sentido y antisentido que tienen cada una una secuencia promotora insertada, y cadenas sentido y antisentido que se hibridan de forma transcrita separadamente para formar un ARNpi.

10 [5-4. Preparación de célula madre neuronal mediante adición de agente que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N en la célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente]

Una célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente se puede preparar mediante un método similar al método descrito en [5-1. Preparación de célula madre neuronal derivada de animal no humano genosuprimido o genoinactivado] aquí, a partir de un tejido derivado de animal no modificado genéticamente.

15 Una célula madre neuronal derivada de animal no modificado genéticamente también se puede preparar como sigue. Se obtienen células madre neuronales inducidas por diferenciación a partir de una célula ES o iPS genéticamente no modificada con, por ejemplo, el método descrito en [8. Potencial de diferenciación] más abajo, o se obtienen células madre neuronales preparadas como células iNS inducidas por diferenciación a partir de células derivadas de animal no modificado genéticamente, y se recogen en una cápsula mientras se añade un medio, tal como el Bullet Kit, según sea necesario. A continuación, las neuroesferas formadas a partir de las células madre neuronales se recogen mediante separación centrífuga. Las células deseadas se pueden obtener cultivando dichas neuroesferas en un medio, tal como el medio Bullet Kit, que comprende un inhibidor del canal de calcio de tipo N, tal como  $\omega$ -conotoxina GVIA y la proteína ciclina. Además, en dicho método de cultivo, el medio se puede intercambiar varias veces a la semana según sea necesario, y las células se pueden pasar una vez en varios días según sea necesario.

25 Las células madre neuronales derivadas de animal no modificado genéticamente, o las células madre neuronales inducidas por diferenciación a partir de células ES o iPS genéticamente no modificadas, o las células iNS inducidas por diferenciación a partir de células derivadas de animal no modificado genéticamente, se pueden congelar según sea necesario, y descongelar antes del uso.

30 En contraste con las células madre neuronales preparadas como antes, las células deseadas se pueden obtener inhibiendo la función o expresión del canal de calcio de tipo N, por ejemplo con un método como sigue.

(1) Método para aplicar sustancia que inhibe la función o expresión del canal de calcio de tipo N en la célula

Se siembran en un matraz células madre neuronales suspendidas en un medio, se añaden FGF-b y EGF según sea necesario, y se añade además y se cultiva un agente tal como  $\omega$ -conotoxina GVIA y proteína ciclina. Además, la mitad del medio se puede intercambiar cada varios días según sea necesario.

35 (2) Método para introducir ARNhp o ARNpi sintetizado químicamente en la célula

40 El ARNpi, que se sintetiza químicamente a partir de dos ARN (cadenas sentido y antisentido) que se hibridan, se sintetiza o se adquiere de, por ejemplo, Dharmacon, Inc., y el ARNhp se adquiere de, por ejemplo, Dharmacon, Inc., y se introduce en una célula madre neuronal con un método conocido tal como transfección, microinyección, y electroporación. El ARNhp o ARNpi introducido inhibe la expresión del canal de calcio de tipo N formando RISC en el citoplasma, y provocando la degradación específica de la secuencia del ARNm del gen diana.

(3) Método para introducir ARNpi transcrito *in vitro* usando enzima en la célula

45 Un ARNpi se sintetiza a partir de una secuencia molde combinada con un promotor (T7, T3, SP6) usado en transcripción *in vitro*, usando una ARN polimerasa. Después de que el ARNpi sintetizado se purifica, éste se introduce en la célula madre neuronal con un método conocido tal como transfección, microinyección, y electroporación, a fin de inhibir la función o expresión del canal de calcio de tipo N.

(4) Método para introducir una mezcla de ARNpi producida escindiendo ARNbc con Dicer o ARNasa III en la célula

50 La función o expresión del canal de calcio de tipo N se inhibe introduciendo una mezcla de un fragmento (ARNpi) de un ARNbc de cadena larga escindido con Dicer o ARNasa III en una célula madre neuronal con un método conocido tal como transfección, microinyección, y electroporación. Puesto que se mezclan en el fragmento de ARN a introducir ARNpi correspondientes a las secuencias de bases de diversas porciones del gen diana, se puede potenciar la probabilidad de ser capaces de inactivar el gen diana.

(5) Método para introducir un casete de expresión de ARNpi sintetizado mediante PCR en la célula

La función o expresión del canal de calcio de tipo N se inhibe introduciendo un producto de PCR, compuesto del

promotor de la secuencia – secuencia molde de ARNhp – señal de terminación de la transcripción, en una célula madre neuronal con un método conocido tal como transfección, microinyección, y electroporación.

[6. Cultivo de células madre neuronales]

5 El método para cultivar células madre neuronales no está particularmente limitado en tanto que sea un método de cultivo en el que dichas células puedan sobrevivir, proliferar o diferenciarse en células nerviosas, pero se prefiere el método de las neuroesferas.

10 El método de las neuroesferas, que se puede usar aquí, es uno de los métodos de cultivo selectivo usados generalmente para células madre neuronales. El método de las neuroesferas es un método de cultivar en suspensión células madre neuronales en una condición de temperatura apropiada con un medio libre de suero que comprende EGF y/o bFGF, a fin de permitir la proliferación de células madre neuronales como masas celulares esféricas (neuroesferas).

15 Las células madre neuronales humanas, de forma similar a las células madre neuronales de ratón, se pueden mantener en un medio de cultivo libre de suero que comprende un mitógeno (los representantes son factor proliferativo del epitelio y/o factor proliferativo de fibroblastos básico). Dichas células madre neuronales suspendidas en un medio proliferan y forman agregados celulares conocidos como masas celulares (neuroesferas).

[7. Subcultivo]

20 Las células madre neuronales de la presente invención se pueden pasar mediante un método conocido. El paso se refiere a transferir una porción de células a un nuevo medio y cultivarla como una generación siguiente. El paso de células madre neuronales mediante el método habitual de las neuroesferas tiene alrededor de 3 pasos. Las células madre neuronales obtenidas mediante la presente invención son células madre neuronales que se pueden pasar durante 4 pasos o más, preferiblemente 5 pasos o más, más preferiblemente 6 pasos o más, aún preferiblemente 7 pasos o más, entre otros, preferiblemente 8 pasos o más, particularmente de forma preferible 9 pasos o más, y lo más preferible 10 pasos o más, pero dicho número de pasos no está particularmente limitado en tanto que se retenga el potencial de diferenciación para diferenciarlas en células nerviosas.

25 Además, el sustrato para subcultivar las células madre neuronales no está particularmente limitado en tanto que sea un sustrato que permita el paso normal sin promover la diferenciación/inducción de las células madre neuronales. Dicho sustrato consiste preferiblemente en, por ejemplo, un material cerámico o un vidrio de al menos uno cualquiera de circonia, itria, titanía, alúmina, sílice, hidroxipatita, y  $\beta$ -fosfato tricálcico.

30 Estos materiales cerámicos o vidrio se pueden emplear favorablemente debido a que tienen una elevada bioestabilidad sin promover la diferenciación/inducción de células no diferenciadas.

En el método del subcultivo de las células madre neuronales usadas aquí, las masas celulares de células madre neuronales que proliferaron mientras que aún estaban en un estado no diferenciado se pueden obtener empleando un sustrato de cultivo como se describe anteriormente, y sembrando y cultivando dichas células madre neuronales en al menos una posición en dicho sustrato de cultivo.

35 Además, en dicho método de subcultivo, el subcultivo se puede llevar a cabo dispersando masas celulares cultivadas y obtenidas como antes en células individuales o subpoblaciones de células, y repitiendo el método de cultivo anterior con las células madre neuronales obtenidas. Además, la separación de la masa celular se puede llevar a cabo fácilmente tratando la masa celular con, por ejemplo, papaína o tripsina, o pipeteando la masa celular.

[8. Potencial de diferenciación]

40 El potencial de diferenciación se refiere a la capacidad de una célula para diferenciarse en un tipo celular diferente. El potencial de neurodiferenciación se refiere aquí a la capacidad para diferenciarse en una célula nerviosa. Los ejemplos de una célula que tiene la capacidad para diferenciarse en una célula nerviosa aquí pueden incluir una célula madre neuronal, una célula progenitora neuronal, y similar. Una célula que tiene la capacidad para diferenciarse en una célula nerviosa también comprende una célula madre neuronal, una célula progenitora neuronal, y similar, que se inducen por diferenciación a partir de una célula madre tal como una célula ES o iPS con un método conocido. Además, una célula que tiene la capacidad para diferenciarse en una célula nerviosa también comprende una célula madre neuronal preparada como una célula iNS, una célula progenitora neural que se induce por diferenciación a partir de dicha célula, y similar.

50 La diferenciación a partir de una célula ES en una célula madre neuronal se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un método como sigue.

En primer lugar, las células ES preparadas con el método como antes se cultivan en una condición sin células alimentadoras o LIF. A continuación, dichas células ES cultivadas se suspendieron una vez mediante tratamiento enzimático o separación mecánica, y se separaron en pequeñas masas mediante pipeteo. Además, cultivando posteriormente en una nueva cápsula de cultivo dichas masas pequeñas de células ES separadas, las células ES se

diferencian espontáneamente vía embrioides en células madre neuronales (Roy. S. et al., Mol. Cell. Biol., 18:3947-3955 (1998)).

5 Estos embrioides se pueden obtener cultivando células ES en una cápsula de cultivo no revestida, con un medio de células ES sin LIF, durante alrededor de 7 a 14 días, y observando la aparición de esferas que se forman mediante agregación de células en un microscopio. Estos embrioides también se pueden obtener cultivando en presencia de vitamina B12 según sea necesario y heparina o una sustancia con acción similar a heparina (Republicación de la Solicitud de Patente Examinada Publicada 2006-004149).

10 Por ejemplo, como células ES, también se pueden emplear aquellas preparadas mediante un método conocido por aquellos expertos en la técnica (Doetschman TC, et al. J Embryol Exp Morphol, 1985, 87, 27-45, Williams RL et al., Nature, 1988, 336, 684-687).

Una célula madre neuronal diferenciada a partir de una célula madre tal como una célula iPS se puede obtener con un método similar a dicho método para diferenciar una célula ES en una célula madre neuronal.

Como células madre neuronales preparadas como células iNS, también se pueden emplear aquellas preparadas mediante un método conocido (Stem Cells. 2012 Jun; 30(6):1109-1119).

15 [9. Diferenciación de célula madre neuronal en célula nerviosa]

20 La célula madre neuronal de la presente invención se puede diferenciar en una célula nerviosa mediante un método conocido. Específicamente, las células madre neuronales de la presente invención se cultivan, por ejemplo, en un medio tal como medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes medio Ham F-12, con adición de un factor de crecimiento, etc., tal como EGF y FGF, según sea necesario. Las células madre neuronales de la presente invención se cultivan preferiblemente en forma de neuroesferas. Las células madre neuronales de la presente invención se cultivan mientras intercambian alrededor de la mitad del medio alrededor de varias veces a la semana, según sea necesario.

25 Las neuroesferas se dispersan en células individuales con una enzima tal como NeuroCult después de 5 a 100 pasos, preferiblemente 10 a 70 pasos, y preferiblemente aún 30 a 50 pasos. A continuación, las células madre neuronales dispersas en células individuales se siembran a una densidad celular de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$ , preferiblemente  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  en un Cellware. Las células sembradas se cultivan en un medio sin un factor proliferativo, en una condición de temperatura apropiada en presencia de unos pocos % de dióxido de carbono, según sea necesario, durante varias semanas para permitir que se diferencien en células nerviosas.

30 Además, las células madre neuronales de la presente invención también son inducidas por diferenciación sembrándolas en una cápsula de cultivo de múltiples electrodos revestida previamente con, por ejemplo, poli-D-lisina, y cultivándolas en una condición de temperatura apropiada en presencia de unos pocos % de dióxido de carbono, según sea necesario, durante varias semanas. Durante la etapa de diferenciación, dichas células madre neuronales se mantienen en un medio sin un factor proliferativo.

35 Las células madre neuronales de la presente invención se pueden diferenciar en células nerviosas mediante las etapas anteriores. La mitad del medio se puede intercambiar alrededor de varias veces por semana según sea necesario.

[10. Condición de cultivo]

La condición de temperatura del cultivo celular de la presente invención es 20°C a 40°C, preferiblemente 33 a 39°C, y todavía preferiblemente 36 a 38°C, y lo más preferible 37°C.

40 Otras condiciones de cultivo no están particularmente limitadas en tanto que sea una condición que permita que las células se puedan hacer crecer apropiadamente. Las células se pueden cultivar en un estado suspendido (estado de neuroesferas) o se pueden cultivar adheridas a la vasija de cultivo.

[11. Evaluación de los agentes]

45 La evaluación de los agentes que emplean las células madre neuronales de la presente invención se puede realizar, por ejemplo, añadiendo un agente a células madre neuronales o a células nerviosas diferenciadas a partir de células madre neuronales, e investigando el cambio en el potencial de acción de dichas células antes y después de añadir el agente, o el cambio morfológico de las células.

Específicamente, la evaluación se puede llevar a cabo mediante el método ejemplificado más abajo.

50 Dichas células nerviosas en una cápsula de cultivo de electrodos se dejan reposar en una incubadora en una condición de temperatura apropiada durante la medida del potencial de acción. El potencial de campo eléctrico que apareció en las sondas en 64 localizaciones se registran todos ellos con un dispositivo de medida tal como un sistema de registro de múltiples canales a una velocidad de muestreo de varios kHz a varias decenas, y al mismo tiempo se filtran con varias decenas a centenares de filtro de banda de paso de Hz. Se midió para cada experimento

el umbral del valor base del potencial eléctrico mediante actividad espontánea de los neutrones, y el cambio en la frecuencia promedio se puede registrar tras añadir el agente que va a ser el sujeto de evaluación.

5 Dicho umbral del valor base se puede ajustar según el agente, y por ejemplo se puede ajustar a  $\pm 0,001$  a  $0,020$  V en un experimento de activación de 4-aminopiridina (4-AP), y a  $-0,001$  a  $0,010$  mV en un experimento de supresión de tetrodotoxina (TTX). La frecuencia (Hz) de aplicación que excede el umbral se puede promediar, según sea necesario. La actividad del valor base y la actividad tras la estimulación se midieron cada una durante varios centenares de segundos para el experimento de activación de cada agente.

10 La medida del potencial de acción de las células también se puede llevar a cabo fijando las células madre neuronales de la presente invención con un manipulador o un micromanipulador, etc., insertando directamente una pipeta de inyección, etc., en dichas células madre neuronales o células nerviosas diferenciadas a partir de dichas células madre neuronales, y midiendo el potencial eléctrico intracelular.

15 La evaluación de un agente (por ejemplo, la influencia del agente sobre las células madre neuronales o células nerviosas (independientemente del efecto principal o efecto secundario)) se puede llevar a cabo sin administrar directamente dicho agente a un ser humano investigando el potencial de acción de las células madre neuronales de la presente invención o células nerviosas diferenciadas a partir de dichas células madre neuronales antes y después de la adición del agente.

#### [12. Medicina regenerativa]

20 Los seres humanos sufren a menudo un estado deficiente, disfunción, o disfunción de células, tejidos, y órganos, etc., del cuerpo debido a accidentes o enfermedades, etc. La medicina regenerativa es un cuidado médico para reconstruir la función de dichas células, tejidos, y órganos, etc., transplantando células, tejidos, y órganos, etc., al cuerpo a fin de regenerar la función perdida de células, tejidos, y órganos, etc.

25 Las células madre neuronales de la presente invención se pueden proliferar apropiadamente según sea necesario, y además se pueden cultivar de manera que se diferencian en células nerviosas. Por esta razón, las células madre rurales de la presente invención se pueden convertir en un material de medicina regenerativa para enfermedades neurológicas, incluyendo daño de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, y similares. En otras palabras, la presente invención puede proporcionar una célula madre neuronal para medicina regenerativa, y una célula nerviosa diferenciada a partir de dicha célula madre neuronal.

#### Ejemplos

30 La presente invención se describirá ahora específicamente mediante los Ejemplos a continuación, pero la presente invención no está limitada de ninguna manera por estos Ejemplos.

#### **[Ejemplo 1] Establecimiento de células madre neuronales derivadas de ratón genosuprimido del canal de calcio de tipo N (deficiente en NVDCC), y análisis de la capacidad de proliferación y del potencial de diferenciación en células nerviosas**

1. Establecimiento de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDCC

35 La preparación de células madre neuronales se llevó a cabo mediante el siguiente método.

En primer lugar, el tejido circundante del ventrículo lateral de ratones deficientes en NVDCC machos de 10 semanas (C57BL6N) se extirpó por medios convencionales. Los tejidos celulares extirpados se dispusieron entonces con Neural Tissue Dissociation Kit (papaína), y se separaron en células madre rurales con microperlas de anti-prominina-1 (nº de Catálogo 130-092-752, de Miltenyi Biotec GmbH).

40 Las células obtenidas como antes se suspendieron en medio D-MEM/F-12 de Ham (1:1) (nº de Catálogo 11039-021, de Invitrogen Corporation) que comprende  $\times 1$  B-27™ Supplement (nº de Catálogo 12587010, de GIBCO Inc.),  $\times 1$  N2-Supplement (nº de Catálogo 17502-048, de Invitrogen Corporation), y  $\times 1$  de disolución mixta de penicilina-estreptomomicina (nº de Catálogo P4333, de Sigma-Aldrich Corporation), se sembraron en un matraz de  $25 \text{ cm}^2$  (nº de Catálogo 3103-025X, de IWAKI), y se añadieron FGF (factor de crecimiento de fibroblastos)-b (nº de Catálogo 450-33, de peprotech) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) (nº de Catálogo PGM8045, de Invitrogen Corporation) a concentraciones finales de  $25 \text{ ng/ml}$ .

45 El día de inicio del cultivo se estableció como día 0, se añadieron FGF-b y EGF en incrementos en los días 3 y 6, las neuroesferas se recogieron/dispersaron en los días 9 a 10, se sembraron en las condiciones medioambientales similares a lo anterior, y esto se empleó como el paso. Obsérvese que cuando se lleva a cabo el paso, se empleó un medio del medio empleado para el cultivo antes de dicho paso, y el medio recientemente empleado se mezcló a una relación 1:1.

Además, como experimento de control, las células madre neuronales se prepararon/pasaron desde el tejido circundante del ventrículo lateral de un ratón de tipo salvaje (WT) macho de 10 semanas (C57BL6N) con un método similar.

Como se usa aquí, las células madre neuronales en el momento de la adquisición a partir de un tejido se denominan como células madre neuronales del paso 0. En otras palabras, las células madre neuronales adquiridas a partir de un tejido que se pasaron una vez se denominan como células madre neuronales después del 1<sup>er</sup> paso.

5 2. Observación de formación de esferas y de la capacidad de proliferación de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC

La capacidad formadora de esferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC y de células madre neuronales derivadas de ratón WT después del 1<sup>er</sup> paso fue 28 esferas/ratón y 6,2 esferas/ratón, respectivamente (valor promedio de tres ensayos). En otras palabras, las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC mostraron un valor mayor que las células madre neuronales derivadas de ratón WT.

10 Además, en la Figura 1 se muestran las imágenes (fotografías) de neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC y de células madre neuronales derivadas de ratón WT en el día 9 después del 3<sup>er</sup> paso, así como el histograma de los resultados de medida del diámetro de cada neuroesfera.

15 Las neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC mostraron un aspecto grande y sano en comparación con las neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón WT. Al encontrarse, después, después del 4<sup>o</sup> paso, las células madre neuronales derivadas de ratón WT no formaron neuroesferas ni proliferaron, y condujeron a la muerte celular. Por otro lado, las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC pudieron formar después neuroesferas, y fueron capaces de repetir el paso con una buena capacidad de proliferación. De hecho, esta capacidad de proliferación se estabilizó después de cada paso, conduciendo a la formación de esferas masivas hacia el 5<sup>o</sup> paso. En la Figura 2 se muestra la imagen (fotografía) de neuroesferas masivas.

20 3. Potencial de diferenciación de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC en células nerviosas

25 En general, se sabe que las células madre neuronales, con paso repetido, (1) disminuyen su capacidad de autopropagación, así como (2) pierden su potencial de diferenciación en células nerviosas y tienden a diferenciarse en gliocitos. Sin embargo, las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC podrían repetir el paso (1) sin disminuir su capacidad de autopropagación, y (2) sin perder su potencial de diferenciación en células nerviosas.

30 Por ejemplo, las neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC, tras el 15<sup>o</sup> paso, son positivas para nestina (proteína del filamento intermedio de clase VI), que es un marcador de células madre neuronales multipotente. Esto significa que dichas células madre neuronales retienen la multipotencia incluso después del 15<sup>o</sup> paso.

35 Cuando se llevaron a cabo 5 días de inducción de la diferenciación en dichas células madre neuronales con 10 ng/ml de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)-AA, se pudo confirmar la diferenciación en (1) células nerviosas positivas para Tuj1 ( $\beta$ -tubulina de clase III), (2) astrocitos positivos para GFAP (proteína ácida fibrilar glial), y (3) oligodendrocitos positivos para O4 (antígeno de sulfátido) (Figura 3).

40 Además, cuando se llevaron a cabo 5 días de inducción de la diferenciación en dichas células madre neuronales con 100 ng/ml de ATRA (ácido todo trans-retinoico), también se confirmó que la mayoría de las células se diferenciaron en células nerviosas positivas para MAP2 (proteína 2 asociada a los microtúbulos), y la diferenciación terminal en diversos tipos de células nerviosas (tales como células nerviosas positivas para ácido glutámico, células nerviosas positivas para GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), células nerviosas positivas para TH (tirosina hidroxilasa: marcador neuronal que contiene dopamina), etc.) (Figura 3).

