



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 964**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02777190 .6**

86 Fecha de presentación : **24.09.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1430308**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Procedimiento de screening que utiliza BNPI para diferentes indicaciones.**

30 Prioridad: **24.09.2001 DE 101 47 006**
25.09.2001 DE 101 47 028

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Grünenthal GmbH**
Zieglerstrasse 6
52078 Aachen, DE

72 Inventor/es: **Weihe, Eberhard y**
Schäfer, Martin, K.-H.

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

Procedimiento de screening que utiliza BNPI para diferentes indicaciones.

5 La invención se refiere a un procedimiento para encontrar sustancias farmacéuticamente relevantes utilizando BNPI o biomoléculas derivadas de éste.

10 La localización de los lugares de ataque de principios activos farmacéuticos, denominados “dianas” (*targets*), es una de las más importantes misiones de la investigación farmacéutica moderna. Debido a las afinidades con estas dianas o también a los efectos fisiológicos provocados por una interacción con estas dianas, mediante los llamados “procedimientos de screening” (rastreo) se pueden seleccionar de entre las numerosas sustancias conocidas, por ejemplo de bibliotecas de sustancias de investigación farmacéutica, sustancias o tipos de sustancias interesantes que, con mucha probabilidad, serán eficaces en las indicaciones asociadas a la diana correspondiente. Entre los ejemplos más importantes de estas dianas se encuentran proteínas, en general receptores, en particular receptores acoplados a la proteína G, y proteínas de transporte. Sin embargo, la localización de estas dianas es, en parte, muy difícil, ya que la selección potencial es muy amplia. Para la orientación y la identificación se emplean, por una parte, los conocimientos sobre la función (fisiológica) según la posición (potencial) en cascadas de señales y rutas metabólicas, pero, por otra parte, también se emplea la localización y el grado de expresión en los diferentes tejidos. En el marco de esta invención, se fija especial atención al sistema nervioso central, donde no sólo es importante una localización general, sino también una distribución muy específica y precisa en las diferentes regiones.

20 Si bien en el estado actual de la técnica se discuten procedimientos para la localización de dianas, en ningún caso se ha descrito una relación entre el BNPI, principios activos derivados de éste y determinadas indicaciones. Por ejemplo, el documento WO 01/64835 A da a conocer secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos obtenidas en base a proyectos de secuenciación, y también de forma general e indeterminada un procedimiento para la identificación de principios activos que se unen a los polipéptidos publicados. El procedimiento de screening (rastreo) mostrado en el documento WO 01/64835 A utiliza en principio cualquiera de las más de 27.000 secuencias mencionadas, pero no establece ninguna relación entre éstas y una indicación determinada, ni describe principios activos identificados a través de estos procedimientos de screening (rastreo).

30 La publicación US-A-5 985 604 da a conocer la secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos de “*human sodium-dependent phosphate cotransporters*” NAPTR (cotransportadores de fosfato dependiente de sodio humanos). El documento US-A-5 985 604 también describe procedimientos para la preparación de este polipéptido y para la detección del polipéptido a partir de una muestra. Sin embargo, dicho documento no describe ningún procedimiento para la identificación de principios activos que se unen con NAPTR, ni tampoco describe ninguna relación con indicaciones determinadas.

40 El documento WO 01/57190 A describe la “*human epidermal protein-1*” (proteína-1 epidérmica humana) aislada de cérvix adulta y procedimientos para la detección de polinucleótidos o polipéptidos de “*epidermal protein-1*” humana en una muestra. El documento WO 01/57190 A no describe el BNPI ni establece ninguna relación entre el BNPI e indicaciones determinadas.