45 Además, el incremento en el número de pasos de las células madre neuronales no condujo a (1) una disminución en la capacidad de autopropagación, y (2) pérdida de su potencial de diferenciación en células nerviosas. Antes al contrario aumentó, el potencial de diferenciación en células nerviosas y se redujo la capacidad de producción de glías, en respuesta a la estimulación de la inducción de la diferenciación. Los resultados se muestran en la Figura 4. En la Figura 4, las células positivas para Tuj-1 indican células nerviosas, y las células positivas para GFAP indican gliocitos. Además, Hoechst tiñe el núcleo de las células.

50 En consecuencia, las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC tienen una capacidad de paso incrementada, comparable a la capacidad de paso ilimitada, y permiten el suministro de una gran cantidad de células nerviosas de cultivo primario.

**[Ejemplo 2] Capacidad de proliferación de células madre neuronales derivadas de ratón WT a las que se les aplicó inhibidor específico del canal de calcio de tipo N (NVDC), y análisis del potencial de diferenciación en células nerviosas**

1. Preparación y paso de células madre neuronales derivadas de ratón WT

## ES 2 666 970 T3

La preparación de células madre neuronales se llevó a cabo mediante el siguiente método.

En primer lugar, se extirpó por medios convencionales el cerebro anterior de ratones de 8 días neonatos (C57BL6N, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Los tejidos celulares extirpados se separaron entonces en células con Neural Tissue Dissociation Kit (#130-092-628, de Miltenyi Biotec GmbH).

- 5 Las células obtenidas como antes se suspendieron en medio D-MEM/F-12 de Ham (1:1) (nº de Catálogo 11039-021, de Invitrogen Corporation) que comprende cada uno de (1) ×1 B-27™ Supplement (nº de Catálogo 12587010, de GIBCO Inc.), (2) ×1 N2-Supplement (nº de Catálogo 17502-048, de invitrogen Corporation), y (3) ×1 de disolución mixta de penicilina-estreptomina (nº de Catálogo P4333, de Sigma-Aldrich Corporation), y se prepararon hasta  $7 \times 10^5$  células/ml.
- 10 Subsiguientemente, 10 ml de la suspensión celular preparada como antes se sembraron en cada uno de múltiples matraces de 25 cm<sup>2</sup>. Se añadieron adicionalmente FGF-b (nº de Catálogo 450-33, de Peprotech) y EGF (nº de Catálogo 315-09, de Peprotech), cada uno a una concentración final de 25 ng/ml.

Las suspensiones celulares sembradas en los matraces anteriores se dividieron en dos grupos.

- 15 En el "primer grupo", se añadió  $\omega$ -conotoxina GVIA (nº de Catálogo 4161-v, de PEPTIDE), a una concentración final de 1  $\mu$ M en presencia de 15 mM de KCl, y la mitad del medio se intercambió cada 3 a 4 días. En el día 14, las neuroesferas se recogieron/suspendieron, se prepararon hasta  $4 \times 10^4$  células/ml, se sembraron en una placa de 24 pocillos a 500  $\mu$ l, y esto se empleó como el paso. Obsérvese que cuando se realiza el paso, se empleó un medio del medio de cultivo celular previo al paso y el medio nuevo, mezclados a 1:1.
- 20 En el "segundo grupo", el cultivo y el paso se llevó a cabo en las mismas condiciones como el primer grupo, excepto que el cultivo se realizó sin añadir KCl ni  $\omega$ -conotoxina GVIA.

2. Observación de formación de esferas y capacidad de proliferación de células madre neuronales derivadas de ratón WT a las que se les aplicó inhibidor específico de NVDCC

- 25 Las células madre neuronales derivadas de ratón WT cultivadas sin añadir  $\omega$ -conotoxina GVIA (es decir, el segundo grupo), después del 5º paso, no formaron ni neuroesferas ni proliferaron, y condujeron a la muerte celular. Por otro lado, las células madre neuronales derivadas de ratón WT con adición continua de  $\omega$ -conotoxina GVIA (es decir, el primer grupo) pudieron continuar formando neuroesferas mientras proliferan, incluso después del 15º paso. En la Figura 5 se muestran las imágenes (fotografías) de neuroesferas y el estado de proliferación en este experimento.

3. Potencial de diferenciación en células nerviosas de células madre neuronales derivadas de ratón WT a las que se les aplicó inhibidor específico de NVDCC

- 30 Neuroesferas de células madre neuronales derivadas de ratón WT, después del 15º paso llevado a cabo por adición continua de  $\omega$ -conotoxina GVIA en presencia de 15 mM de KCl, se sembraron en un portaobjetos de vidrio recubierto con poli-L-ornitina (nº de Catálogo P3655, de sigma corporation) y laminina (nº de Catálogo 23017-015, de invitrogen Corporation), y se indujo la proliferación en un medio en el que tanto EGF como FGF-b están ausentes, a 37°C durante 3 días.
- 35 Las células cultivadas se fijaron con 4% de PFA/PBS a 4°C durante 20 minutos, y se lavaron dos veces con PBS a 4°C durante 10 minutos. Después, dichas células se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100/PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos. Dichas células permeabilizadas se sometieron entonces a 20 minutos de bloqueo con Block Ace (de DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) a temperatura ambiente. Subsiguientemente, dichas células bloqueadas se hicieron reaccionar con una disolución que comprende un anticuerpo primario (10% de Block Ace, 0,1% de Triton X-100/PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces continuaron reaccionando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, esto se lavó tres veces con 0,1% de Triton X-100/PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se hizo reaccionar con una disolución que comprende un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (de Jackson; el número del producto del anticuerpo secundario para el anticuerpo primario Tuj-1 es 715-096-151, y el número del producto del anticuerpo secundario para el anticuerpo primario GFAP es 711-166-152) (10  $\mu$ g/ml de anticuerpo secundario, 10% de Block Ace, 0,1% de Triton X-100/PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto se lavó entonces con PBS a temperatura ambiente, se montó por medios convencionales, y se observó.

Como anticuerpos primarios, se usaron los siguientes.

- Tuj-1: adquirido de Covance (nº de Catálogo: COVANCE#MMS435P)
- 50 GFAP: adquirido de DAKO (nº de Catálogo: DAKO#Z0334)

Como resultado, se pudo confirmar la diferenciación en células nerviosas positivas para Tuj-1 ( $\beta$ -tubulina de clase III) y astrocitos positivos para GFAP (proteína ácida fibrilar de glía) (Figura 6).

En consecuencia, se mostró que, de forma similar a las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC, es posible pasar durante un tiempo largo células madre neuronales de tipo salvaje inhibiendo el canal de calcio de tipo N (NVDC) con un inhibidor. También se mostró que las células madre neuronales que se pasaron mediante este método, de forma similar a las células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC, continúan reteniendo el potencial de diferenciación en células nerviosas.

En otras palabras, el paso próximo al cultivo ilimitado de células madre neuronales se puede llevar a cabo inhibiendo el canal de calcio de tipo N (NVDC) con un inhibidor (Ejemplo 2), o suprimiendo genéticamente el gen del canal de calcio de tipo N (Ejemplo 1), y se permite el suministro de una gran cantidad de células nerviosas de cultivo primario.

**[Ejemplo 3] Análisis de la capacidad de proliferación de células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se aplicó un inhibidor específico de NVDC**

Las células progenitoras neuronales humanas no modificadas genéticamente (NHNP) (el número de pasos 1: registrado en el momento de la adquisición) se adquirieron de Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD).

Dichas células congeladas con nitrógeno líquido se descongelaron a 37°C por medios convencionales, y se sembraron en una cápsula de baja unión a células (90 mm de diámetro, Nunc) suplementada con 14 ml de medio Bullet Kit™. Al día siguiente, las neuroesferas formadas a partir de NHNP se recogieron mediante centrifugación (120 x g, 5 minutos).

Las células se dividieron subsiguientemente en dos grupos. El "primer grupo" se cultivo en medio Bullet Kit™ que comprende 100 nM de  $\omega$ -conotoxina GVIA esterilizada con filtro ( $\omega$ -CTX, Peptide Institute Inc., Osaka, Japón). El "segundo grupo" se cultivó con medio Bullet Kit™ sin co-conotoxina GVIA. Para cada grupo, el medio se intercambiaba 3 veces a la semana. Además, para cada grupo, las células se pasaron una vez cada 7 a 10 días.

Las neuroesferas formadas a partir de las células que proliferaron se recogieron mediante centrifugación (120 x g, 5 minutos). Las neuroesferas se dispersaron tratando con Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) a 37°C durante 10 minutos (es decir, se suspendieron como monocélulas). Esto se centrifugó a 310 x g durante 5 minutos, y los peletes obtenidos se suspendieron en cada medio.

La mayoría de NHNP formaron neuroesferas grandes en la etapa temprana de cultivo (es decir, la etapa antes de dividir las células en dos grupos).

Sin embargo, en la etapa después de la división de las células en dos grupos, en el "segundo grupo" (es decir, el grupo cultivado en un medio sin  $\omega$ -CTX), las células obtenidas dispersando las neuroesferas no pudieron formar neuroesferas en un medio normal, y la supervivencia se detuvo después del 2º paso. Por el contrario, en el "primer grupo" (es decir, el grupo cultivado en un medio que comprende  $\omega$ -CTX), las células obtenidas dispersando las neuroesferas mantuvieron la capacidad para formar repetidamente neuroesferas, incluso después del 6º paso (Figura 7). A partir de este resultado, se observa que la capacidad de paso de las células progenitoras neuronales humanas se incrementa al inhibir el canal de calcio de tipo N (NVDC) con  $\omega$ -CTX.

**[Ejemplo 4] Actividad glutamatérgica y actividad colinérgica de células nerviosas diferenciadas a partir de células madre neuronales derivadas del ventrículo lateral de ratón deficiente en NVDC**

Células madre neuronales derivadas del ventrículo lateral de ratón deficiente en NVDC se mantuvieron en cultivo en forma neuroesférica en medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes medio de Ham F-12 (Sigma-Aldrich) que comprende (1) 1% de N2 supplement (Invitrogen), (2) 2% de B-27 supplement (Invitrogen), (3) 25 ng/ml de FGF básico de ratón (PeproTech Inc.), y (4) 25 ng/ml de factor proliferativo de epitelio de ratón (Invitrogen).

La mitad de la cantidad del medio se intercambiaba dos veces a la semana. Las neuroesferas se pasaron a lo largo de 30 a 40 generaciones, y entonces se dispersaron en monocélulas con NeuroCult (Stemcell Technologies).

Las células dispuestas en monocélulas obtenidas como tales se sembraron en un 96 BIOCOAT poli-D-lisina negro/limpio cellware (Becton Dickinson) a densidades celulares de  $2 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ , y  $6 \times 10^5$  células/200  $\mu$ l/pocillo (que corresponden a "2e4," "6e4," "2e5," y "6e5" en la Figura 8, respectivamente) o  $6 \times 10^4$  células/200  $\mu$ l/pocillo (Figura 9).

Las células sembradas se diferenciaron subsiguientemente en un medio sin un factor proliferativo a 37°C en una condición de 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 semanas.

A las células diferenciadas se añadió Calcium 5 dye (Molecular Devices) a 37°C durante 1 hora, y la actividad del canal iónico se midió con un lector de placas Hamamatsu FDSS 6000 y un sistema de manipulación de líquidos.

La intensidad de la fluorescencia del fondo (longitud de onda de excitación: 480 nm, longitud de onda de emisión: 540 nm) se monitorizó en primer lugar durante 12 segundos, entonces se añadieron de una sola vez a 20  $\mu$ l/pocillo una disolución de ligando (AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico), de Tocris Bioscience),

acetilcolina (de Sigma-Aldrich Corporation), muscarina (de Sigma-Aldrich Corporation), y nicotina (de Sigma-Aldrich Corporation)), y los receptores mostrados en las Figuras 8 y 9 (receptor del ácido glutámico, receptor muscarínico, y receptor de acetilcolina que comprende el receptor nicotínico) se activaron. Bajo esta condición, la reacción de fluorescencia se capturó a intervalos de 0.3 segundos durante 93 segundos.

- 5 El dato se analizó, y se normalizó frente a la velocidad máxima de reacción para cada compuesto (CTL%). La curva de respuesta a la dosis sigmoidal se calculó con el software Prism (MDF Co., Ltd.) (Figuras 8 y 9). La dosis del compuesto usado es como se muestra en las figuras.

10 Las células nerviosas derivadas de células madre neuronales derivadas del ventrículo lateral de ratón deficiente en NVDC (neuronas diferenciadas) reaccionaron con AMPA de una manera dependiente de la dosis y del número de células (Figura 8). La EC50 de cada una de las condiciones de  $2 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ , y  $6 \times 10^5$  células/pocillo fueron 113  $\mu\text{M}$ , 6,5  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$ , y 5,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Dichas células también reaccionaron con acetilcolina de forma dependiente de la concentración. Dichas células también reaccionaron con muscarina y nicotina (Figura 9).

15 En otras palabras, se mostró que las células nerviosas obtenidas diferenciando las células madre neuronales de la presente invención tienen propiedades similares a las células nerviosas normales con respecto a la respuesta a un neurotransmisor.

**[Ejemplo 5] Análisis electrofisiológico de células nerviosas producidas a partir de células madre neuronales derivadas de ratón deficiente en NVDC**

20 Células madre neuronales derivadas del hipocampo de ratón deficiente en NVDC se sembraron en una cápsula de múltiples electrodos (MED-P210A, Alpha MED Scientific Inc.) revestida previamente con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich), y se diferenciaron a 37°C en una condición de 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 semanas.

Durante la etapa de diferenciación, dichas células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes medio de Ham F-12 (Sigma-Aldrich) (sin factor proliferativo) que comprende (1) N2 supplement (Invitrogen) y (2) B-27 supplement (Invitrogen), y la mitad de la cantidad del medio se intercambió dos veces a la semana.

25 Durante el ensayo electrofisiológico, las células diferenciadas (neuronas diferenciadas) en la sonda MED se dejaron reposar en una pequeña incubadora (37°C). El potencial de campo eléctrico que apareció en las sondas en 64 localizaciones se registraron todos ellos con un sistema de registro de múltiples canales (sistema MED64; Alpha MED Science) a una velocidad de muestreo de 20 kHz, y al mismo tiempo se filtraron con un filtro de paso de banda de 100 Hz. El umbral del valor inicial del potencial eléctrico mediante actividad espontánea de las neuronas se midió para cada experimento, y el cambio en la frecuencia promedio se registró tras añadir 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP) (Figura 10) o 100 nM de tetratoxina (TTX) (Figura 11).

35 El umbral se ajustó a  $\pm 0,007$  mV para el experimento de activación de 4-AP, y a  $-0,015$  a  $0,005$  mV para el experimento de supresión de TTX. La frecuencia de adición (Hz) que excede el umbral se promedió. Para el experimento de activación de 4-AP, la actividad del valor inicial y la actividad tras la estimulación se midieron durante 210 segundos y 490 segundos, respectivamente. Para el experimento de supresión de TTX, tanto la actividad del valor inicial como la actividad tras la estimulación se midieron durante 180 segundos. En las Figuras 10 y 11 se muestran los valores promedio y las barras de error estándar.

40 Se observó potencial de actividad espontánea cuando se indujo a las células madre neuronales derivadas del hipocampo de ratón deficiente en NVDC a diferenciarse durante 6 semanas. El cuerpo celular de las neuronas diferenciadas debe estar en contacto con la sonda del electrodo a fin de registrar el potencial de actividad de la neurona. 56 sondas (experimento de activación de 4-AP) y 15 sondas (experimento de supresión de TTX), de las 64 sondas, registraron potencial de actividad de reacción (Figura 10). A partir de este resultado, se confirmó que los cuerpos celulares neuronales estaban en contacto con la sonda del electrodo, y la medida del potencial de acción se llevó a cabo normalmente en este experimento.

45 Además, el potencial de actividad de las neuronas diferenciadas aumentó significativamente por 4-AP (Figura 10), y se suprimió por TTX (Figura 11). A partir de este resultado, se observó que la evaluación de agentes se puede llevar a cabo electrofisiológicamente empleando células nerviosas diferenciadas a partir de las células madre neuronales de la presente invención.

**[Ejemplo 6] Análisis del potencial de diferenciación de células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó un inhibidor específico de NVDC**

50 1. Preparación y paso de células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó inhibidor específico de NVDC

Las células progenitoras neuronales humanas no modificadas genéticamente (NHNP) (el número de pasos 1: registrado en el momento de la compra) se adquirieron de Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD).

Dichas células congeladas con nitrógeno líquido se descongelaron a 37°C por medios convencionales, y se sembraron en una placa de baja unión a células (60 mm de diámetro, Nunc) suplementada con 14 ml de medio NPMM Bullet Kit™ (Lonza, nº de Catálogo CC3209). Al día siguiente, las neuroesferas formadas a partir de NHNP se recogieron mediante centrifugación (90 x g, 3 minutos).

5 Las células se dividieron subsiguientemente en dos grupos. El “primer grupo” se cultivó con medio NPMM Bullet Kit™ que comprende 1 µM de ω-conotoxina GVIA esterilizada mediante filtro (ω-CTX, Peptide Institute Inc., Osaka, Japón). El “segundo grupo” se cultivó con medio Bullet Kit™ sin ω-conotoxina GVIA. Para cada grupo, el medio se intercambiaba 3 veces a la semana. Además, para cada grupo, las células se pasaron una vez cada 4 a 7 días.

10 Las neuroesferas formadas a partir de las células que proliferaron se recogieron mediante centrifugación (90 x g, 3 minutos). Las neuroesferas se dispersaron tratándolas con Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) a temperatura ambiente durante 5 minutos (es decir, se suspendieron como monocélulas). Esto se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos, y los peletes obtenidos se suspendieron en cada medio.

La mayoría de NHNP formó neuroesferas grandes en la etapa temprana de cultivo (es decir, la etapa antes de dividir las células en dos grupos).

15 Sin embargo, en la etapa después de la división de la célula en dos grupos, en el “segundo grupo” (es decir, el grupo cultivado en un medio sin ω-CTX), las células obtenidas dispersando las neuroesferas no pudieron formar neuroesferas grandes en un medio normal, y la proliferación se redujo gradualmente. Por el contrario, en el “primer grupo” (es decir, el grupo cultivado en un medio que comprende ω-CTX), las células obtenidas dispersando las neuroesferas mantuvieron la capacidad para formar repetidamente neuroesferas, incluso después del 20º paso. En la Figura 12 se muestra el aspecto de la formación de las neuroesferas en el 8º paso para el primer grupo.

20 2. Potencial de diferenciación en células nerviosas de células progenitoras neuronales derivadas de ser humano a las que se les aplicó inhibidor específico de NVDCC

25 Neuroesferas de células progenitoras neuronales derivadas de ser humano después del 8º paso cultivadas en presencia de ω-conotoxina GVIA se sembraron en un portaobjetos de vidrio revestido con poli-L-ornitina (nº de Catálogo P3655, de sigma corporation) y laminina (nº de Catálogo 23017-015, de invitrogen Corporation), y se indujo la diferenciación en un medio en el que tanto EGF como FGF-b estaban ausentes, a 37°C durante 3 días.

30 Las células cultivadas se fijaron con 4% de PFA/PBS a 4°C durante 20 minutos, y se lavaron dos veces con PBS a 4°C durante 10 minutos. Después, dichas células se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100/PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos. Dichas células permeabilizadas se sometieron entonces a 20 minutos de bloqueo con Block Ace (de DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) a temperatura ambiente. Subsiguientemente, dichas células bloqueadas se hicieron reaccionar con una disolución que comprende un anticuerpo primario (10% de Block Ace, 0,1% de Triton X-100/PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces continuaron reaccionando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, esto se lavó tres veces con 0,1% de Triton X-100/PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se hizo reaccionar con una disolución que comprende un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (de Jackson: el número del producto del anticuerpo secundario para el anticuerpo primario Tuj-1 es 715-096-151, y el número del producto del anticuerpo secundario para el anticuerpo primario GFAP es 711-166-152) (10 µg/ml de anticuerpo secundario, 10% de Block Ace, 0,1% de Triton X-100/PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto se lavó entonces con PBS a temperatura ambiente, se montó por medios convencionales, y se observó.

40 Como anticuerpos primarios, se usaron los siguientes.

Tuj-1: adquirido de Covance (nº de Catálogo: COVANCE#MMS435P)

GFAP: adquirido de DAKO (nº de Catálogo: DAKO#Z0334)

45 Como resultado, se pudo confirmar que muchas células se diferencian en células nerviosas positivas para Tuj-1 (β-tubulina de clase III), y algunas células se diferencian en astrocitos positivos para GFAP (proteína ácida fibrilar de glía) (Figura 13).