45 Por consiguiente, el objetivo de la invención consistía en la localización e identificación de una o más dianas de este tipo, en particular con localización y eficacia en el sistema nervioso central, y en el desarrollo del procedimiento de screening (rastreo) correspondiente. En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para la localización de sustancias farmacéuticamente relevantes con eficacia en las indicaciones o para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de las neuronas motoras espinales, atrofas musculares, distrofias musculares o esclerosis múltiple, con los siguientes pasos de procedimiento:

50 (a) incubación de una sustancia a ensayar bajo condiciones adecuadas con como mínimo una biomolécula del grupo I seleccionada entre:

55 la proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f), 1h) y/o una proteína similar a una de estas proteínas como mínimo en un 90%, y/o una proteína que codifica un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g) o un polinucleótido similar a éste en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g) o a su polinucleótido antisentido,

60 y/o una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas o biomoléculas del grupo I anteriormente mencionadas,

65 (b) medida de la unión de la sustancia de ensayo con la o las biomoléculas del grupo I dado el caso sintetizadas en una célula, o con una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las biomoléculas del grupo I anteriormente mencionadas, o medida de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia de ensayo con la o las biomoléculas del grupo I, dado el caso sintetizadas por una célula, o con una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las biomoléculas del grupo I anteriormente mencionadas,

mediante la medida de la regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales iónicos y/o enzimas, en particular mediante la medida de la modificación de la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, mediante la modificación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero, o

- 5 mediante la medida de la unión por el desplazamiento de un ligando marcado conocido de la biomolécula y/o proteína y/o mediante la actividad de una sustancia de ensayo marcada unida a ésta.

Este nuevo procedimiento de screening (rastreo) se basa en que se puede encontrar la eficacia medicinal potencial de una sustancia a través de su interacción con como mínimo una estructura proteínica o peptídica fisiológicamente relevante, una diana, BNPI o estructuras relacionadas. El BNPI se denomina VGLUT1 en la literatura y, en parte, también en esta invención. Por consiguiente, estos términos se han de considerar como completamente equivalentes, sobre todo en el marco de esta invención. En el marco de la presente invención, como dianas interesantes se identificaron el BNPI o las proteínas o los péptidos derivados de éste aquí citados, o ácidos nucleicos que codifican los mismos. El BNPI presentaba una localización en las áreas del SNC más diversas, pero sorprendentemente - a pesar de una cercanía estrechísima en parte - también presentaba una localización siempre separada de forma estricta, indicando claramente esta separación estricta que a través del BNPI se controlan importantes procesos fisiológicos. El BNPI (VGLUT1) se expresa fuertemente en una amplia población de neuronas DRG grandes, que son negativas a la sustancia P. En cambio, el DNPI (VGLUT2) afín, o su mRNA, se encuentra sobre todo en las neuronas medianas y pequeñas positivas a la sustancia P. La localización de VGLUT1 (BNPI) es totalmente independiente de la localización del transportador VGLUT3 afín. Dado que el BNPI está localizado en áreas del SNC muy interesantes desde el punto de vista terapéutico y que, en consecuencia, es interesante para múltiples indicaciones asociadas, el BNPI constituye así una diana importante con la que se pueden llevar a cabo procedimientos de screening (rastreo) de compuestos farmacológicamente eficaces. En consecuencia, también es preferible utilizar en un procedimiento de screening (rastreo) BNPI o una de las biomoléculas derivadas de éste, como proteínas o péptidos, o un ácido nucleico que codifica las mismas, o el resultado de dos procedimientos de screening (rastreo) llevados a cabo con BNPI o una de las biomoléculas derivadas de éste, como proteínas o péptidos, o un ácido nucleico que codifica las mismas, e identificar en ambos casos, por comparación diferencial de los datos, sustancias farmacológicamente eficaces que, en tal caso, son altamente específicas.

Los conceptos “farmacéuticamente relevante” o “farmacológicamente eficaz” se refieren a una influencia potencialmente curativa o paliativa de la sustancia sobre determinados cuadros clínicos. El término “sustancia” incluye cualquier compuesto adecuado como principio activo medicamentoso, principalmente principios activos de bajo peso molecular, pero también otros como ácidos nucleicos, grasas, azúcares, péptidos o proteínas como anticuerpos.