En consecuencia, se mostró que, de forma similar a las células madre neuronales derivadas de ratón, es posible pasar células progenitoras neuronales humanas durante un tiempo prolongado a la vez que retienen el potencial de diferenciación en una célula nerviosa inhibiendo el canal de calcio de tipo N (NVDCC) con un inhibidor.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> CÉLULAS MADRE NEURONALES CON AGILIDAD DE PASO INCREMENTADA, UN MÉTODO PARA PRODUCIR DICHA CÉLULA MADRE NEURONAL CON AGILIDAD DE PASO INCREMENTADA, Y UN MÉTODO PARA CULTIVAR CÉLULAS MADRE NEURONALES PARA INCREMENTAR LA AGILIDAD DE PASO DE LAS

CÉLULAS MADRE NEURONALES

<130> ESAP1201F

<150> JP2012-241366

<151> 2012/10/31

5 <160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9805

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcggcggcgg ctgcggcgggt ggggccgggc gaggtccgct gcggtcccgg cggctccgtg      60
gctgtcccgc tctgagcgcc tggcgcgccc cgcgccctcc ctgccggggc cgctgggccc      120
gggatgcacg cggggcccgg gagccatggt ccgcttcggg gacgagctgg gcggccgcta      180
tgggggcccc ggcggcggag agcgggcccg gggcggcggg gccggcgggg cggggggccc      240
gggtcccggg gggctgcagc ccggccagcg ggtcctctac aagcaatcga tcgcgcagcg      300
cgcgcggacc atggcgctgt acaaccccat cccggtcaag cagaactgct tcaccgtcaa      360
ccgctcgctc ttcgtcttca gcgaggacaa cgtcgtccgc aaatacgcga agcgcacac      420
cgagtggcct ccattcgagt atatgatcct ggccaccatc atcgccaact gcatcgtgct      480
ggccctggag cagcacctcc ctgatgggga caaaacgccc atgtccgagc ggctggacga      540
cacggagccc tatttcatcg ggatcttttg cttcgaggca gggatcaaaa tcatcgctct      600
gggctttgtc ttccacaagg gctcttacct gcggaacggc tggaacgtca tggacttcgt      660
ggtcgtcctc acagggatcc ttgccacggc tggaactgac ttcgacctgc gaactactgag      720
ggctgtgcgt gtgctgaggc ccctgaagct ggtgtctggg attccaagtt tgcaggtggt      780
gctcaagtcc atcatgaagg ccatggttcc actcctgcag attgggctgc ttctcttctt      840
tgccatcctc atgtttgccca tcattggcct ggagttctac atgggcaagt tccacaaggc      900
ctgtttcccc aacagcacag atgcggagcc cgtgggtgac ttcccctgtg gcaaggaggc      960
cccagcccgg ctgtgcgagg gcgacactga gtgccgggag tactggccag gacccaactt     1020
tggcatcacc aactttgaca atatcctggt tgccatcttg acggtgttcc agtgcacac      1080
catggagggc tggactgaca tcctctataa taaaaacgat gcggccggca acacctggaa     1140
ctggtctctc ttcacccctc tcatcatcat cggctccttc ttcattgctca acctggtgct     1200

```

ES 2 666 970 T3

gggcgtgctc	tcgggggagt	ttgccaagga	gcgagagagg	gtggagaacc	gccgcgcctt	1260
cctgaagctg	cgccggcagc	agcagatcga	gcgagagctc	aacgggtacc	tggagtggat	1320
cttcaaggcg	gaggaagtca	tgctggccga	ggaggacagg	aatgcagagg	agaagtcccc	1380
tttgacgtg	ctgaagagag	cggccaccaa	gaagagcaga	aatgacctga	tccacgcaga	1440
ggaggagag	gaccggtttg	cagatctctg	tgctgttggg	tcccccttcg	cccgcgccag	1500
cctcaagagc	gggaagacag	agagctcgtc	atacttccgg	aggaaggaga	agatgttccg	1560
gtttttatc	cggcgcatgg	tgaaggctca	gagcttctac	tgggtggtgc	tgtgcgtggt	1620
ggccctgaac	acactgtgtg	tggccatggt	gcattacaac	cagccgcggc	ggcttaccac	1680
gaccctgtat	tttgcagagt	ttgttttctt	gggtctcttc	ctcacagaga	tgtccctgaa	1740
gatgtatggc	ctggggccca	gaagctactt	ccggtcctcc	ttcaactgct	tcgactttgg	1800
ggtcatcgtg	gggagcgtct	ttgaagtggg	ctgggcggcc	atcaagccgg	gaagctcctt	1860
tgggatcagt	gtgctgcggg	ccctccgcct	gctgaggatc	ttcaaagtca	cgaagtactg	1920
gagctccctg	cggaacctgg	tggtgtccct	gctgaactcc	atgaagtcca	tcatcagcct	1980
gctcttcttg	ctcttctgtg	tcattgtggt	cttcgccctg	ctggggatgc	agctgtttgg	2040
gggacagttc	aacttccagg	atgagactcc	cacaaccaac	ttcgacacct	tccctgccgc	2100
catcctcact	gtcttccaga	tcctgacggg	agaggactgg	aatgcagtga	tgtatcacgg	2160
gatcgaatcg	caaggcggcg	tcagcaaagg	catgttctcg	tccttttact	tcattgtcct	2220
gacactgttc	ggaaactaca	ctctgctgaa	tgtctttctg	gccatcgctg	tggacaacct	2280
ggccaacgcc	caagagctga	ccaaggatga	agaggagatg	gaagaagcag	ccaatcagaa	2340
gcttgctctg	caaaaggcca	aagaagtggc	tgaagtcagc	cccatgtctg	ccgcgaacat	2400
ctccatgcc	gccaggcagc	agaactcggc	caaggcggcg	tcggtgtggg	agcagcgggc	2460
cagccagcta	cggtgcgaga	acctgcgggc	cagctgcgag	gcgctgtaca	gcgagatgga	2520
ccccgaggag	cggtgcgctc	tcgccactac	gcgccacctg	cgccccgaca	tgaagacgca	2580
cctggaccgg	ccgctggtgg	tggagctggg	ccgcgacggc	gcgcgggggc	ccgtgggagg	2640
caaagcccga	cctgaggctg	cgaggccccc	cgaggcgctc	gaccctccgc	gcaggcacca	2700
ccggcaccgc	gacaaggaca	agacccccgc	ggcgggggac	caggaccgag	cagaggcccc	2760
gaagcgggag	agcggggagc	ccggtgcccg	ggaggagcgg	ccgcggccgc	accgcagcca	2820
cagcaaggag	gccgcggggc	ccccggaggc	gcggagcggg	cgcgcccgag	gcccaggccc	2880
cgaggggggc	cgcgggcacc	accggcggcg	ctccccggag	gaggcggccg	agcgggagcc	2940
ccgaccgcc	cgcgcgacc	ggcaccagga	tccgagcaag	gagtgcgccg	gcgccaaggg	3000
cgagcggcgc	gcgcggcacc	gcggcggccc	ccgagcgggg	ccccgggagg	cggagagcgg	3060

ES 2 666 970 T3

ggaggagccg gcgcggcggc accgggcccc gcacaaggcg cagcctgctc acgaggctgt 3120  
 ggagaaggag accacggaga aggagccac ggagaaggag gctgagatag tggaaGCCga 3180  
 caaggaaaag gagctccgga accaccagcc ccgggagcca cactgtgacc tggagaccag 3240  
 tgggactgtg actgtgggtc ccatgcacac actgccagc acctgtctcc agaagggtgga 3300  
 ggaacagcca gaggatgcag acaatcagcg gaacgtcact cgcattggca gtcagcccc 3360  
 agaccCGaac actattgtac atatccagc gatgctgacg ggcctcttg ggaagccac 3420  
 ggtcgttccc agtggtaacg tggacctgga aagccaagca gaggggaaga aggaggtgga 3480  
 agcggatgac gtgatgagga gcggccccg gcctatcgtc ccatacagc ccatgttctg 3540  
 tttaaGcccc accaacctgc tccgcccgtt ctgccactac atcgtgacca tgaggTactt 3600  
 cgaggTggc attctcgtg tcatcgcctt gagcagcacc gccctggctg ctgaggacc 3660  
 agtgcgcaca gactcgccca ggaacaacgc tctgaaatac ctggattaca ttttactgg 3720  
 tgtctttacc tttgagatgg tgataaagat gatcgacttg ggactgctgc ttcaccctgg 3780  
 agcctatttc cgggacttgt ggaacattct ggacttcatt gtggtcagtg gcgccctgg 3840  
 ggcgtttgct ttctcaggat ccaaaggaa agacatcaat accatcaagt ctctgagagt 3900  
 ccttcgtgtc ctgcggcccc tcaagaccat caaacggctg cccaagctca aggctgtgtt 3960  
 tgactgtgtg gtgaaactccc tgaagaatgt cctcaacatc ttgattgtct acatgctctt 4020  
 catgttcata tttgccgtca ttgcggtgca gctcttcaa ggaagtttt tctactgcac 4080  
 agatgaatcc aaggagctgg agagggactg caggggtcag tatttgatt atgagaagga 4140  
 ggaagtggaa gctcagccca ggcagtggaa gaaatacgc tttactacg acaatgtgct 4200  
 ctgggctctg ctgacgctgt tcacagtgtc cacgggagaa ggctggccca tgggtctgaa 4260  
 aactccgtg gatgccacct atgaggagca ggtccaagc cctgggtacc gcatggagct 4320  
 gtccatcttc tacgtggctc actttgtggc ctttccctc ttcttcgtca acatcttTgt 4380  
 ggctttgatc atcatcacct tccaggagca gggggacaag gtgatgtctg aatgcagcct 4440  
 ggagaagaac gagagggtct gcattgactt cgcctcagc gccaaacccc tgacacggta 4500  
 catgccccaa aaccggcagt cgttccagta taagacgtgg acatttTgtg tctccccgcc 4560  
 cttgaatac ttcatcatgg ccatgatagc cctcaacact gtgggtctga tgatgaagtt 4620  
 ctatgatgca ccctatgagt acgagctgat gctgaaatgc ctgaacatg tgttcacatc 4680  
 catgttctcc atggaatgcg tgctgaagat catcgccttt ggggtgctga actatttCag 4740  
 agatgcctgg aatgtctttg actttgtcac tgtgttggga agtattactg atattttagt 4800  
 aacagagatt gcggaacga acaatttcat caacctcagc ttctccgcc tctttcgagc 4860  
 tgcgcggctg atcaagctgc tccgccaggc ctacaccatc cgcacctgc tgtggacctt 4920  
 tgtccagTcc ttcaaggccc tgcctacgt gtgtctgctc attgccatgc tgttcttcat 4980

ES 2 666 970 T3

ctacgccatc atcggcatgc aggtgtttgg gaatattgcc ctggatgatg acaccagcat 5040  
caaccgccac aacaacttcc ggacgttttt gcaagccctg atgctgctgt tcaggagcgc 5100  
cacgggggag gcctggcacg agatcatgct gtcctgcctg agcaaccagg cctgtgatga 5160  
gcaggccaat gccaccgagt gtggaagtga ctttgctac ttctacttgc tctccttcat 5220  
cttctgtgc tcctttctga tgttgaacct ctttgtggct gtgatcatgg acaattttga 5280  
gtacctcacg cgggactctt ccatcctagg tcctcaccac ttggatgagt tcatccgggt 5340  
ctgggctgaa tacgaccggc ctgctgtggc gcgcatcagt tacaatgaca tgtttgagat 5400  
gctgaaacac atgtccccgc ctctggggct ggggaagaaa tgccctgctc gagttgctta 5460  
caagcgctg gttcgcatga acatgcccat ctccaacgag gacatgactg ttcacttca 5520  
gtccacgctg atggccctca tccggacggc actggagatc aagctggccc cagctgggac 5580  
aaagcagcat cagtgtgacg cggagttgag gaaggagatt tccgttgtgt gggccaatct 5640  
gccccagaag actttggact tgctgttacc accccataag cctgatgaga tgacagtggg 5700  
gaaggtttat gcagctctga tgatattcga cttctacaag cagaacaaaa ccaccagaga 5760  
ccagatgcag caggctcctg gaggcctctc ccagatgggt cctgtgtccc tgttccaccc 5820  
tctgaaggcc accctggagc agacacagcc ggctgtgctc cgaggagccc gggttttcct 5880  
tcgacagaag agttccacct ccctcagcaa tggcggggcc atacaaaacc aagagagtgg 5940  
catcaaagag tctgtctcct ggggactca aaggaccag gatgcacccc atgaggccag 6000  
gccaccctg gagcgtggcc actccacaga gatccctgtg gggcggtcag gagcactggc 6060  
tgtggacgtt cagatgcaga gcataaccgc gaggggccct gatggggagc cccagcctgg 6120  
gctggagagc cagggtcgag cggcctccat gccccgcctt gcggccgaga ctcagcccgt 6180  
cacagatgcc agccccatga agcgtctcat ctccacgctg gccacgaggc cccgtgggac 6240  
tcatctttgc agcaccaccc cggaccgccc accccctagc caggcgtcgt cgcaccacca 6300  
ccaccaccgc tgccaccgcc gcagggacag gaagcagagg tccttgaga aggggcccag 6360  
cctgtctgcc gatatggatg gcgcaccaag cagtgtgtgt gggccggggc tgccccggg 6420  
agaggggcct acaggctgcc ggcgggaacg agagcggcg caggagcggg gccggtccca 6480  
ggagcggagg cagccctcat cctcctcctc ggagaagcag cgcttctact cctgcgaccg 6540  
ctttggggc cgtgagcccc cgaagcccaa gccctcctc agcagccacc caacgtcgcc 6600  
aacagctggc caggagccgg gacccaccc acagggcagt ggttccgtga atgggagccc 6660  
cttgtgtca acatctggtg ctagcacccc cggccgcggt gggcggaggc agctccccca 6720  
gacgcccctg actccccgcc ccagcatcac ctacaagacg gccaaactcct caccatcca 6780  
cttcgcccgg gctcagacca gcctccctgc cttctcccca ggccggctca gccgtgggt 6840

ES 2 666 970 T3

ttccgaacac aacgcctgc tgcagagaga cccctcagc cagcccctgg ccctggctc	6900
tcgaattggc tctgacctt acctggggca gcgtctggac agtgaggcct ctgtccacgc	6960
cctgcctgag gacactctca ctttcgagga ggctgtggcc accaactcgg gccgctcctc	7020
caggacttcc tacgtgtcct ccctgacctc ccagtctcac cctctccgcc gcgtgcccaa	7080
cggttaccac tgcaccctgg gactcagctc gggtgccga gcacggcaca gctaccacca	7140
ccctgaccaa gaccactggg gctagctgca ccgtgaccgc tcagacgcct gcatgcagca	7200
ggcgtgtgtt ccagtggatg agttttatca tccacacggg gcagccggcc ctccggggag	7260
gccttgccca ccttggtgag gctcctgtgg cccctccctc cccctcctcc cctcttttac	7320
tctagacgac gaataaagcc ctggttagagg atgcggctct ctctgtcccc ttctgtcct	7380
gccttctcctg gtctcgtacc acacaccaga ccctaaaccg caggctgctg tgtgtggctg	7440
agaaggacc aggagtcaa atcccgtgtc ctgggactca gcatccagca tgggtgcttg	7500
gagccgttgt gaggagctct gcgtcctgtg gggagcacc ttcacgtggc cgtgccgcac	7560
agagaagcag ggcccactg aaagtgcgcc gagacctcgg gacggagggg atggggaggg	7620
ggacacagtc gtggcttgtg cagcccgcc gtgtcagcga atgctcactc aggcaagctc	7680
tgtcctccct ggacaccgtc agccccacag gaaccgagct gggaagtgtt cttgctgtgg	7740
ttgtgatttt taattgcaac acctctcatt cttgtcactt ctatatacgt gatgtagaaa	7800
aataggaaa ccagaaaaat ggggaaggaa atgttcacat aactttaaa aatcaaacct	7860
gtgaaagaaa gatgtcagct ttttgccacg tgtctttgtg gcttatgcga ggagactccc	7920
tgtgcagccc tgtccggctc aggtggagct agacggcccc tggtctctgt gctcttgacc	7980
aagtgcctga ccgccaggcc ctcacaccca ggctcctggg cactgtggtg tgaggcgagg	8040
cctcgggatc catcaccgca ggatgctgtg aaaagtactc gcgatggcag ccaggtagca	8100
agcccttgcc agtgagagc actggatgtc atgggtggca acaaggcagc catttgctgt	8160
cctcctccca cgagtggaag gggtttccaa ggaagccaca gggcagctga ccacgtgctt	8220
gtgtgaggca ttttcagtct gttctgcata tgattctcag ggcacactct gtggtatgtg	8280
aatagggtt ccttccacat acagcagaag agaggcaaag gctggtagga aggaggaaga	8340
cattggctgg gggcttggat gtggggccgt cagggcagga gggaggaagc cccagctgga	8400
atgaaactca gagcaagtga ccgagggagg acacggctcc tgccactgag gccgggcacc	8460
tgatgccag cactgtcctg gcgccagaca cagggagcag gcagtcaagt gaggtctgac	8520
ccccatggcc acgctcagga gagaaagacc atgctcagga cactgtccaa ggtgcacaag	8580
atgctgggag gtcccttgtt tgggtgaagaa agggagcatt tagagcagtt gatgggtgtg	8640
tgtcctccgt gttctgaaat tccagatgat ctgtgttga ttcttgctt ctaccccatg	8700
attctcctca aagaaattgt gtgtgatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtctgtg	8760

ES 2 666 970 T3

tcacaggaga tgcagtgcct gtacaggtgt gttcagtgtg tggatgtcat taacccatag 8820  
 ggctatgcaa caaaagacac atttaataga agtaaaacac acaagaccgc tgcctggtct 8880  
 cggggttcag catgattgtg accaaacctt tttatagaat ttccttacct gaaggcacia 8940  
 cactctgaaa ctttaaagat aacagagtat tttattccaa tagaataaac caggaatctc 9000  
 ggactgtgca tgtgatcact gtgctcctgt tgcaaagtag aaggatgtgt attttgacac 9060  
 tgacgttttg tctcttgttc cccagccccc agcccatggt atcttgggtg tcgaatgtgt 9120  
 ccattccatg cagaaccaca gccatttccc caggcagtgt tgggtcgaga atccactttt 9180  
 ctaaaccacc acagcctagc tggcctgtct agactcttct aggcattgga attgatgaaa 9240  
 actacagga gcggggaaag gagacattat gtcttgttt cctgactttg ggttttgttt 9300  
 ctactgtgt cttctccggc tatcatatat gtcccctgaa tctcatagt agctgcaaaa 9360  
 tttgaagtgc atcaccagc tgtctgcatc tggaaccagc caagcagtg ctgtagtttg 9420  
 aacaagttat gtgtgcatgt aacatatata catatataca tatatacaag tatgtgcatg 9480  
 ataatgtata tcttctgact ttttgatata atgtattcat ttgttaattt ttaattatat 9540  
 ttgatataaa tcaaaggttt gttgcaaac tttatattta agaagtgtta aaaaaaaaaa 9600  
 aaagtcccaa ccatgcaaca caactgggac ctacttaaaa agaaattctg tgattgacta 9660  
 gtttctgccc tgagtcatat ttatcagcca aactttggat tctgctggtg tttctacaat 9720  
 gacattttgt atgaagcaaa gtccttgaat taaaataaaa acttagcaaa aatcaaaaa 9780  
 caaaacccca aaaaaaaaaa aaaaa 9805

<210> 2

<211> 2339

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 666 970 T3

Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Arg Ile Thr Glu Trp Pro Pro  
 85 90 95

Phe Glu Tyr Met Ile Leu Ala Thr Ile Ile Ala Asn Cys Ile Val Leu  
 100 105 110

Ala Leu Glu Gln His Leu Pro Asp Gly Asp Lys Thr Pro Met Ser Glu  
 115 120 125

Arg Leu Asp Asp Thr Glu Pro Tyr Phe Ile Gly Ile Phe Cys Phe Glu  
 130 135 140

Ala Gly Ile Lys Ile Ile Ala Leu Gly Phe Val Phe His Lys Gly Ser  
 145 150 155 160

Tyr Leu Arg Asn Gly Trp Asn Val Met Asp Phe Val Val Val Leu Thr  
 165 170 175

Gly Ile Leu Ala Thr Ala Gly Thr Asp Phe Asp Leu Arg Thr Leu Arg  
 180 185 190

Ala Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Leu Val Ser Gly Ile Pro Ser  
 195 200 205

Leu Gln Val Val Leu Lys Ser Ile Met Lys Ala Met Val Pro Leu Leu  
 210 215 220

Gln Ile Gly Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ile Leu Met Phe Ala Ile Ile  
 225 230 235 240

Gly Leu Glu Phe Tyr Met Gly Lys Phe His Lys Ala Cys Phe Pro Asn  
 245 250 255

Ser Thr Asp Ala Glu Pro Val Gly Asp Phe Pro Cys Gly Lys Glu Ala  
 260 265 270

Pro Ala Arg Leu Cys Glu Gly Asp Thr Glu Cys Arg Glu Tyr Trp Pro  
 275 280 285

Gly Pro Asn Phe Gly Ile Thr Asn Phe Asp Asn Ile Leu Phe Ala Ile  
 290 295 300

Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp Thr Asp Ile Leu  
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Asn Asp Ala Ala Gly Asn Thr Trp Asn Trp Leu Tyr Phe



ES 2 666 970 T3

Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys Val Thr Lys Tyr Trp  
 580 585 590

Ser Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu Asn Ser Met Lys Ser  
 595 600 605

Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe Ile Val Val Phe Ala  
 610 615 620

Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe Asn Phe Gln Asp Glu  
 625 630 635 640

Thr Pro Thr Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala Ala Ile Leu Thr Val  
 645 650 655

Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Ala Val Met Tyr His Gly  
 660 665 670

Ile Glu Ser Gln Gly Gly Val Ser Lys Gly Met Phe Ser Ser Phe Tyr  
 675 680 685

Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Asn Val Phe  
 690 695 700

Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala Gln Glu Leu Thr Lys  
 705 710 715 720

Asp Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln  
 725 730 735

Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val Ser Pro Met Ser Ala Ala Asn Ile  
 740 745 750

Ser Ile Ala Ala Arg Gln Gln Asn Ser Ala Lys Ala Arg Ser Val Trp  
 755 760 765

Glu Gln Arg Ala Ser Gln Leu Arg Leu Gln Asn Leu Arg Ala Ser Cys  
 770 775 780

Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Met Asp Pro Glu Glu Arg Leu Arg Phe Ala  
 785 790 795 800

Thr Thr Arg His Leu Arg Pro Asp Met Lys Thr His Leu Asp Arg Pro  
 805 810 815

Leu Val Val Glu Leu Gly Arg Asp Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Gly  
 820 825 830

ES 2 666 970 T3

Lys Ala Arg Pro Glu Ala Ala Glu Ala Pro Glu Gly Val Asp Pro Pro  
 835 840 845  
 Arg Arg His His Arg His Arg Asp Lys Asp Lys Thr Pro Ala Ala Gly  
 850 855 860  
 Asp Gln Asp Arg Ala Glu Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly Glu Pro Gly  
 865 870 875 880  
 Ala Arg Glu Glu Arg Pro Arg Pro His Arg Ser His Ser Lys Glu Ala  
 885 890 895  
 Ala Gly Pro Pro Glu Ala Arg Ser Glu Arg Gly Arg Gly Pro Gly Pro  
 900 905 910  
 Glu Gly Gly Arg Arg His His Arg Arg Gly Ser Pro Glu Glu Ala Ala  
 915 920 925  
 Glu Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Ala His Arg His Gln Asp Pro Ser  
 930 935 940  
 Lys Glu Cys Ala Gly Ala Lys Gly Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Gly  
 945 950 955 960  
 Gly Pro Arg Ala Gly Pro Arg Glu Ala Glu Ser Gly Glu Glu Pro Ala  
 965 970 975  
 Arg Arg His Arg Ala Arg His Lys Ala Gln Pro Ala His Glu Ala Val  
 980 985 990  
 Glu Lys Glu Thr Thr Glu Lys Glu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Glu Ile  
 995 1000 1005  
 Val Glu Ala Asp Lys Glu Lys Glu Leu Arg Asn His Gln Pro Arg  
 1010 1015 1020  
 Glu Pro His Cys Asp Leu Glu Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gly  
 1025 1030 1035  
 Pro Met His Thr Leu Pro Ser Thr Cys Leu Gln Lys Val Glu Glu  
 1040 1045 1050  
 Gln Pro Glu Asp Ala Asp Asn Gln Arg Asn Val Thr Arg Met Gly  
 1055 1060 1065  
 Ser Gln Pro Pro Asp Pro Asn Thr Ile Val His Ile Pro Val Met  
 1070 1075 1080

ES 2 666 970 T3

Leu Thr Gly Pro Leu Gly Glu Ala Thr Val Val Pro Ser Gly Asn  
 1085 1090 1095  
  
 Val Asp Leu Glu Ser Gln Ala Glu Gly Lys Lys Glu Val Glu Ala  
 1100 1105 1110  
  
 Asp Asp Val Met Arg Ser Gly Pro Arg Pro Ile Val Pro Tyr Ser  
 1115 1120 1125  
  
 Ser Met Phe Cys Leu Ser Pro Thr Asn Leu Leu Arg Arg Phe Cys  
 1130 1135 1140  
  
 His Tyr Ile Val Thr Met Arg Tyr Phe Glu Val Val Ile Leu Val  
 1145 1150 1155  
  
 Val Ile Ala Leu Ser Ser Ile Ala Leu Ala Ala Glu Asp Pro Val  
 1160 1165 1170  
  
 Arg Thr Asp Ser Pro Arg Asn Asn Ala Leu Lys Tyr Leu Asp Tyr  
 1175 1180 1185  
  
 Ile Phe Thr Gly Val Phe Thr Phe Glu Met Val Ile Lys Met Ile  
 1190 1195 1200  
  
 Asp Leu Gly Leu Leu Leu His Pro Gly Ala Tyr Phe Arg Asp Leu  
 1205 1210 1215  
  
 Trp Asn Ile Leu Asp Phe Ile Val Val Ser Gly Ala Leu Val Ala  
 1220 1225 1230  
  
 Phe Ala Phe Ser Gly Ser Lys Gly Lys Asp Ile Asn Thr Ile Lys  
 1235 1240 1245  
  
 Ser Leu Arg Val Leu Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Thr Ile Lys  
 1250 1255 1260  
  
 Arg Leu Pro Lys Leu Lys Ala Val Phe Asp Cys Val Val Asn Ser  
 1265 1270 1275  
  
 Leu Lys Asn Val Leu Asn Ile Leu Ile Val Tyr Met Leu Phe Met  
 1280 1285 1290  
  
 Phe Ile Phe Ala Val Ile Ala Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe  
 1295 1300 1305  
  
 Phe Tyr Cys Thr Asp Glu Ser Lys Glu Leu Glu Arg Asp Cys Arg

ES 2 666 970 T3

1310		1315		1320										
Gly	Gln	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Glu	Glu	Val	Glu	Ala	Gln	Pro
	1325					1330					1335			
Arg	Gln	Trp	Lys	Lys	Tyr	Asp	Phe	His	Tyr	Asp	Asn	Val	Leu	Trp
	1340					1345					1350			
Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Phe	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Gly	Trp	Pro
	1355					1360					1365			
Met	Val	Leu	Lys	His	Ser	Val	Asp	Ala	Thr	Tyr	Glu	Glu	Gln	Gly
	1370					1375					1380			
Pro	Ser	Pro	Gly	Tyr	Arg	Met	Glu	Leu	Ser	Ile	Phe	Tyr	Val	Val
	1385					1390					1395			
Tyr	Phe	Val	Val	Phe	Pro	Phe	Phe	Phe	Val	Asn	Ile	Phe	Val	Ala
	1400					1405					1410			
Leu	Ile	Ile	Ile	Thr	Phe	Gln	Glu	Gln	Gly	Asp	Lys	Val	Met	Ser
	1415					1420					1425			
Glu	Cys	Ser	Leu	Glu	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala	Cys	Ile	Asp	Phe	Ala
	1430					1435					1440			
Ile	Ser	Ala	Lys	Pro	Leu	Thr	Arg	Tyr	Met	Pro	Gln	Asn	Arg	Gln
	1445					1450					1455			
Ser	Phe	Gln	Tyr	Lys	Thr	Trp	Thr	Phe	Val	Val	Ser	Pro	Pro	Phe
	1460					1465					1470			
Glu	Tyr	Phe	Ile	Met	Ala	Met	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val	Val	Leu
	1475					1480					1485			
Met	Met	Lys	Phe	Tyr	Asp	Ala	Pro	Tyr	Glu	Tyr	Glu	Leu	Met	Leu
	1490					1495					1500			
Lys	Cys	Leu	Asn	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Met	Phe	Ser	Met	Glu	Cys
	1505					1510					1515			
Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Ala	Phe	Gly	Val	Leu	Asn	Tyr	Phe	Arg	Asp
	1520					1525					1530			
Ala	Trp	Asn	Val	Phe	Asp	Phe	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Ile	Thr
	1535					1540					1545			

ES 2 666 970 T3

Asp Ile Leu Val Thr Glu Ile Ala Glu Thr Asn Asn Phe Ile Asn  
 1550 1555 1560  
  
 Leu Ser Phe Leu Arg Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ile Lys Leu  
 1565 1570 1575  
  
 Leu Arg Gln Gly Tyr Thr Ile Arg Ile Leu Leu Trp Thr Phe Val  
 1580 1585 1590  
  
 Gln Ser Phe Lys Ala Leu Pro Tyr Val Cys Leu Leu Ile Ala Met  
 1595 1600 1605  
  
 Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Ile Ile Gly Met Gln Val Phe Gly Asn  
 1610 1615 1620  
  
 Ile Ala Leu Asp Asp Asp Thr Ser Ile Asn Arg His Asn Asn Phe  
 1625 1630 1635  
  
 Arg Thr Phe Leu Gln Ala Leu Met Leu Leu Phe Arg Ser Ala Thr  
 1640 1645 1650  
  
 Gly Glu Ala Trp His Glu Ile Met Leu Ser Cys Leu Ser Asn Gln  
 1655 1660 1665  
  
 Ala Cys Asp Glu Gln Ala Asn Ala Thr Glu Cys Gly Ser Asp Phe  
 1670 1675 1680  
  
 Ala Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile Phe Leu Cys Ser Phe Leu  
 1685 1690 1695  
  
 Met Leu Asn Leu Phe Val Ala Val Ile Met Asp Asn Phe Glu Tyr  
 1700 1705 1710  
  
 Leu Thr Arg Asp Ser Ser Ile Leu Gly Pro His His Leu Asp Glu  
 1715 1720 1725  
  
 Phe Ile Arg Val Trp Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Ala Cys Gly Arg  
 1730 1735 1740  
  
 Ile Ser Tyr Asn Asp Met Phe Glu Met Leu Lys His Met Ser Pro  
 1745 1750 1755  
  
 Pro Leu Gly Leu Gly Lys Lys Cys Pro Ala Arg Val Ala Tyr Lys  
 1760 1765 1770  
  
 Arg Leu Val Arg Met Asn Met Pro Ile Ser Asn Glu Asp Met Thr  
 1775 1780 1785

ES 2 666 970 T3

Val His Phe Thr Ser Thr Leu Met Ala Leu Ile Arg Thr Ala Leu  
 1790 1795 1800

Glu Ile Lys Leu Ala Pro Ala Gly Thr Lys Gln His Gln Cys Asp  
 1805 1810 1815

Ala Glu Leu Arg Lys Glu Ile Ser Val Val Trp Ala Asn Leu Pro  
 1820 1825 1830

Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu Val Pro Pro His Lys Pro Asp Glu  
 1835 1840 1845

Met Thr Val Gly Lys Val Tyr Ala Ala Leu Met Ile Phe Asp Phe  
 1850 1855 1860

Tyr Lys Gln Asn Lys Thr Thr Arg Asp Gln Met Gln Gln Ala Pro  
 1865 1870 1875

Gly Gly Leu Ser Gln Met Gly Pro Val Ser Leu Phe His Pro Leu  
 1880 1885 1890

Lys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Gln Pro Ala Val Leu Arg Gly Ala  
 1895 1900 1905

Arg Val Phe Leu Arg Gln Lys Ser Ser Thr Ser Leu Ser Asn Gly  
 1910 1915 1920

Gly Ala Ile Gln Asn Gln Glu Ser Gly Ile Lys Glu Ser Val Ser  
 1925 1930 1935

Trp Gly Thr Gln Arg Thr Gln Asp Ala Pro His Glu Ala Arg Pro  
 1940 1945 1950

Pro Leu Glu Arg Gly His Ser Thr Glu Ile Pro Val Gly Arg Ser  
 1955 1960 1965

Gly Ala Leu Ala Val Asp Val Gln Met Gln Ser Ile Thr Arg Arg  
 1970 1975 1980

Gly Pro Asp Gly Glu Pro Gln Pro Gly Leu Glu Ser Gln Gly Arg  
 1985 1990 1995

Ala Ala Ser Met Pro Arg Leu Ala Ala Glu Thr Gln Pro Val Thr  
 2000 2005 2010

Asp Ala Ser Pro Met Lys Arg Ser Ile Ser Thr Leu Ala Gln Arg  
 2015 2020 2025

ES 2 666 970 T3

Pro Arg Gly Thr His Leu Cys Ser Thr Thr Pro Asp Arg Pro Pro  
 2030 2035 2040

Pro Ser Gln Ala Ser Ser His His His His His Arg Cys His Arg  
 2045 2050 2055

Arg Arg Asp Arg Lys Gln Arg Ser Leu Glu Lys Gly Pro Ser Leu  
 2060 2065 2070

Ser Ala Asp Met Asp Gly Ala Pro Ser Ser Ala Val Gly Pro Gly  