Por “incubación bajo condiciones adecuadas” se ha de entender que la sustancia a examinar puede reaccionar con la biomolécula o con la célula o el preparado correspondiente en un medio acuoso durante un tiempo determinado antes de la medida. La temperatura del medio acuoso se puede regular, por ejemplo entre 4°C y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente o a 37°C. El tiempo de incubación puede variar entre unos segundos y varias horas, dependiendo de la interacción de la sustancia con la biomolécula o proteína. No obstante son preferentes tiempos de incubación de 1 minuto a 60 minutos. El medio acuoso puede contener sales y/o sistemas tampón adecuados, de modo que durante la incubación el medio tenga un pH por ejemplo entre 6 y 8, preferentemente un pH 7,0-7,5. También se pueden añadir al medio otras sustancias adecuadas como coenzimas, nutrientes, etc. Los especialistas pueden determinar fácilmente las condiciones adecuadas en función de la interacción examinada de la sustancia con la proteína basándose en su experiencia, en la literatura o en unos pocos ensayos preliminares sencillos, con el fin de obtener el valor de medida más claro posible en el procedimiento.

Una célula que ha sintetizado una proteína o biomolécula determinada es una célula que ya ha expresado esta proteína de forma endógena o una célula que ha sido modificada por ingeniería genética de tal modo que expresa esta proteína o biomolécula y, por tanto, contiene la proteína antes del comienzo del procedimiento según la invención. Las células pueden ser células de líneas celulares dado el caso inmortalizadas o células nativas procedentes de tejidos y aisladas de éstos, estando la agrupación celular disuelta en la mayoría de los casos. El preparado de estas células incluye principalmente materiales homogeneizados de células, el citosol, una fracción de membrana celular con fragmentos de membrana, una suspensión de orgánulos celulares aislados, etc.

La especie de procedencia de estas proteínas o biomoléculas carece de importancia para la función del procedimiento, pero es preferible utilizar la variante humana, de ratón o de rata. El BNPI es conocido en cuanto a la secuencia de DNA codificadora y la secuencia de aminoácidos y también se ha descrito su función general. El BNPI, “*brain Na⁺ dependent inorganic phosphate cotransporter*” (cotransportador de fosfato inorgánico dependiente de Na⁺ cerebral), se describe en el documento WO 96/34288. Además de la función como transportador de fosfato dependiente de sodio, también se ha descrito una función del BNPI como transportador de glutamato vesicular, habiéndose denominado el BNPI como VGlutT1 (Bellocchio y col. (2000), Science 189:957-960; Takamori y col. (2000), Nature 407; 189-194).

Las etapas por las cuales el procedimiento permite hallar sustancias de interés consisten bien en la unión a la biomolécula o a la proteína, que se puede comprobar por el desplazamiento de un ligando conocido o por la magnitud de la sustancia unida, o bien en la modificación de un parámetro funcional a través de la interacción de la sustancia con la proteína o la biomolécula. Esta interacción puede consistir principalmente en una regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales iónicos y/o enzimas, y los parámetros funcionales modificados pueden ser, por ejemplo, la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, o la variación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero.

ES 2 276 964 T3

A continuación, para aclarar la invención, además de las explicaciones conceptuales dadas en el texto general, se muestran otras definiciones con el fin de establecer claramente cómo se han de entender e interpretar en el sentido de esta invención determinados conceptos utilizados principalmente en las reivindicaciones.