 2075 2080 2085

Leu Pro Pro Gly Glu Gly Pro Thr Gly Cys Arg Arg Glu Arg Glu  
 2090 2095 2100

Arg Arg Gln Glu Arg Gly Arg Ser Gln Glu Arg Arg Gln Pro Ser  
 2105 2110 2115

Ser Ser Ser Ser Glu Lys Gln Arg Phe Tyr Ser Cys Asp Arg Phe  
 2120 2125 2130

Gly Gly Arg Glu Pro Pro Lys Pro Lys Pro Ser Leu Ser Ser His  
 2135 2140 2145

Pro Thr Ser Pro Thr Ala Gly Gln Glu Pro Gly Pro His Pro Gln  
 2150 2155 2160

Gly Ser Gly Ser Val Asn Gly Ser Pro Leu Leu Ser Thr Ser Gly  
 2165 2170 2175

Ala Ser Thr Pro Gly Arg Gly Gly Arg Arg Gln Leu Pro Gln Thr  
 2180 2185 2190

Pro Leu Thr Pro Arg Pro Ser Ile Thr Tyr Lys Thr Ala Asn Ser  
 2195 2200 2205

Ser Pro Ile His Phe Ala Gly Ala Gln Thr Ser Leu Pro Ala Phe  
 2210 2215 2220

Ser Pro Gly Arg Leu Ser Arg Gly Leu Ser Glu His Asn Ala Leu  
 2225 2230 2235

Leu Gln Arg Asp Pro Leu Ser Gln Pro Leu Ala Pro Gly Ser Arg  
 2240 2245 2250

Ile Gly Ser Asp Pro Tyr Leu Gly Gln Arg Leu Asp Ser Glu Ala



ES 2 666 970 T3

atcattggct ccttcttcat gctcaacctg gtgctgggtg tgctttccgg agagtttgcc 1080  
 aaggagcggg agcgagtcga gaaccgccgc gccttcctga agctccgcag gcagcagcag 1140  
 attgagcgag agctgaatgg gtacttggag tggatcttca aggcagagga agtcatgttg 1200  
 gcagaggagg acaagaatgc agaagagaaa tcccctttgg atgtgttgaa gagagctgcc 1260  
 accaagaaga gccgaaatga cctcatccat gcagaagagg gggaggaccg gttttagtac 1320  
 ctctgtgcag ttgggtctcc atttgcctgt gccagcctca agagtgggaa gacggagagc 1380  
 tcatcgtact tccggagaaa ggagaagatg ttccggttct ttatccggcg tatggtgaaa 1440  
 gcacagagct tctactgggt ggtactgtgt gtgggtggccc tgaacacact gtgtgtggcc 1500  
 atggtgcact ataatcagcc tcagcggctt accactgcac tgtactttgc agagtttggt 1560  
 ttcctgggtc tcttctcac agagatgtcc ctgaagatgt atggcctagg gcccagaagt 1620  
 tacttcaggt cttccttcaa ctgctttgac tttgggtga ttgtggggag tatctttgaa 1680  
 gtagtctggg ctgccatcaa gccaggaacc tcctttggaa tcagtgtgct gcgggctctg 1740  
 cgactgctga ggatattcaa agttaccaag tattggaact ctctgaggaa cctgggtggtt 1800  
 tccctcctca attccatgaa gtccatcatc agccttctct tctgctttt cctcttcatc 1860  
 gtggtcttcg ctctgttggg gatgcagctg tttgggggac agttcaactt tcaagatgag 1920  
 actccaacca ccaatthtga taccttccca gctgccatcc tcaactgtctt tcagatcctg 1980  
 acaggagagv attggaatgc cgtaatgtat catgggattg agtcgcaagg tggagtcaagc 2040  
 aaaggcatgt tttcttctt ttacttcatc gtccctgacac tgthttggaaa ctacaccctg 2100  
 ctgaaatgtt ttctggccat tgctgtggac aaccttgcca atgccaggga gttgaccaag 2160  
 gatgaagagg agatggaaga agcagccaat cagaaaactg ctcttcagaa ggccaaaaga 2220  
 gtagtctgaag tcagcccat gtctgtgccc aatatctcca tcgctgccag gcagcagaac 2280  
 tcggccaagg cgcgctcagt atgggagcag cgggccagtc agctaaggct ccagaatctg 2340  
 cgtgccagct gtgaggcatt gtacagttag atggaccctg aggagcgcct gcgttatgcc 2400  
 agcacgcgcc atgtgaggcc agacatgaag acacacatgg accgaccctt agtgggtggag 2460  
 cctggtcagv atggtctgag gggaccctgt gggagcaagt caaagcctga aggcacggag 2520  
 gccacagaaa gcgcggacct acctcgcagg caccaccggc accgtgatag ggacaagacc 2580  
 tcagccacag cacctgctgg aggcgaacag gacaggacag aaagcaccga gaccggggcc 2640  
 cgggaggaac gtgcgcgcc tcgtcgaagt cacagcaagg agactccagg ggtgacacg 2700  
 caagtgcct gtgagcgcag tagacgtcac caccggcgcg gctccccgga ggaggccact 2760  
 gaacgggagc ctgcgcgcca ccgtgccac cggcatgcac aggactcaag caaggagggc 2820  
 acggcgcggv tgcttgtag caagggtgag cgacgagcaa gacaccgagg cccacgcacg 2880  
 ggtccacgtg aggcagagaa caacgaggag cccacacgca ggcaccgtgc aaggcataag 2940

ES 2 666 970 T3

gtgccacca cactgcagcc cccagagagg gaggctgcag agaaggagag caacgcggtg 3000  
 gaaggggata aggaaacccg aaatcaccag cccaaggaac ctactgtga cctggaggcc 3060  
 attgcagtta caggtgtggg ccctctgcac atgctgcca gcacctgtct ccagaaagtg 3120  
 gacgagcaac cagaggatgc agacaaccag cgtaatgtca cccggatggg cagtcaagccc 3180  
 tcagatocca gcaccactgt gcatgtcca gtgacactga caggccctcc tggggagacc 3240  
 cctgtagtcc ccagtgttaa catgaacctg gaaggccaag cagagggcaa gaaggaggca 3300  
 gaggcggatg atgtgctgag aagaggcccc aggccatcg tccctacag ctccatgttt 3360  
 tgtctcagcc ccaccaacct gcttcgtcgc ttctgccatt acattgtgac catgcggtac 3420  
 tttgagatgg taattcttgt ggtcattgcc ttgagcagca ttgccctggc tgcagaggat 3480  
 cctgtcggga cagattcatt caggaacaac gctttaaagt acatggatta catctttaca 3540  
 ggagtcttca cctttgaaat ggtcataaag atgatagact tgggcttgct gctgcaccct 3600  
 ggtgcctact tccgggacct gtggaacatt ctggacttca ttgttgctag tggagccctg 3660  
 gtggcatttg cgttctcag cttcatggga ggatccaaag gaaagacat caataccatc 3720  
 aagtctctga gagtctcgc tgtcctgagg cccctcaaga ccatcaagcg gctgcctaag 3780  
 ctcaaggctg tctttgactg tgtggtgaac tccctgaaga acgtctttaa catcctgatt 3840  
 gtctacatgc tcttcatgtt catatttgcc gtcattgccg tccagctctt caaagggaag 3900  
 ttcttttact gtactgatga atccaaggag ctggagaggg actgccgggg tcagtatttg 3960  
 gattatgaga aggaagaagt agaagcccag ccaaggcagt ggaagaaata tgacttccac 4020  
 tatgacaatg ttctctgggc cttgttgacg ctgttcacag tgtccacggg agaggggtgg 4080  
 cccatggtgc tgaaacactc tgtggatgcc acctatgagg aacaggggcc cagtcccggg 4140  
 ttccggatgg agctctccat cttctacgtg gtctactttg tggcttccc tttttcttt 4200  
 gtcaacatct ttgtggcctt gatcattatc accttccagg aacagggaga taaggtgatg 4260  
 tctgaatgca gcttagaaaa gaatgagagg gcttgcatg attttgcat cagtgccaaag 4320  
 cccctgacac ggtacatgcc tcaaaacaaa cagtcgttcc agtataagac atggacattc 4380  
 gtggtctctc cacccttga gtacttcatc atggctatga tagccctcaa cacagtggtg 4440  
 ctgatgatga agttctatga tgcaccttat gagtacgagc tgatgctgaa atgcctgaac 4500  
 attgtcttca catccatgtt ctcgatggag tgcatactga agatcatcgc ctttggggta 4560  
 ttgaactact tcagagatgc ctggaacgtc tttgactttg tcacggtttt gggagattt 4620  
 actgatattt tagtaacaga gatagcgaac aacttcatca acctaaagctt ccttcgcctc 4680  
 ttccggggcg caoggctgat caagctgctt cgccagggct acaccatccg catcctattg 4740  
 tggaccttcg tccagtcctt taaggcgtg ccctacgtg gcctcctcat tgccatgctg 4800

ES 2 666 970 T3

ttcttcatct acgccatcat cggcatgcag gtttttggaa acattgccct tgatgatgac 4860  
 accagtatca accgacacaa caacttccgg acatttctgc aagccttaat gctattgttc 4920  
 aggagtgcc a ctggggaggc ctggcatgag atcatgctgt cttgtctggg caaccgggcc 4980  
 tgtgaccac atgccaacgc cagtgagtgc gggagcgact ttgcctatct ttatcttctc 5040  
 tccttcatct tcctctgttc ctttctgatg ttgaacctct ttgttgctgt aatcatggac 5100  
 aattttgagt acctcactcg ggactcttcc atcctagggc ctaccactt agacgaattc 5160  
 attcaggtct ggggtgaata cgaccagct gcgtgtgggc gcatcagtta caatgacatg 5220  
 tttgagatgc tgaaaacacat gtccccacct ctgggggttg ggaagaaatg cccggctcga 5280  
 gttgcataca agcgcctggg tcgcatgaac atgcccatat ccaatgagga catgacggtg 5340  
 cactttacgt ccacactgat ggccctcatc cggacagcac tggagatcaa gcttgcccca 5400  
 gcggggagca agcagcacca gtgtgatgct gagctgagaa aagagatctc tctgtgtgtg 5460  
 gctaactctc cccagaagac tctggactta ctggtaccac cccacaaacc tgacgagatg 5520  
 acagtgggga aggtctatgc tgctctcatg atatttgact tctacaaaca gaacaaaacc 5580  
 accagagatc agactcacca agctcccga ggctgtccc agatgggtcc cgtttccctg 5640  
 ttccaccctc tgaaggccac cctggaacag acacagcccg ctgtgcttcg aggagctcgg 5700  
 gttttccttc ggcaaaagag tgcaacttcc ctacagcaatg ggggtgccc acaaaccag 5760  
 gaaagtggca tcaaggagtc gctgtcctgg ggcacgcaga ggacccaaga tgcactttat 5820  
 gaggccagag cacctctaga acgtggccat tctgcagaga tcctgtggg gcagtcagga 5880  
 aactggctg tggatgtcca gatgcagaac atgacactga gaggaccaga tggggagccc 5940  
 cagcctgggc tggaaaacca aggcagagct gcctctatgc cagcctagc ggcagaaaca 6000  
 cagccggccc ctaatgccag ccccatgaag cgctccatct ccacactggc tccacgccc 6060  
 catgggactc agctttgcag cacagttctg gaccggctc ctctagcca ggcacacat 6120  
 caccaccacc accgctgcca ccggcgcaga gacaagaagc aaagggtccct ggaaaagggg 6180  
 cccagcctgt ctgttgacc agaaggtgca ccaagcactg ctgcaggacc tggctctgcc 6240  
 catggagaag gatccaccgc ctgccggcgg gaccgtaaac aggagcgagg ccggtcccag 6300  
 gagcggaggc agccctcatc ttcctcttca gagaagcagc gcttctattc ctgtgaccgc 6360  
 tttgggagcc gggagcccc gcaactgatc ccctcactca gtagccacc cacatcgcca 6420  
 acagcggcgc tagagccagc accccaccca cagggcagtg gttccgtaa tgggagcccc 6480  
 ttgatgtcaa catccgggtc tagcaccccc ggccgaggtg ggcggaggca gctccccag 6540  
 actcctctga ccccacgccc cagcatcacc tacaagacc ccaattcctc gctgtccac 6600  
 tttgtgagg gtcagagcgg cctcccagc ttctcccctg gccgtctcag ccgcgccctt 6660  
 tctgaacaca atgccctgct ccagaaagag cccctgagcc agcctctagc tctggtctcc 6720  
 cgaattggct ctgaccotta cctagggcag cgtctggaca gtgaggcctc cccccacacc 6780  
 ctgcctgagg atacactcac ctttgaagag gcagtggcca ccaactctgg ccgctctcc 6840  
 aggacttct atgtgtctc cctcacttcc caatcccacc ctctccgccc tgtaccaat 6900  
 ggctatcact gcactttggg actcagcact ggcgtccggg cgcggcacag ctaccaccac 6960  
 cccgatcagg accactggtg ctag 6984

<210> 4

ES 2 666 970 T3

<211> 2327

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

Met Val Arg Phe Gly Asp Glu Leu Gly Gly Arg Tyr Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg Ala Arg Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Pro  
20 25 30

Gly Gln Gly Gly Leu Pro Pro Gly Gln Arg Val Leu Tyr Lys Gln Ser  
35 40 45

Ile Ala Gln Arg Ala Arg Thr Met Ala Leu Tyr Asn Pro Ile Pro Val  
50 55 60

Lys Gln Asn Cys Phe Thr Val Asn Arg Ser Leu Phe Val Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Arg Ile Thr Glu Trp Pro Pro  
85 90 95

Phe Glu Tyr Met Ile Leu Ala Thr Ile Ile Ala Asn Cys Ile Val Leu  
100 105 110

Ala Leu Glu Gln His Leu Pro Asp Gly Asp Lys Thr Pro Met Ser Glu  
115 120 125

Arg Leu Asp Asp Thr Glu Pro Tyr Phe Ile Gly Ile Phe Cys Phe Glu  
130 135 140

Ala Gly Ile Lys Ile Ile Ala Leu Gly Phe Val Phe His Lys Gly Ser  
145 150 155 160

Tyr Leu Arg Asn Gly Trp Asn Val Met Asp Phe Val Val Val Leu Thr  
165 170 175

5

ES 2 666 970 T3

Gly Ile Leu Ala Thr Ala Gly Thr Asp Phe Asp Leu Arg Thr Leu Arg  
180 185 190

Ala Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Leu Val Ser Gly Ile Pro Ser  
195 200 205

Leu Gln Val Val Leu Lys Ser Ile Met Lys Ala Met Val Pro Leu Leu  
210 215 220

Gln Ile Gly Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ile Leu Met Phe Ala Ile Ile  
225 230 235 240

Gly Leu Glu Phe Tyr Met Gly Lys Phe His Lys Ala Cys Phe Pro Asn  
245 250 255

Ser Thr Asp Thr Glu Pro Val Gly Asp Phe Pro Cys Gly Lys Asp Pro  
260 265 270

Pro Ala Arg Gln Cys Asp Gly Asp Thr Glu Cys Arg Glu Tyr Trp Pro  
275 280 285

Gly Pro Asn Phe Gly Ile Thr Asn Phe Asp Asn Ile Leu Phe Ala Ile  
290 295 300

Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp Thr Asp Ile Leu  
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Asn Asp Ala Ala Gly Asn Thr Trp Asn Trp Leu Tyr Phe  
325 330 335

Ile Pro Leu Ile Ile Ile Gly Ser Phe Phe Met Leu Asn Leu Val Leu  
340 345 350

Gly Val Leu Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn  
355 360 365

Arg Arg Ala Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu  
370 375 380

Leu Asn Gly Tyr Leu Glu Trp Ile Phe Lys Ala Glu Glu Val Met Leu  
385 390 395 400

Ala Glu Glu Asp Lys Asn Ala Glu Glu Lys Ser Pro Leu Asp Val Leu  
405 410 415

Lys Arg Ala Ala Thr Lys Lys Ser Arg Asn Asp Leu Ile His Ala Glu  
420 425 430

ES 2 666 970 T3

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Val Asp Leu Cys Ala Val Gly Ser Pro Phe  
 435 440 445

Ala Arg Ala Ser Leu Lys Ser Gly Lys Thr Glu Ser Ser Ser Tyr Phe  
 450 455 460

Arg Arg Lys Glu Lys Met Phe Arg Phe Phe Ile Arg Arg Met Val Lys  
 465 470 475 480

Ala Gln Ser Phe Tyr Trp Val Val Leu Cys Val Val Ala Leu Asn Thr  
 485 490 495

Leu Cys Val Ala Met Val His Tyr Asn Gln Pro Gln Arg Leu Thr Thr  
 500 505 510

Ala Leu Tyr Phe Ala Glu Phe Val Phe Leu Gly Leu Phe Leu Thr Glu  
 515 520 525

Met Ser Leu Lys Met Tyr Gly Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Phe Arg Ser  
 530 535 540

Ser Phe Asn Cys Phe Asp Phe Gly Val Ile Val Gly Ser Ile Phe Glu  
 545 550 555 560

Val Val Trp Ala Ala Ile Lys Pro Gly Thr Ser Phe Gly Ile Ser Val  
 565 570 575

Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys Val Thr Lys Tyr Trp  
 580 585 590

Asn Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu Asn Ser Met Lys Ser  
 595 600 605

Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe Ile Val Val Phe Ala  
 610 615 620

Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe Asn Phe Gln Asp Glu  
 625 630 635 640

Thr Pro Thr Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala Ala Ile Leu Thr Val  
 645 650 655

Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Ala Val Met Tyr His Gly  
 660 665 670

Ile Glu Ser Gln Gly Gly Val Ser Lys Gly Met Phe Ser Ser Phe Tyr  
 675 680 685

ES 2 666 970 T3

Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Asn Val Phe  
 690 695 700  
  
 Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala Gln Glu Leu Thr Lys  
 705 710 715 720  
  
 Asp Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln  
 725 730 735  
  
 Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val Ser Pro Met Ser Ala Ala Asn Ile  
 740 745 750  
  
 Ser Ile Ala Ala Arg Gln Gln Asn Ser Ala Lys Ala Arg Ser Val Trp  
 755 760 765  
  
 Glu Gln Arg Ala Ser Gln Leu Arg Leu Gln Asn Leu Arg Ala Ser Cys  
 770 775 780  
  
 Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Met Asp Pro Glu Glu Arg Leu Arg Tyr Ala  
 785 790 795 800  
  
 Ser Thr Arg His Val Arg Pro Asp Met Lys Thr His Met Asp Arg Pro  
 805 810 815  
  
 Leu Val Val Glu Pro Gly Arg Asp Gly Leu Arg Gly Pro Val Gly Ser  
 820 825 830  
  
 Lys Ser Lys Pro Glu Gly Thr Glu Ala Thr Glu Ser Ala Asp Leu Pro  
 835 840 845  
  
 Arg Arg His His Arg His Arg Asp Arg Asp Lys Thr Ser Ala Thr Ala  
 850 855 860  
  
 Pro Ala Gly Gly Glu Gln Asp Arg Thr Glu Ser Thr Glu Thr Gly Ala  
 865 870 875 880  
  
 Arg Glu Glu Arg Ala Arg Pro Arg Arg Ser His Ser Lys Glu Thr Pro  
 885 890 895  
  
 Gly Ala Asp Thr Gln Val Arg Cys Glu Arg Ser Arg Arg His His Arg  
 900 905 910  
  
 Arg Gly Ser Pro Glu Glu Ala Thr Glu Arg Glu Pro Arg Arg His Arg  
 915 920 925  
  
 Ala His Arg His Ala Gln Asp Ser Ser Lys Glu Gly Thr Ala Pro Val



ES 2 666 970 T3

Tyr Met Asp Tyr Ile Phe Thr Gly Val Phe Thr Phe Glu Met Val  
 1175 1180 1185  
  
 Ile Lys Met Ile Asp Leu Gly Leu Leu Leu His Pro Gly Ala Tyr  
 1190 1195 1200  
  
 Phe Arg Asp Leu Trp Asn Ile Leu Asp Phe Ile Val Val Ser Gly  
 1205 1210 1215  
  
 Ala Leu Val Ala Phe Ala Phe Ser Ser Phe Met Gly Gly Ser Lys  
 1220 1225 1230  
  
 Gly Lys Asp Ile Asn Thr Ile Lys Ser Leu Arg Val Leu Arg Val  
 1235 1240 1245  
  
 Leu Arg Pro Leu Lys Thr Ile Lys Arg Leu Pro Lys Leu Lys Ala  
 1250 1255 1260  
  
 Val Phe Asp Cys Val Val Asn Ser Leu Lys Asn Val Leu Asn Ile  
 1265 1270 1275  
  
 Leu Ile Val Tyr Met Leu Phe Met Phe Ile Phe Ala Val Ile Ala  
 1280 1285 1290  
  
 Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe Phe Tyr Cys Thr Asp Glu Ser  
 1295 1300 1305  
  
 Lys Glu Leu Glu Arg Asp Cys Arg Gly Gln Tyr Leu Asp Tyr Glu  
 1310 1315 1320  
  
 Lys Glu Glu Val Glu Ala Gln Pro Arg Gln Trp Lys Lys Tyr Asp  
 1325 1330 1335  
  
 Phe His Tyr Asp Asn Val Leu Trp Ala Leu Leu Thr Leu Phe Thr  
 1340 1345 1350  
  
 Val Ser Thr Gly Glu Gly Trp Pro Met Val Leu Lys His Ser Val  
 1355 1360 1365  
  
 Asp Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Gly Pro Ser Pro Gly Phe Arg Met  
 1370 1375 1380  
  
 Glu Leu Ser Ile Phe Tyr Val Val Tyr Phe Val Val Phe Pro Phe  
 1385 1390 1395  
  
 Phe Phe Val Asn Ile Phe Val Ala Leu Ile Ile Ile Thr Phe Gln  
 1400 1405 1410

ES 2 666 970 T3

Glu Gln Gly Asp Lys Val Met Ser Glu Cys Ser Leu Glu Lys Asn  
 1415 1420 1425  
 Glu Arg Ala Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro Leu Thr  
 1430 1435 1440  
 Arg Tyr Met Pro Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Lys Thr Trp  
 1445 1450 1455  
 Thr Phe Val Val Ser Pro Pro Phe Glu Tyr Phe Ile Met Ala Met  
 1460 1465 1470  
 Ile Ala Leu Asn Thr Val Val Leu Met Met Lys Phe Tyr Asp Ala  
 1475 1480 1485  
 Pro Tyr Glu Tyr Glu Leu Met Leu Lys Cys Leu Asn Ile Val Phe  
 1490 1495 1500  
 Thr Ser Met Phe Ser Met Glu Cys Ile Leu Lys Ile Ile Ala Phe  
 1505 1510 1515  
 Gly Val Leu Asn Tyr Phe Arg Asp Ala Trp Asn Val Phe Asp Phe  
 1520 1525 1530  
 Val Thr Val Leu Gly Ser Ile Thr Asp Ile Leu Val Thr Glu Ile  
 1535 1540 1545  
 Ala Asn Asn Phe Ile Asn Leu Ser Phe Leu Arg Leu Phe Arg Ala  
 1550 1555 1560  
 Ala Arg Leu Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly Tyr Thr Ile Arg Ile  
 1565 1570 1575  
 Leu Leu Trp Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala Leu Pro Tyr Val  
 1580 1585 1590  
 Cys Leu Leu Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Ile Ile Gly  
 1595 1600 1605  
 Met Gln Val Phe Gly Asn Ile Ala Leu Asp Asp Asp Thr Ser Ile  
 1610 1615 1620  
 Asn Arg His Asn Asn Phe Arg Thr Phe Leu Gln Ala Leu Met Leu  
 1625 1630 1635  
 Leu Phe Arg Ser Ala Thr Gly Glu Ala Trp His Glu Ile Met Leu  
 1640 1645 1650

ES 2 666 970 T3

Ser Cys Leu Gly Asn Arg Ala Cys Asp Pro His Ala Asn Ala Ser  
 1655 1660 1665

Glu Cys Gly Ser Asp Phe Ala Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile  
 1670 1675 1680

Phe Leu Cys Ser Phe Leu Met Leu Asn Leu Phe Val Ala Val Ile  
 1685 1690 1695

Met Asp Asn Phe Glu Tyr Leu Thr Arg Asp Ser Ser Ile Leu Gly  
 1700 1705 1710

Pro His His Leu Asp Glu Phe Ile Arg Val Trp Ala Glu Tyr Asp  
 1715 1720 1725

Pro Ala Ala Cys Gly Arg Ile Ser Tyr Asn Asp Met Phe Glu Met  
 1730 1735 1740

Leu Lys His Met Ser Pro Pro Leu Gly Leu Gly Lys Lys Cys Pro  
 1745 1750 1755

Ala Arg Val Ala Tyr Lys Arg Leu Val Arg Met Asn Met Pro Ile  
 1760 1765 1770

Ser Asn Glu Asp Met Thr Val His Phe Thr Ser Thr Leu Met Ala  
 1775 1780 1785

Leu Ile Arg Thr Ala Leu Glu Ile Lys Leu Ala Pro Ala Gly Thr  
 1790 1795 1800

Lys Gln His Gln Cys Asp Ala Glu Leu Arg Lys Glu Ile Ser Ser  
 1805 1810 1815

Val Trp Ala Asn Leu Pro Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu Val Pro  
 1820 1825 1830

Pro His Lys Pro Asp Glu Met Thr Val Gly Lys Val Tyr Ala Ala  
 1835 1840 1845

Leu Met Ile Phe Asp Phe Tyr Lys Gln Asn Lys Thr Thr Arg Asp  
 1850 1855 1860

Gln Thr His Gln Ala Pro Gly Gly Leu Ser Gln Met Gly Pro Val  
 1865 1870 1875

Ser Leu Phe His Pro Leu Lys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Gln Pro

ES 2 666 970 T3

1880		1885		1890
Ala Val 1895	Leu Arg Gly	Ala Arg 1900	Val Phe Leu Arg	Gln Lys Ser Ala 1905
Thr Ser 1910	Leu Ser Asn Gly	Gly Ala Ile Gln Thr 1915		Gln Glu Ser Gly 1920
Ile Lys 1925	Glu Ser Leu Ser	Trp Gly Thr Gln Arg 1930		Thr Gln Asp Ala 1935
Leu Tyr 1940	Glu Ala Arg Ala	Pro Leu Glu Arg Gly 1945		His Ser Ala Glu 1950
Ile Pro 1955	Val Gly Gln Ser	Gly Thr Leu Ala Val 1960		Asp Val Gln Met 1965
Gln Asn 1970	Met Thr Leu Arg	Gly Pro Asp Gly Glu 1975		Pro Gln Pro Gly 1980
Leu Glu 1985	Ser Gln Gly Arg	Ala Ala Ser Met Pro 1990		Arg Leu Ala Ala 1995
Glu Thr 2000	Gln Pro Ala Pro	Asn Ala Ser Pro Met 2005		Lys Arg Ser Ile 2010
Ser Thr 2015	Leu Ala Pro Arg	Pro His Gly Thr Gln 2020		Leu Cys Ser Thr 2025
Val Leu 2030	Asp Arg Pro Pro	Pro Ser Gln Ala Ser 2035		His His His His 2040
His Arg 2045	Cys His Arg Arg	Arg Asp Lys Lys Gln 2050		Arg Ser Leu Glu 2055
Lys Gly 2060	Pro Ser Leu Ser	Val Asp Pro Glu Gly 2065		Ala Pro Ser Thr 2070
Ala Ala 2075	Gly Pro Gly Leu	Pro His Gly Glu Gly 2080		Ser Thr Ala Cys 2085
Arg Arg 2090	Asp Arg Lys Gln	Glu Arg Gly Arg Ser 2095		Gln Glu Arg Arg 2100
Gln Pro 2105	Ser Ser Ser Ser	Ser Glu Lys Gln Arg 2110		Phe Tyr Ser Cys 2115

ES 2 666 970 T3

Asp Arg Phe Gly Ser Arg Glu Pro Pro Gln Leu Met Pro Ser Leu  
 2120 2125 2130

Ser Ser His Pro Thr Ser Pro Thr Ala Ala Leu Glu Pro Ala Pro  
 2135 2140 2145

His Pro Gln Gly Ser Gly Ser Val Asn Gly Ser Pro Leu Met Ser  
 2150 2155 2160

Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Gly Arg Gly Gly Arg Arg Gln Leu  
 2165 2170 2175

Pro Gln Thr Pro Leu Thr Pro Arg Pro Ser Ile Thr Tyr Lys Thr  
 2180 2185 2190

Ala Asn Ser Ser Pro Val His Phe Ala Glu Gly Gln Ser Gly Leu  
 2195 2200 2205

Pro Ala Phe Ser Pro Gly Arg Leu Ser Arg Gly Leu Ser Glu His  
 2210 2215 2220

Asn Ala Leu Leu Gln Lys Glu Pro Leu Ser Gln Pro Leu Ala Pro  
 2225 2230 2235

Gly Ser Arg Ile Gly Ser Asp Pro Tyr Leu Gly Gln Arg Leu Asp  
 2240 2245 2250

Ser Glu Ala Ser Ala His Thr Leu Pro Glu Asp Thr Leu Thr Phe  
 2255 2260 2265

Glu Glu Ala Val Ala Thr Asn Ser Gly Arg Ser Ser Arg Thr Ser  
 2270 2275 2280

Tyr Val Ser Ser Leu Thr Ser Gln Ser His Pro Leu Arg Arg Val  
 2285 2290 2295

Pro Asn Gly Tyr His Cys Thr Leu Gly Leu Ser Thr Gly Val Arg  
 2300 2305 2310

Ala Arg His Ser Tyr His His Pro Asp Gln Asp His Trp Cys  
 2315 2320 2325

<210> 5

<211> 7065

<212> ADN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 5

atggtccgct tcggggacga gctaggcggc cgctatgggg gcaccggcgg cggggagcgg

60

ES 2 666 970 T3

gctcggggcg gcggggccgg cggggccgggt ggccccggcc aggggggtct gccgccgggc 120  
cagcgggtcc tgtacaagca gtccattgcg caacgcgcac ggaccatggc cctgtacaac 180  
cccatcccag tcaagcagaa ctgcttcacc gtcaaccgct cgctcttcgt cttcagcgag 240  
gacaacgtcg tccgcaaata tgctaagcgc atcacccaat ggccgccctt cgaatatatg 300  
atcctggcca ccatcatcgc caactgtatt gtccctggccc tggagcagca cctccctgat 360  
ggggacaaga ctccatgctc tgaacgactg gatgacacgg aaccttactt catcggcatc 420  
ttttgcttcg aggcgggcat caagatcata gctctgggct tcgtgttcca caaaggctcc 480  
tacctcogga atggctgtaa cgtcatggac ttcgtggtgg tcctcacagg gattcttgcc 540  
acagctggaa ctgactttga tctgcgcacc ctgagggctg tgcgtgtgct taggcccctg 600  
aagttggtgt ctggaattcc aagcttgacg gtgggtgctca agtccatcat gaaggccatg 660  
gtcccgctgc tgcagatcgg gctgctgctc ttcttcgcca tcctcatggt cgctatcatc 720  
ggcctcagat tctatatggg caaattccat aaggcctgct tccccaacag cacagatgca 780  
gagcctgtgg gtgactttcc ttgtggcaag gagggcccctg ctcgctctgtg tgacagtgac 840  
accgaatgcc gggagtactg gccaggaccc aactttggca tcaccaatth tgacaacatc 900  
ctgtttgcca tcttgaccgt gttccagtgt atcaccatgg agggctggac tgacatcctc 960  
tacaatacaa atgatgcggc cggcaacacg tggaaactgg tgtacttcat ccccctcatc 1020  
atcattggct ccttcttcat gctcaacctg gtgctcggtg tgctttcagg agagtttgcc 1080  
aaagagcggg agcgagtcga gaaccgccgt gccttcctga agctccgcag gcagcagcag 1140  
attgagcgag aactgaatgg gtacttggag tggatcttca aggcggagga agtcatgttg 1200  
gcagaggagg acaagaacgc agaagagaag tcccctttgg atgcagtgtt gaagagagct 1260  
gctaccaaga agagccgaaa tgacctcatc catgcagaag agggggagga ccggtttgta 1320  
gacctctgtg ctgctgggtc tccctttgct cgtgccagcc tcaagagtgg gaagacagag 1380  
agctcatcgt acttccggag gaaggagaag atgttccggg tccttatccg tcgtatggtg 1440  
aaagcacaga gcttctactg ggtggtactg tgcgtggtgg ccctgaacac gttgtgtgtg 1500  
gcatggtac actataatca gcctcagcgg cttaccactg cactgtactt tgcagagttt 1560  
gttttccctg gtctcttctc cacagagatg tccctgaaga tgtacggctc agggcccaga 1620  
agctacttcc ggtcttctc caactgcttt gactttgggg tgattgtggg gagtatcttt 1680  
gaagtgtct gggctgcat caagccagga acctcctcg gaatcagtgt gctgcgggct 1740  
ctccgactgc tgaggattht caaagtcacc aagtattgga actccctgag gaacctggtt 1800  
gtttccctcc tcaactccat gaagtccatc atcagccttc tcttctgct tttccttttc 1860  
attgtggtct tcgctctggt ggggatgacg ctgthtgggg gacagttcaa ctttcaagat 1920

ES 2 666 970 T3

gagactccaa ccaccaatth tgataccttc ccagctgcca tcctcactgt gtttcagatt 1980  
ctgacaggag aggactggaa tgcagtcatt tatcatggga ttgagtcaca aggaggagtc 2040  
agcaaaggca tgttttcatc cttttacttc atcgtcctga cactgtttgg aaactacacc 2100  
ctgttgaacg ttttcttggc cattgctgtg gacaaccttg ccaatgcccc ggagttgacc 2160  
aaggatgaag aggagatgga agaggcagcc aatcagaagc ttgctcttca gaaggccaaa 2220  
gaagtagctg aagtcagccc catgtctgct gccaacatct ccattgctgc ttttgtaaag 2280  
caaaactcag gtaactgtatc tgcagctca tctgtctcca gcgtaaactc accgcagcag 2340  
aaactcggcca aggcgcgctc agtatgggag cagcgggcca gtcagctaag gctccagaac 2400  
ctgcgtgcca gctgtgaggc actgtacagt gagatggacc cggaggagcg cctgcgttat 2460  
gccagcacgc gccacgtgag gccagacatg aagacacaca tggaccgacc cctagtgtg 2520  
gaacctggtc gggatggcct gcggggaccc gccgggaaca agtcaaagcc tgagggcacg 2580  
gaggccaccg aaggtgcgga tccaccacgc cgacaccacc ggcattcgtga tagggacaag 2640  
acctcagcct caaccctgc tggagcgcaa caggacagga cagactgcc aaaggccgaa 2700  
agcaccgaga ccggggcccg ggaggaacgt gcgcgccctc gtcgaagtca cagcaaggag 2760  
gctccagggg ctgacacaca agtgcgttgt gagcgcagta gacgtcacca ccggcgcgga 2820  
tccccggagg aggccactga acgggaacct cggcgcacc gtgccaccg gcacgcacag 2880  
gactcaagca aggaaggcaa ggaggccact gcaccggtgc ttgtacccaa gggcgcgct 2940  
cgcgcaagac atcagggccc gcgtacgggc ccccgtaga cagagaacag tgaggagccc 3000  
acacgcaggc accgtgcaaa gcataaggtg ccaccaacac ttgagcccc agagagggag 3060  
gttgcagaga aggagagcaa cgtggtggaa ggggataagg aaactcgaaa tcaccagccc 3120  
aaggaacctc gctgtgacct ggaggccatt gcggttacag gcgtgggctc tctgcacatg 3180  
ctgcccagca cctgtctcca gaaagtggac gaacagccag aggatgcaga caaccagcgt 3240  
aatgtcaccg ggatgggcag tcagccctca gacccagca ccaactgtca tgtcccagtg 3300  
aactgacag gccctcccgg ggaggccact gtagttccca gtgctaacac ggacctggaa 3360  
ggccaagcgg agggcaagaa ggaggcagag gctgacgatg tgctgagaag aggccccagg 3420  
cccatcgttc cctacagttc catgttctgc ctacgcccc ccaacctact ccgtcgttc 3480  
tgccattaca ttgtgacct gcggtacttt gagatggtga ttcttgggt catgccttg 3540  
agcagcattg ccctggctgc tgaggatccc gtgcggaccg actcattccg gaacaatgct 3600  
ctgaagtaca tggactacat ctttacagga gtcttcacct ttgagatggt cataaagatg 3660  
atagacttgg gcctgctgct gcacctggg gcctacttcc gggacctgtg gaacattctg 3720  
gacttcattg ttgtcagtg agccctggg gcatttgcatt tctcaggatc caaagggaaa 3780  
gacatcaata ccatcaagtc tctgagagtc ctgcgagtc tgccggccct caagaccatc 3840

ES 2 666 970 T3

aagcggctgc ctaaactcaa ggctgtgttt gactgtgtgg tgaactctct gaagaatgtc 3900  
ttgaacatcc tgatcgtcta catgctcttc atgtttatat ttgccgtcat cgccgtccaa 3960  
ctcttcaaag ggaagttctt ttactgcact gatgagtcca aggagctgga gcgggactgc 4020  
aggggtcagt atttggatta tgagaaggaa gaggtagaag cccagccaag gcagtggaag 4080  
aaatatgact tccactatga caatgtgctc tgggccttgc tgactctggt tacggtgtcc 4140  
acaggagagg ggtggcccat ggtgctgaaa cactctgtgg acgccaccta tgaggagcag 4200  
gggccaagcc ccgggtttcg gatggagctt tccatcttct atgtggctca ctttgtggtc 4260  
ttcccttttt tctttgtcaa catctttgtg gccttgatca tcatcacctt ccaggagcag 4320  
ggggacaagg tgatgtctga gtgcagtctg gaaaagaatg agagggcttg cattgacttt 4380  
gccatcagcg ccaaaccctt gacacggctac atgcctcaga acaagcagtc gttccagtat 4440  
aagacatgga catttgtggt ctctccaccc tttgagtact tcattatggc catgatagcc 4500  
ctcaacacag tggtgctgat gatgaagttc tacgatgcc cttatgagta cgagctgatg 4560  
ctgaagtgct tgaacatcgt cttcacatcc atgttctctc tggagtgcac cctgaagatc 4620  
atcgcttcg ggggtttgaa ctacttcaga gatgcctgga acgtctttga ctttgtcact 4680  
gttttgggaa gtattactga tatttttagta acggagattg cggaaacgaa caacttcac 4740  
aacttgagct tccttcgcct cttccgggca gcacggctga tcaagctgct tcgccagggc 4800  
tacaccatcc gcactctggt atggacctt gtccagctct ttaaggcgct gccctacgtg 4860  
tgcctcctca ttgccatgct gttcttcac tacgccatca tcggcatgca ggtttttgga 4920  
aacattgccc ttgatgatgg caccagcacc aaccgacaca acaacttccg gacatttctg 4980  
caagccttaa tgctgttgtt caggagtgcc actggggagg cctggcacga aatcatgctg 5040  
tcttgctcgg gcaaccgggc ctgcgacca catgccaacg ccagcgaatg cgggagcgcac 5100  
tttgctatt tttattttgt ctcttcac ttcctctggt cctttctgat gctgaacctc 5160  
tttgttgctg tgatcatgga caatttcgaa tacctcacgc gggattcttc catcctaggg 5220  
ccgcaccacc tcgatgaatt cattcgcgctc tgggctgaat acgaccagc tgcgtgtggg 5280  
cgcatcagtt acaatgacat gtttgagatg ctgaaacaca tgtcccacc tctgggtttg 5340  
gggaagaaat gcccggtcag agttgcatac aagcgcctgg ttcgaatgaa catgcccata 5400  
tccaatgagg acatgacggt acactttaca tccacactga tggcctcat ccggacggca 5460  
ctggagatca agcttgcccc agcggggaca aacagcacc aatgtgatgc tgagctgagg 5520  
aaggagatct cttctgtgtg ggctaactctg ccccagaaga ctctggactt actggtgcc 5580  
ccccacaaac ctgacgagat gacagtgggg aaggtctatg cggctctcat gatatttgac 5640  
ttctacaaac agaacaaaac caccagagat cagactcacc aagctcctgg aggcctgtcc 5700

ES 2 666 970 T3

cagatgggtc ctgtttccct gttccatcct ctgaaggcca ccctggagca gacacagccc 5760  
gctgtgctcc gaggagctcg ggttttcctt cgacaaaaga gtgcaacttc cctcagcaat 5820  
gggggcgcca taaaaacca ggaaagtggc atcaaggagt ccctgtcctg gggcacgcag 5880  
aggaccacag acgtacttta tgaggccaga gcacctctag aacgtggcca ttctgcagag 5940  
atccctgtgg ggcagccagc agcactggct gtagatgtcc agatgcagaa catgacattg 6000  
agaggaccgg atggggagcc ccagcctggc ctggagagcc aaggccgagc ggcctctatg 6060  
ccacgcctgg cggcagaaac acagccggcc cctaagcca gccccatgaa ggcctccatc 6120  
tccacactgg ctccacgccc gcatgggact cagctttgca acacagtcct ggaccggcca 6180  
cctcctagcc aggtgtccca tcaccaccac caccgctgcc accggcgagc ggacaagaag 6240  
cagaggtccc tggaaaaggg gccagcctg tctgttgaca cagaaggtgc accaagtact 6300  
gctgcaggat ctggcctgcc ccatggagaa gggccacagc gctgccggcg ggagcgtaag 6360  
caagagcgag gccgggtccc ggagcggagg cagccctcct cctcttcttc agagaagcag 6420  
cgcttctatt cctgtgaccg ctttgggagc cgggagcccc cacaacctaa gccctccctc 6480  
agtagccacc ccatatcgcc aacagcggca ctagagccag gaccccaccg gcagggcagc 6540  
ggttccgtta atgggagccc cttgatgtca acatctggcg ctagcacgcc gggccgaggt 6600  
gggcgagggc agtccccca gactcccctg accccacgcc ccagcatcac ctacaagacg 6660  
gccaattcct cgctgtcca ctttgctgag ggtcagagtg gccttcagc cttctcccct 6720  
ggcgtctca gccgoggcct ttctgaacac aatgcctgc tccagaaaga gccctgagc 6780  
cagcctctag cttctggctc ccgcattggc tctgaccctt acctagggca gcgtctggac 6840  
agtgaggcct ctgccacaa cctgcctgag gataactca ctttgaaga ggccgtggcc 6900  
accaactctg gccgctcctc caggacttcc tatgtgtcct ccctcacttc ccaatcccac 6960  
cctctccgcc gtgtacccaa tggctaccac tgcactttgg gactcagcac cggcgtccgg 7020  
gcgcggcaca gctaccacca cccagaccag gatcactggc gctag 7065

<210> 6

<211> 2354

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 6

Met Val Arg Phe Gly Asp Glu Leu Gly Gly Arg Tyr Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg Ala Arg Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Pro  
20 25 30

Gly Gln Gly Gly Leu Pro Pro Gly Gln Arg Val Leu Tyr Lys Gln Ser

ES 2 666 970 T3

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

ES 2 666 970 T3

Gly Pro Asn Phe Gly Ile Thr Asn Phe Asp Asn Ile Leu Phe Ala Ile  
 290 295 300

Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp Thr Asp Ile Leu  
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Asn Asp Ala Ala Gly Asn Thr Trp Asn Trp Leu Tyr Phe  
 325 330 335

Ile Pro Leu Ile Ile Ile Gly Ser Phe Phe Met Leu Asn Leu Val Leu  
 340 345 350

Gly Val Leu Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn  
 355 360 365

Arg Arg Ala Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu  
 370 375 380

Leu Asn Gly Tyr Leu Glu Trp Ile Phe Lys Ala Glu Glu Val Met Leu  
 385 390 395 400

Ala Glu Glu Asp Lys Asn Ala Glu Glu Lys Ser Pro Leu Asp Ala Val  
 405 410 415

Leu Lys Arg Ala Ala Thr Lys Lys Ser Arg Asn Asp Leu Ile His Ala  
 420 425 430

Glu Glu Gly Glu Asp Arg Phe Val Asp Leu Cys Ala Ala Gly Ser Pro  
 435 440 445

Phe Ala Arg Ala Ser Leu Lys Ser Gly Lys Thr Glu Ser Ser Ser Tyr  
 450 455 460

Phe Arg Arg Lys Glu Lys Met Phe Arg Phe Leu Ile Arg Arg Met Val  
 465 470 475 480

Lys Ala Gln Ser Phe Tyr Trp Val Val Leu Cys Val Val Ala Leu Asn  
 485 490 495

Thr Leu Cys Val Ala Met Val His Tyr Asn Gln Pro Gln Arg Leu Thr  
 500 505 510

Thr Ala Leu Tyr Phe Ala Glu Phe Val Phe Leu Gly Leu Phe Leu Thr  
 515 520 525

Glu Met Ser Leu Lys Met Tyr Gly Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Phe Arg  
 530 535 540

ES 2 666 970 T3

Ser Ser Phe Asn Cys Phe Asp Phe Gly Val Ile Val Gly Ser Ile Phe  
545 550 555 560

Glu Val Val Trp Ala Ala Ile Lys Pro Gly Thr Ser Phe Gly Ile Ser  
565 570 575

Val Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys Val Thr Lys Tyr  
580 585 590

Trp Asn Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu Asn Ser Met Lys  
595 600 605

Ser Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe Ile Val Val Phe  
610 615 620

Ala Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe Asn Phe Gln Asp  
625 630 635 640

Glu Thr Pro Thr Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala Ala Ile Leu Thr  
645 650 655

Val Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Ala Val Met Tyr His  
660 665 670

Gly Ile Glu Ser Gln Gly Gly Val Ser Lys Gly Met Phe Ser Ser Phe  
675 680 685

Tyr Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Asn Val  
690 695 700

Phe Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala Gln Glu Leu Thr  
705 710 715 720

Lys Asp Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu  
725 730 735

Gln Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val Ser Pro Met Ser Ala Ala Asn  
740 745 750

Ile Ser Ile Ala Ala Phe Val Lys Gln Thr Arg Gly Thr Val Ser Arg  
755 760 765

Ser Ser Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Gln Asn Ser Ala Lys  
770 775 780

Ala Arg Ser Val Trp Glu Gln Arg Ala Ser Gln Leu Arg Leu Gln Asn  
785 790 795 800

ES 2 666 970 T3

Leu Arg Ala Ser Cys Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Met Asp Pro Glu Glu  
 805 810 815  
 Arg Leu Arg Tyr Ala Ser Thr Arg His Val Arg Pro Asp Met Lys Thr  
 820 825 830  
 His Met Asp Arg Pro Leu Val Val Glu Pro Gly Arg Asp Gly Leu Arg  
 835 840 845  
 Gly Pro Ala Gly Asn Lys Ser Lys Pro Glu Gly Thr Glu Ala Thr Glu  
 850 855 860  
 Gly Ala Asp Pro Pro Arg Arg His His Arg His Arg Asp Arg Asp Lys  
 865 870 875 880  
 Thr Ser Ala Ser Thr Pro Ala Gly Gly Glu Gln Asp Arg Thr Asp Cys  
 885 890 895  
 Pro Lys Ala Glu Ser Thr Glu Thr Gly Ala Arg Glu Glu Arg Ala Arg  
 900 905 910  
 Pro Arg Arg Ser His Ser Lys Glu Ala Pro Gly Ala Asp Thr Gln Val  
 915 920 925  
 Arg Cys Glu Arg Ser Arg Arg His His Arg Arg Gly Ser Pro Glu Glu  
 930 935 940  
 Ala Thr Glu Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Ala His Arg His Ala Gln  
 945 950 955 960  
 Asp Ser Ser Lys Glu Gly Lys Glu Gly Thr Ala Pro Val Leu Val Pro  
 965 970 975  
 Lys Gly Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Gly Pro Arg Thr Gly Pro Arg  
 980 985 990  
 Glu Thr Glu Asn Ser Glu Glu Pro Thr Arg Arg His Arg Ala Lys His  
 995 1000 1005  
 Lys Val Pro Pro Thr Leu Glu Pro Pro Glu Arg Glu Val Ala Glu  
 1010 1015 1020  
 Lys Glu Ser Asn Val Val Glu Gly Asp Lys Glu Thr Arg Asn His  
 1025 1030 1035  
 Gln Pro Lys Glu Pro Arg Cys Asp Leu Glu Ala Ile Ala Val Thr



ES 2 666 970 T3

Thr Ile Lys Arg Leu Pro Lys Leu Lys Ala Val Phe Asp Cys Val  
 1280 1285 1290

Val Asn Ser Leu Lys Asn Val Leu Asn Ile Leu Ile Val Tyr Met  
 1295 1300 1305

Leu Phe Met Phe Ile Phe Ala Val Ile Ala Val Gln Leu Phe Lys  
 1310 1315 1320

Gly Lys Phe Phe Tyr Cys Thr Asp Glu Ser Lys Glu Leu Glu Arg  
 1325 1330 1335

Asp Cys Arg Gly Gln Tyr Leu Asp Tyr Glu Lys Glu Glu Val Glu  
 1340 1345 1350

Ala Gln Pro Arg Gln Trp Lys Lys Tyr Asp Phe His Tyr Asp Asn  
 1355 1360 1365

Val Leu Trp Ala Leu Leu Thr Leu Phe Thr Val Ser Thr Gly Glu  
 1370 1375 1380

Gly Trp Pro Met Val Leu Lys His Ser Val Asp Ala Thr Tyr Glu  
 1385 1390 1395

Glu Gln Gly Pro Ser Pro Gly Phe Arg Met Glu Leu Ser Ile Phe  
 1400 1405 1410

Tyr Val Val Tyr Phe Val Val Phe Pro Phe Phe Phe Val Asn Ile  
 1415 1420 1425

Phe Val Ala Leu Ile Ile Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp Lys  
 1430 1435 1440

Val Met Ser Glu Cys Ser Leu Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile  
 1445 1450 1455

Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro Leu Thr Arg Tyr Met Pro Gln  
 1460 1465 1470

Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe Val Val Ser  
 1475 1480 1485

Pro Pro Phe Glu Tyr Phe Ile Met Ala Met Ile Ala Leu Asn Thr  
 1490 1495 1500

Val Val Leu Met Met Lys Phe Tyr Asp Ala Pro Tyr Glu Tyr Glu  
 1505 1510 1515

ES 2 666 970 T3

Leu Met Leu Lys Cys Leu Asn Ile Val Phe Thr Ser Met Phe Ser  
 1520 1525 1530  
  
 Leu Glu Cys Ile Leu Lys Ile Ile Ala Phe Gly Val Leu Asn Tyr  
 1535 1540 1545  
  
 Phe Arg Asp Ala Trp Asn Val Phe Asp Phe Val Thr Val Leu Gly  
 1550 1555 1560  
  
 Ser Ile Thr Asp Ile Leu Val Thr Glu Ile Ala Glu Thr Asn Asn  
 1565 1570 1575  
  
 Phe Ile Asn Leu Ser Phe Leu Arg Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu  
 1580 1585 1590  
  
 Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly Tyr Thr Ile Arg Ile Leu Leu Trp  
 1595 1600 1605  
  
 Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala Leu Pro Tyr Val Cys Leu Leu  
 1610 1615 1620  
  
 Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Ile Ile Gly Met Gln Val  
 1625 1630 1635  
  
 Phe Gly Asn Ile Ala Leu Asp Asp Gly Thr Ser Ile Asn Arg His  
 1640 1645 1650  
  
 Asn Asn Phe Arg Thr Phe Leu Gln Ala Leu Met Leu Leu Phe Arg  
 1655 1660 1665  
  
 Ser Ala Thr Gly Glu Ala Trp His Glu Ile Met Leu Ser Cys Leu  
 1670 1675 1680  
  
 Gly Asn Arg Ala Cys Asp Pro His Ala Asn Ala Ser Glu Cys Gly  
 1685 1690 1695  
  
 Ser Asp Phe Ala Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile Phe Leu Cys  
 1700 1705 1710  
  
 Ser Phe Leu Met Leu Asn Leu Phe Val Ala Val Ile Met Asp Asn  
 1715 1720 1725  
  
 Phe Glu Tyr Leu Thr Arg Asp Ser Ser Ile Leu Gly Pro His His  
 1730 1735 1740  
  
 Leu Asp Glu Phe Ile Arg Val Trp Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Ala  
 1745 1750 1755

ES 2 666 970 T3

Cys Gly Arg Ile Ser Tyr Asn Asp Met Phe Glu Met Leu Lys His  
 1760 1765 1770  
 Met Ser Pro Pro Leu Gly Leu Gly Lys Lys Cys Pro Ala Arg Val  
 1775 1780 1785  
 Ala Tyr Lys Arg Leu Val Arg Met Asn Met Pro Ile Ser Asn Glu  
 1790 1795 1800  
 Asp Met Thr Val His Phe Thr Ser Thr Leu Met Ala Leu Ile Arg  
 1805 1810 1815  
 Thr Ala Leu Glu Ile Lys Leu Ala Pro Ala Gly Thr Lys Gln His  
 1820 1825 1830  
 Gln Cys Asp Ala Glu Leu Arg Lys Glu Ile Ser Ser Val Trp Ala  
 1835 1840 1845  
 Asn Leu Pro Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu Val Pro Pro His Lys  
 1850 1855 1860  
 Pro Asp Glu Met Thr Val Gly Lys Val Tyr Ala Ala Leu Met Ile  
 1865 1870 1875  
 Phe Asp Phe Tyr Lys Gln Asn Lys Thr Thr Arg Asp Gln Thr His  
 1880 1885 1890  
 Gln Ala Pro Gly Gly Leu Ser Gln Met Gly Pro Val Ser Leu Phe  
 1895 1900 1905  
 His Pro Leu Lys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Gln Pro Ala Val Leu  
 1910 1915 1920  
 Arg Gly Ala Arg Val Phe Leu Arg Gln Lys Ser Ala Thr Ser Leu  
 1925 1930 1935  
 Ser Asn Gly Gly Ala Ile Gln Thr Gln Glu Ser Gly Ile Lys Glu  
 1940 1945 1950  
 Ser Leu Ser Trp Gly Thr Gln Arg Thr Gln Asp Val Leu Tyr Glu  
 1955 1960 1965  
 Ala Arg Ala Pro Leu Glu Arg Gly His Ser Ala Glu Ile Pro Val  
 1970 1975 1980  
 Gly Gln Pro Gly Ala Leu Ala Val Asp Val Gln Met Gln Asn Met

ES 2 666 970 T3

1985					1990					1995				
Thr	Leu	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Leu	Glu	Ser
2000					2005					2010				
Gln	Gly	Arg	Ala	Ala	Ser	Met	Pro	Arg	Leu	Ala	Ala	Glu	Thr	Gln
2015					2020					2025				
Pro	Ala	Pro	Asn	Ala	Ser	Pro	Met	Lys	Arg	Ser	Ile	Ser	Thr	Leu
2030					2035					2040				
Ala	Pro	Arg	Pro	His	Gly	Thr	Gln	Leu	Cys	Asn	Thr	Val	Leu	Asp
2045					2050					2055				
Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	His	His	His	Arg	Cys	
2060					2065					2070				
His	Arg	Arg	Arg	Asp	Lys	Lys	Gln	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Gly	Pro
2075					2080					2085				
Ser	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Gly
2090					2095					2100				
Ser	Gly	Leu	Pro	His	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Cys	Arg	Arg	Glu
2105					2110					2115				
Arg	Lys	Gln	Glu	Arg	Gly	Arg	Ser	Gln	Glu	Arg	Arg	Gln	Pro	Ser
2120					2125					2130				
Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Lys	Gln	Arg	Phe	Tyr	Ser	Cys	Asp	Arg	Phe
2135					2140					2145				
Gly	Ser	Arg	Glu	Pro	Pro	Gln	Pro	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Ser	His
2150					2155					2160				
Pro	Ile	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Gln
2165					2170					2175				
Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Thr	Ser	Gly
2180					2185					2190				
Ala	Ser	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Gly	Arg	Arg	Gln	Leu	Pro	Gln	Thr
2195					2200					2205				
Pro	Leu	Thr	Pro	Arg	Pro	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys	Thr	Ala	Asn	Ser
2210					2215					2220				

ES 2 666 970 T3

Ser Pro Val His Phe Ala Glu Gly Gln Ser Gly Leu Pro Ala Phe  
 2225 2230 2235

Ser Pro Gly Arg Leu Ser Arg Gly Leu Ser Glu His Asn Ala Leu  
 2240 2245 2250

Leu Gln Lys Glu Pro Leu Ser Gln Pro Leu Ala Ser Gly Ser Arg  
 2255 2260 2265

Ile Gly Ser Asp Pro Tyr Leu Gly Gln Arg Leu Asp Ser Glu Ala  
 2270 2275 2280

Ser Ala His Asn Leu Pro Glu Asp Thr Leu Thr Phe Glu Glu Ala  
 2285 2290 2295

Val Ala Thr Asn Ser Gly Arg Ser Ser Arg Thr Ser Tyr Val Ser  
 2300 2305 2310

Ser Leu Thr Ser Gln Ser His Pro Leu Arg Arg Val Pro Asn Gly  
 2315 2320 2325

Tyr His Cys Thr Leu Gly Leu Ser Thr Gly Val Arg Ala Arg His  
 2330 2335 2340

Ser Tyr His His Pro Asp Gln Asp His Trp Cys  
 2345 2350

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Conus geographus*

<220>

<221> MOD\_RES

<222> 4, 10, 21

<223> Xaa=hidroxiprolina

10 <400> 7

Cys Lys Ser Xaa Gly Ser Ser Cys Ser Xaa Thr Ser Tyr Asn Cys Cys  
 1 5 10 15

Arg Ser Cys Asn Xaa Tyr Thr Lys Arg Cys Tyr  
 20 25

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada, que tiene las siguientes características:
- (a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,
  - (b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,
  - (c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones o más, y
  - (d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones.
2. La célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada según la reivindicación 1, en la que dicha "supresión o inactivación del gen del canal de calcio de tipo N" es una supresión o inactivación que se dirige contra el gen que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N.
3. La célula madre neuronal según la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizada por que se muestra que dicha célula madre neuronal es positiva para nestina incluso después del paso durante 4 generaciones.
4. La célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dicha célula madre neuronal tiene una elevada capacidad de proliferación y una elevada capacidad de formación de esferas incluso después del paso durante 4 generaciones.
5. Un método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada, en el que dicho método de fabricación comprende:
- (A) una etapa de preparar un animal no humano genéticamente modificado que tiene suprimido o inactivado el gen de canal de calcio de tipo N,
  - (B) una etapa de aislar una célula madre neuronal a partir de tejido obtenido de dicho animal no humano genéticamente modificado, y
  - (C) según se desee, una etapa de subcultivar además dicha célula madre neuronal aislada,
- y en el que dicha "célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada" tiene las siguientes características:
- (a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,
  - (b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,
  - (c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones o más, y
  - (d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones.
6. Un método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada, en el que dicho método de fabricación comprende:
- (J) una etapa de preparar *in vitro* una célula madre neuronal,
  - (K) una etapa de suprimir o inactivar el gen del canal de calcio de tipo N de dicha célula madre neuronal, y
  - (H) según se desee, una etapa de subcultivar además dicha célula madre neuronal que tiene suprimido o inactivado el gen del canal de calcio de tipo N,
- y en el que dicha "célula madre neuronal que tiene capacidad de paso incrementada" tiene las siguientes características:
- (a) el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido o inactivado en dicha célula,
  - (b) el flujo de  $Ca^{2+}$  vía el canal de calcio de tipo N (1) está sustancialmente ausente cuando el gen del canal de calcio de tipo N está suprimido, o (2) está suprimido cuando el gen del canal de calcio de tipo N está inactivado en dicha célula,

(c) dicha célula se puede pasar durante al menos 4 generaciones o más, y

(d) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones.

5 7. El método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada según la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que dicha "supresión o inactivación del gen del canal de calcio de tipo N" es una supresión o inactivación dirigida contra el gen que codifica la subunidad  $\alpha 1B$  del canal de calcio de tipo N.

8. El método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada según la reivindicación 5, en el que dicho animal no humano modificado genéticamente es un roedor.

10 9. El método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada según la reivindicación 6, en el que la célula madre neuronal en dicha etapa (J) es una célula derivada de un ser humano.

10. El método para fabricar una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada según la reivindicación 6, en el que la célula madre neuronal en dicha etapa (J) es una célula madre neuronal preparada mediante inducción de la diferenciación de una célula ES o iPS en una célula madre neuronal.

15 11. Un método para cultivar células madre neuronales para incrementar la capacidad de paso de células madre neuronales, que comprende

(X) una etapa de preparar una célula madre neuronal, e

(Y) una etapa de cultivar dicha célula madre neuronal en condiciones que inhiban el canal de calcio de tipo N.

20 12. El método de cultivo según la reivindicación 11, en el que dicha "etapa de cultivar en condiciones que inhiban el canal de calcio de tipo N" comprende una etapa de aplicar a una célula un agente que inhibe el canal de calcio de tipo N.

13. El método de cultivo según la reivindicación 12, en el que dicho agente es  $\omega$ -conotoxina GVIA y/o proteína ciclina.

25 14. El método de cultivo según la reivindicación 11, en el que dicha "etapa de cultivar en condiciones que inhiban el canal de calcio de tipo N" comprende una etapa de aplicar a una célula un agente que inhiba la transcripción o traducción del gen del canal de calcio de tipo N.

15. El método de cultivo según la reivindicación 14, en el que dicho agente es ARNhp o ARNpi.

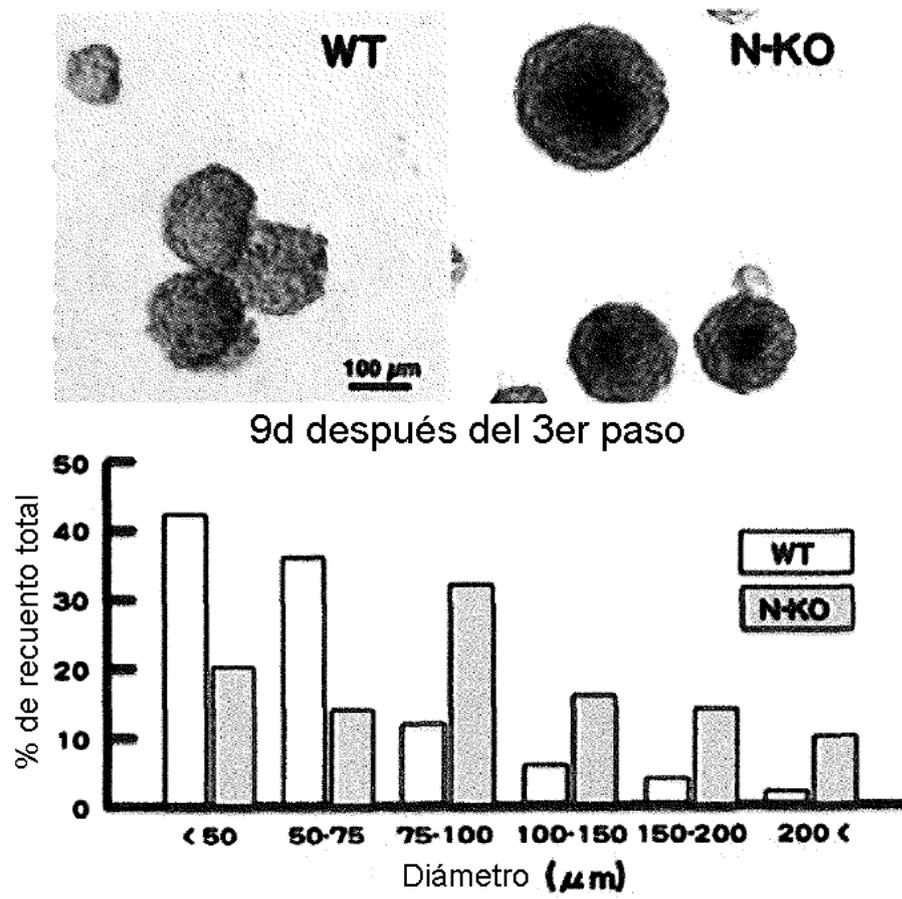
16. Una célula madre nerviosa que tiene capacidad de paso incrementada, que tiene las siguientes características:

(a) el canal de calcio de tipo N es inhibido en dicha célula cultivándola en condiciones que inhiban el canal de calcio de tipo N,

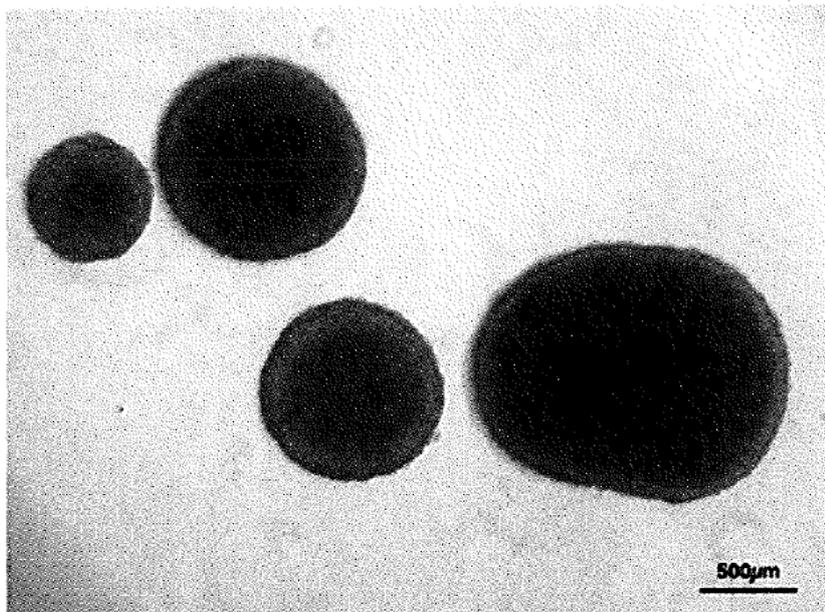
30 (b) se muestra que dicha célula es positiva para nestina incluso después del paso durante 4 generaciones, y

(c) dicha célula mantiene el potencial de diferenciación en una célula nerviosa incluso después del paso durante 4 generaciones.

[Figura 1]

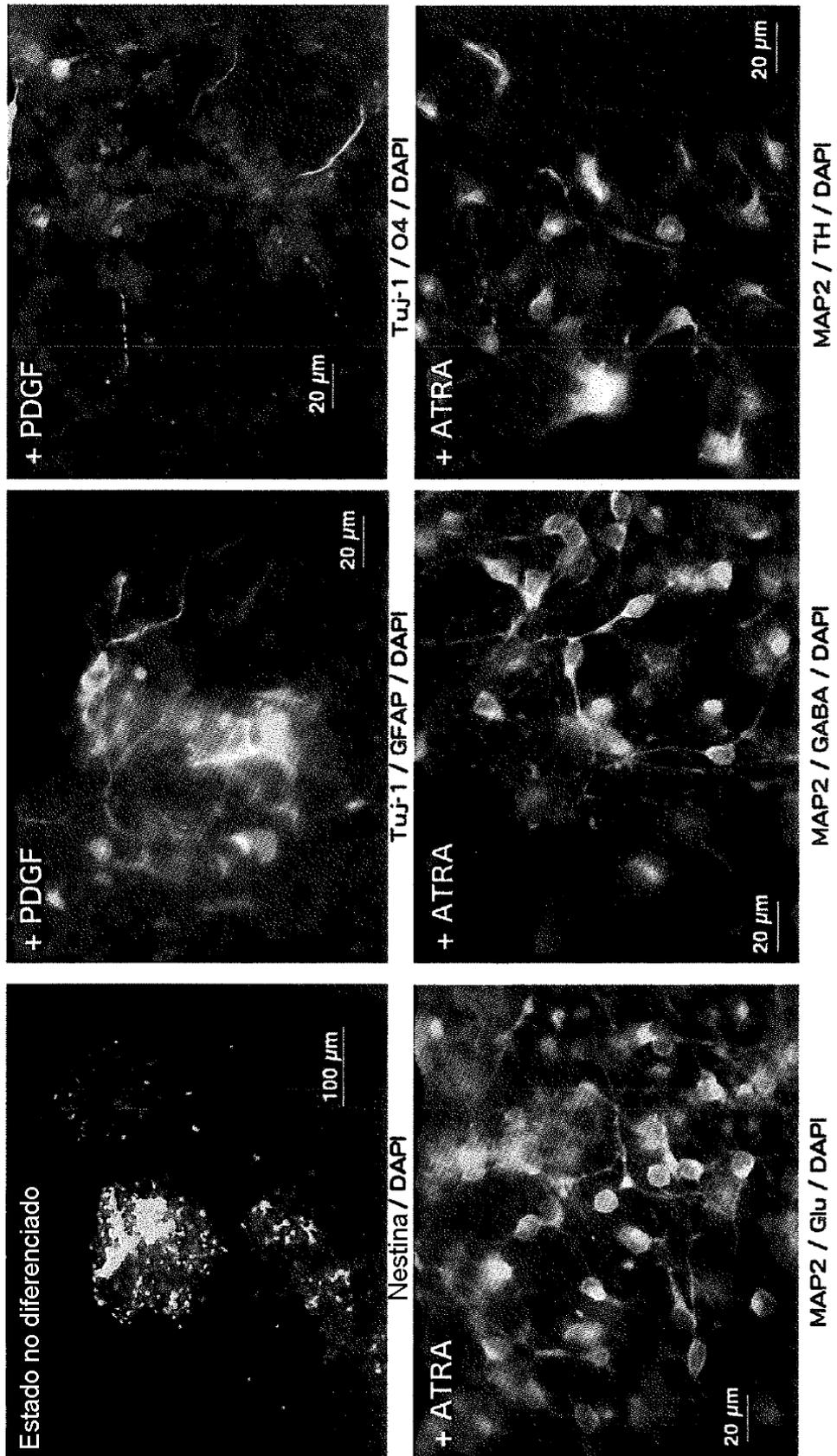


[Figura 2]

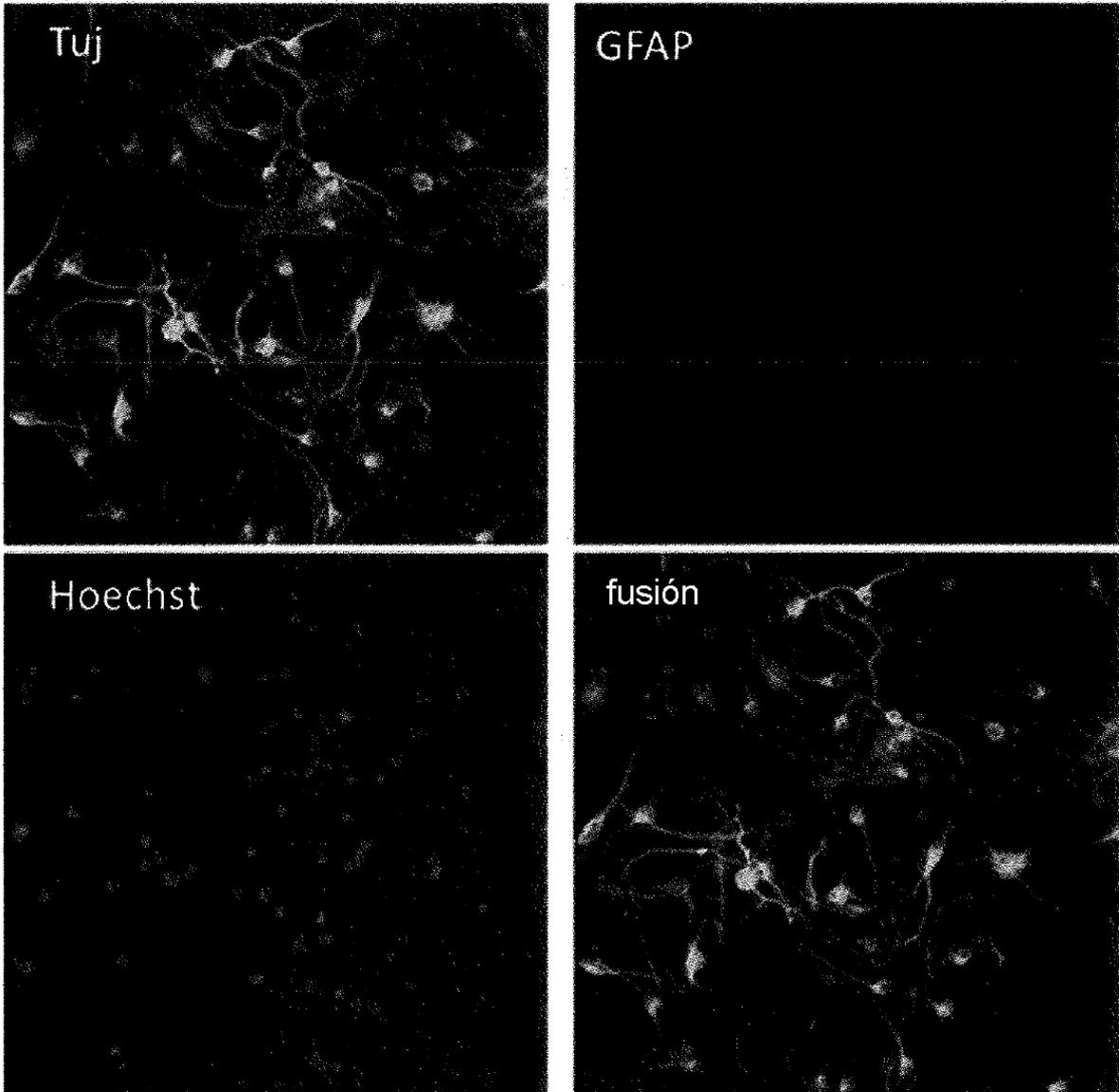


10d después del 5º paso

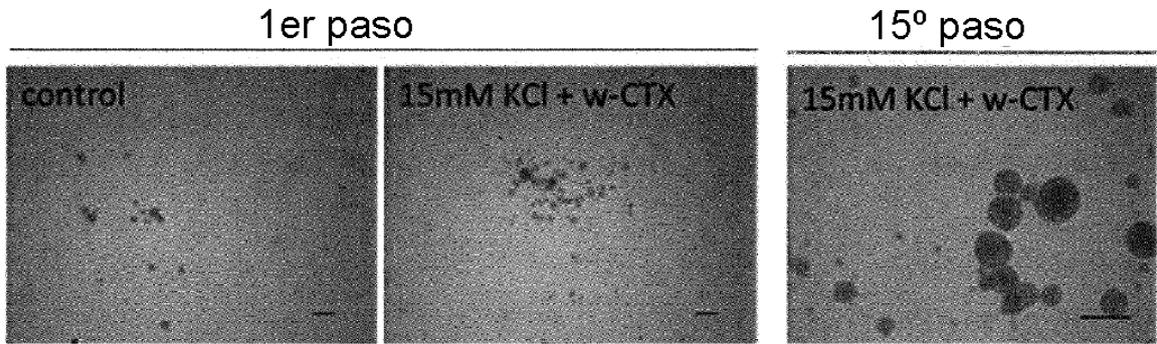
[Figura 3]



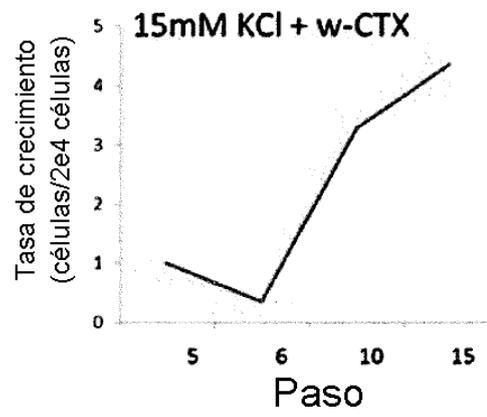
[Figura 4]



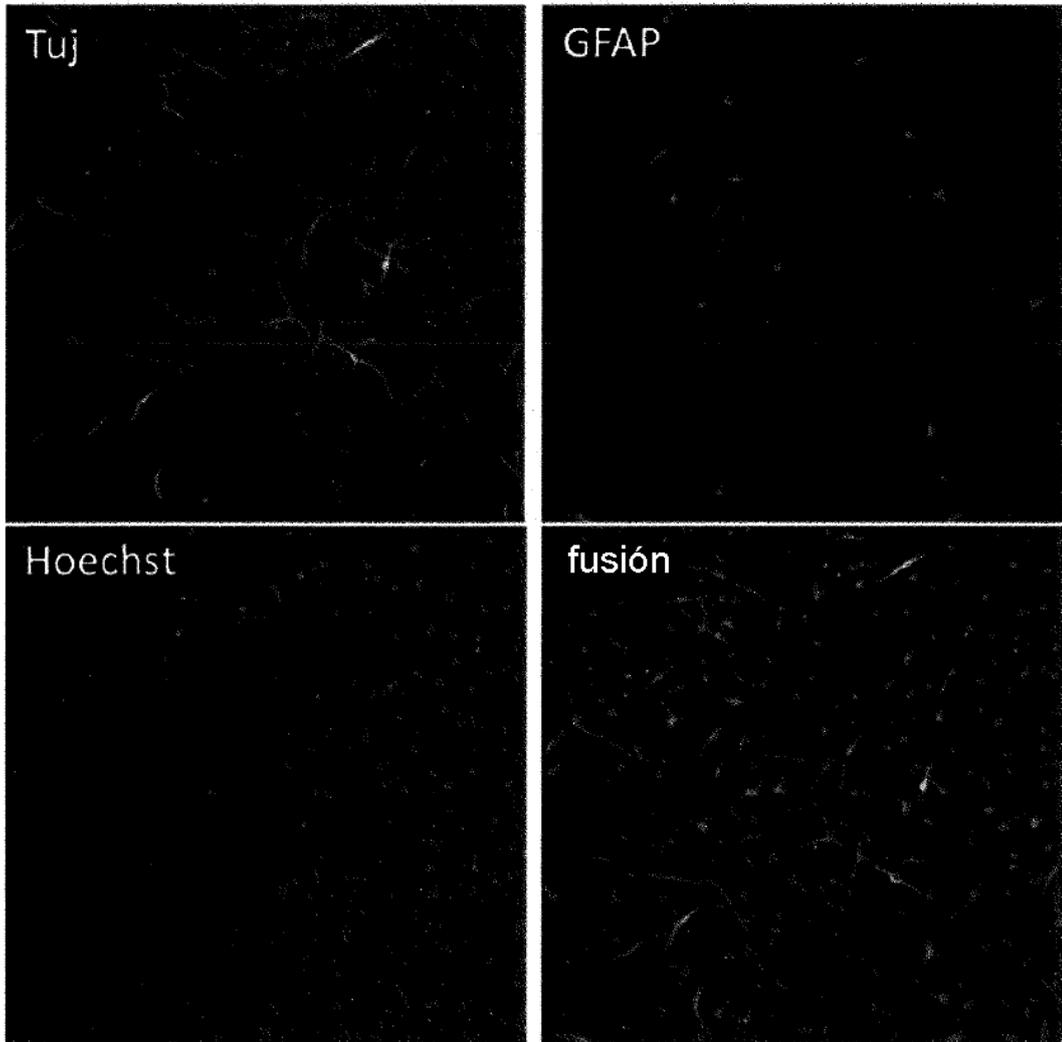
[Figura 5]



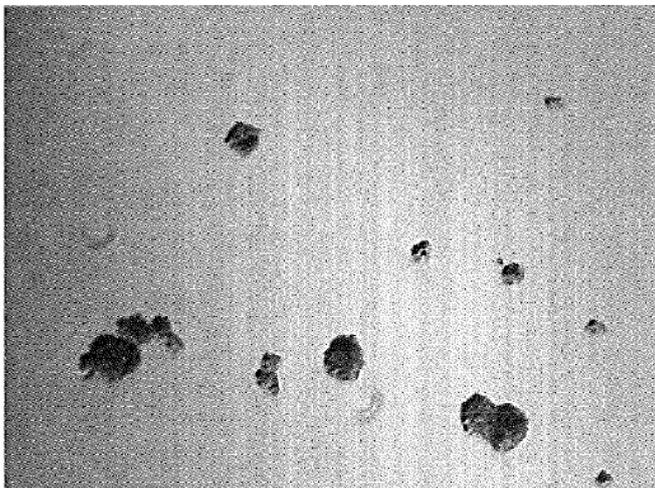
\*La barra representa 200 um



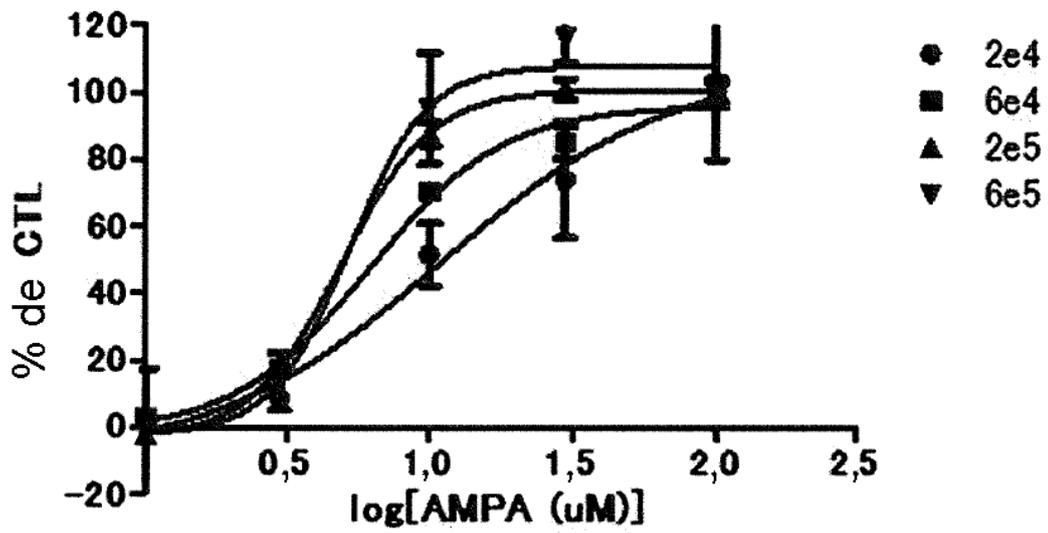
[Figura 6]



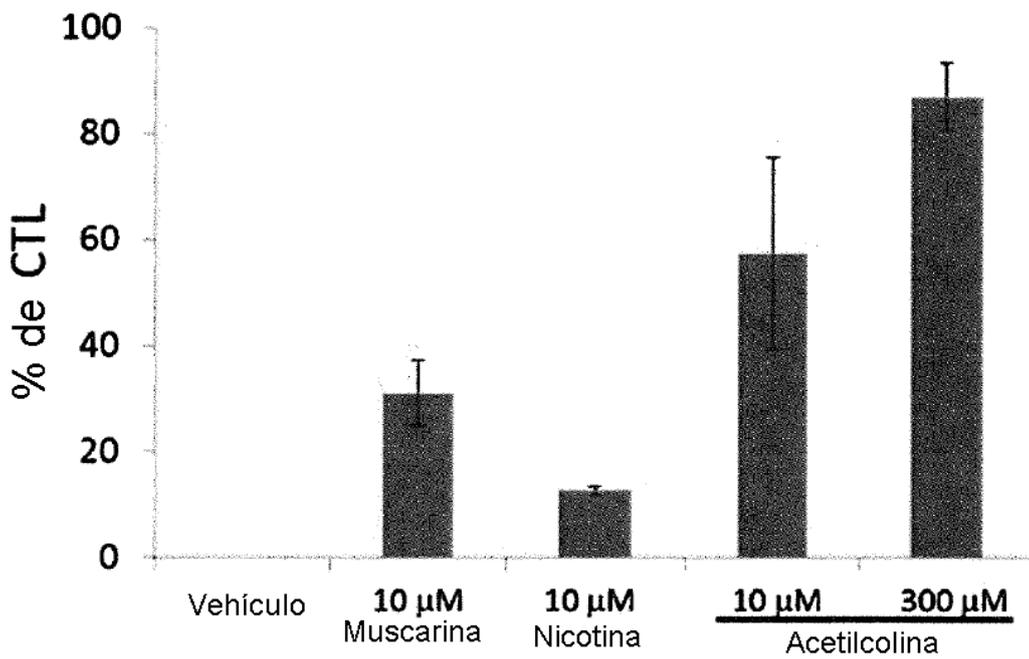
[Figura 7]



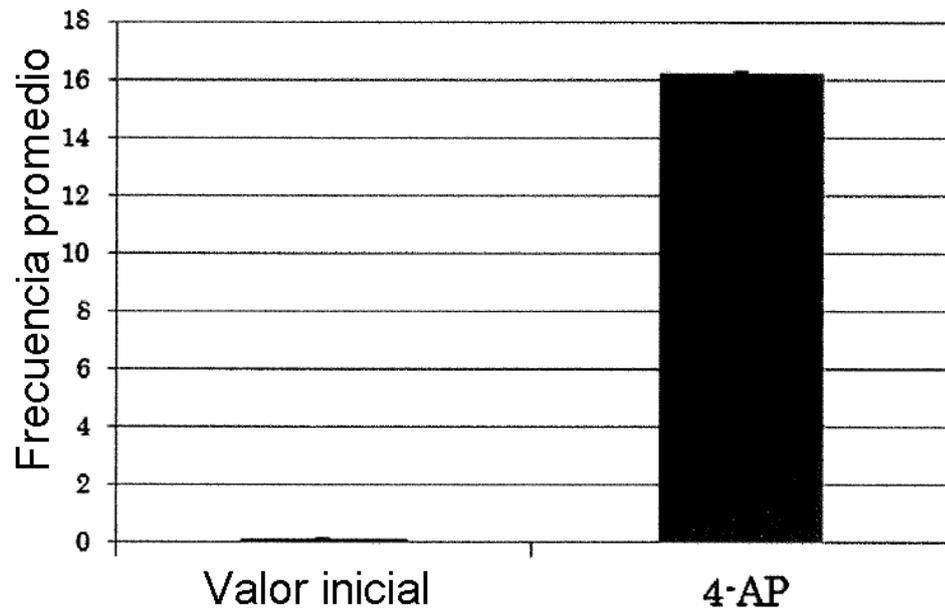
[Figura 8]



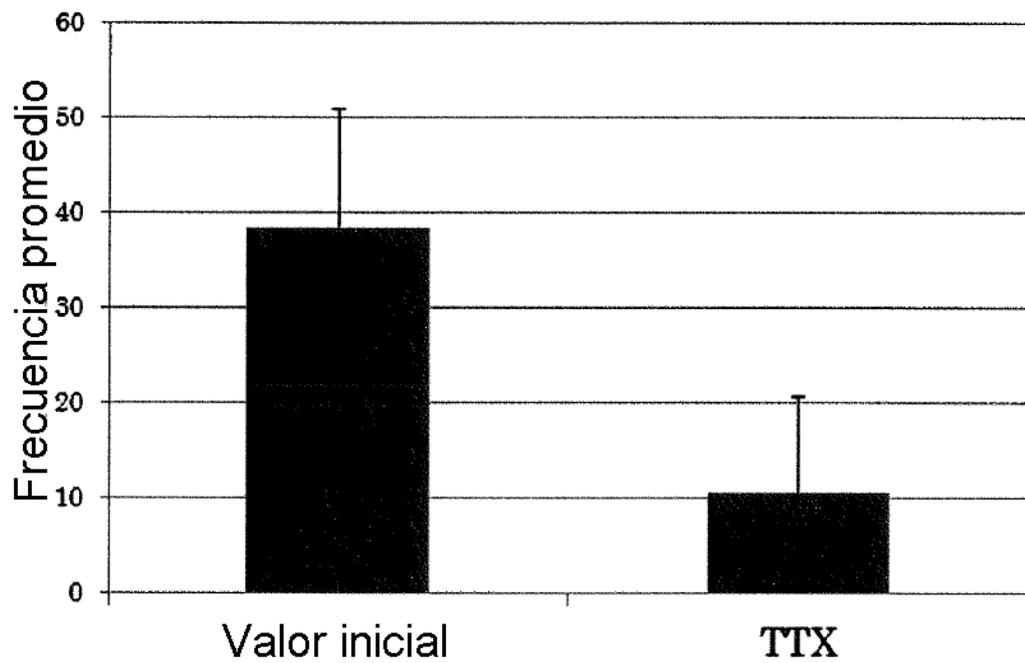
[Figura 9]



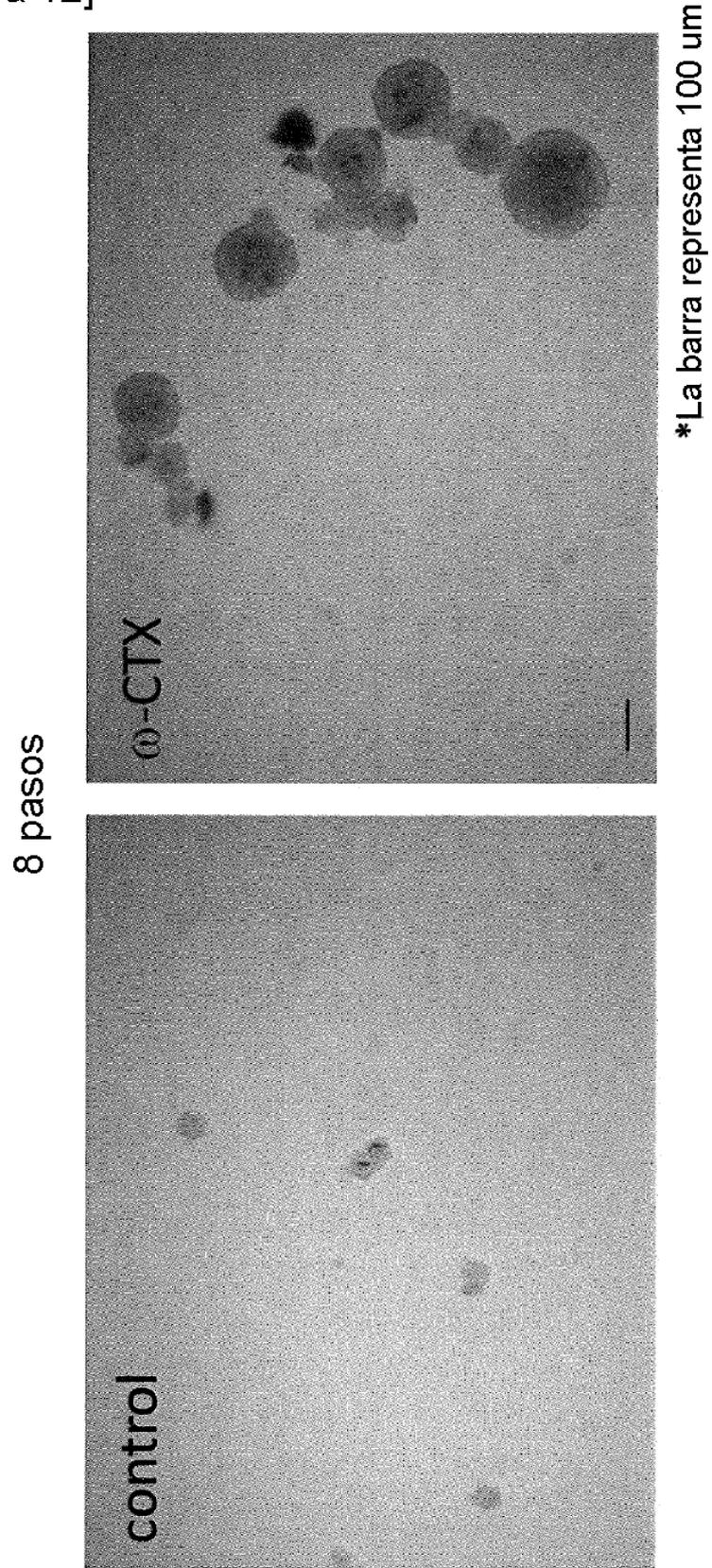
[Figura 10]



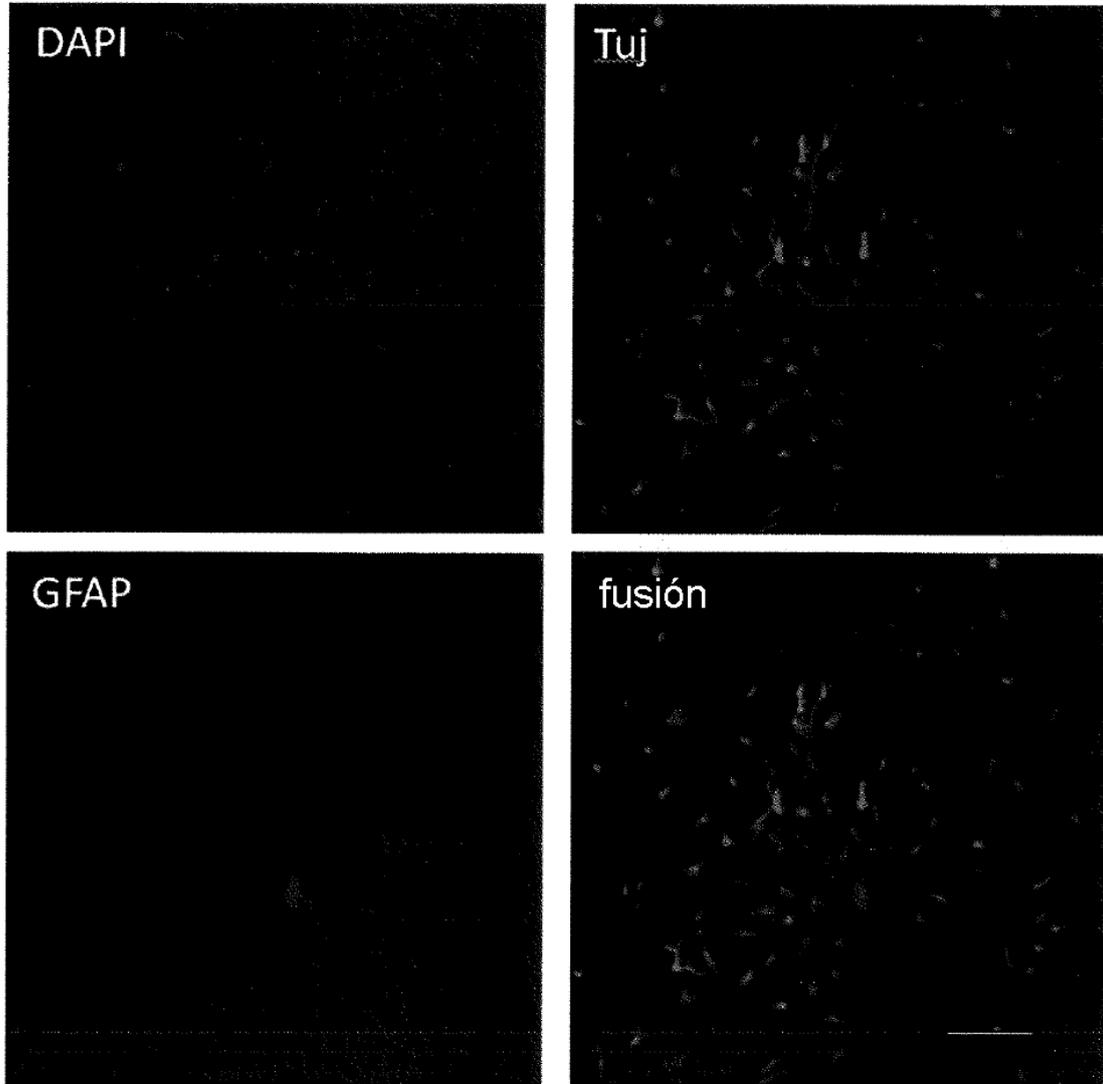
[Figura 11]



[Figura 12]



[Figura 13]



\* La barra representa 100 um