- 5 - *Sustancia*: Este término hace referencia a un compuesto químico. Más concretamente, aquí se trata de compuestos que pueden desarrollar potencialmente un efecto en el cuerpo, principios activos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, grasas, azúcares, péptidos o proteínas, en este caso sobre todo principios activos de bajo peso molecular.
- 10 - *Sustancia farmacéuticamente relevante*: En el sentido de la invención, una sustancia farmacéuticamente relevante es una sustancia que, a través de la unión a las biomoléculas de los grupos I a III, podría ser eficaz en como mínimo una de las indicaciones mencionadas y que teóricamente tiene potencial para influir fisiológicamente de forma directa o indirecta en los síntomas, en particular que parece que se pueda utilizar terapéuticamente, por ejemplo en un medicamento.
- 15 - *Regulador del dolor*: En el sentido de la invención, “regulador del dolor” significa que la sustancia influye directa o indirectamente en la percepción del dolor, en particular que actúa como analgésico de forma natural.
- 20 - *Dolor*: En el sentido de la invención, “dolor” significa principalmente una sensación de dolor, más concretamente dolor agudo, crónico, neuropático e inflamatorio, incluyendo migraña, en particular un dolor perteneciente a los siguientes tipos:
 - 25 dolor crónico, en particular dolor musculoesquelético; dolor neuropático, en particular dolor alodí-nico, hiperalgesia mecánica o neuropatía diabética; dolor visceral, dolor cerebral, dolor periférico o dolor condicionado por inflamación, en particular dolor inflamatorio periférico; y también migrañas, cefaleas agrupada o dolor en caso de una neuralgia del trigémino.
- 30 - *Incubación*: Por “incubación” se entiende que un objeto de estudio biológico, por ejemplo una célula o una proteína, se introduce y se deja en un medio a temperatura regulada, por ejemplo en una estufa incubadora o sobre un baño de agua. En este contexto, por el concepto “condiciones adecuadas” se entiende una incubación bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo 37°C, pH 7,2) o bajo las condiciones que permiten una medida óptima en el procedimiento.
- 35 - *Célula*: La célula es un sistema autorregulado, abierto, que se encuentra en equilibrio dinámico con su entorno mediante el intercambio permanente de materiales, con metabolismo propio y capacidad de repro-ducción. La célula se puede cultivar por separado o puede formar parte de un tejido, en particular de un órgano, y encontrarse en éste de forma aislada o todavía en una agrupación celular.
- 40 - *Preparado celular*: Por este concepto se entienden preparados producidos mediante métodos químicos, biológicos, mecánicos o físicos con modificación de la estructura celular, por ejemplo fragmentos de mem-brana, compartimentos celulares aislados, citosol aislado, o material homogeneizado obtenido de tejido.
- 45 - *Péptido*: Compuesto de aminoácidos unidos en cadenas mediante enlaces peptídicos. Un oligopéptido con-siste en 2 a 9 aminoácidos, un péptido consiste en 10 a 100 aminoácidos.
- *Proteína*: Compuesto de más de 100 aminoácidos unidos en cadenas mediante enlaces peptídicos, even-tualmente con una estructura espacial definida.
- 50 - *PIM1-quinasa; PIM3-quinasa*: un protooncogén y una serina-treonina-quinasa.
- *Polinucleótido*: El nucleótido que sirve de base es un componente básico de los ácidos nucleicos que consis-te fundamentalmente en una base de nucleína, pentosa y ácido fosfórico. Corresponde a un polinucleótido de alto peso molecular de varios nucleótidos unidos entre sí a través de esterificación de la ácido fosfórico-pentosa. Pero en esta invención se utilizan también polinucleótidos modificados que, si bien conservan la sucesión de bases, disponen de un esqueleto modificado en lugar de la ácido fosfórico-pentosa.
- 55 - *Similar en como mínimo un 90(95,97)%*: Este concepto significa que la sucesión de bases de la región codificadora de los polinucleótidos incluidos es idéntica a la de referencia (figura, etc.) en como mínimo un 90% (95%, 97%), y que la sucesión de aminoácidos de la estructura primaria de los péptidos y proteínas incluidos es idéntica a la referencia en como mínimo un 90% (95%, 97%).
- 60 - *Gen*: Con el término “gen” se designa una sección de genoma con una secuencia de nucleótidos definida que incluye la información para la síntesis de un mRNA o pre-mRNA o de un RNA de otro tipo (por ejemplo tRNA, rRNA, snRNA, etc.). Consiste en secciones codificadoras y no codificadoras.
- 65 - *Fragmento de gen*: Sección de ácido nucleico que incluye en su sucesión de bases una región parcial de un gen.

ES 2 276 964 T3

- *Biomolécula*: Término general para ácidos nucleicos o poliaminoácidos, en particular también DNA, RNA, péptidos y proteínas, pudiendo estas moléculas también estar modificadas de forma artificial. En el sentido de esta invención, el término se refiere preferentemente a péptidos y proteínas.
- 5 - *Unión al péptido o proteína*: Interacción entre la sustancia y el péptido o proteína que conduce a la fijación.
- *Parámetros funcionales*: Por este concepto se entienden magnitudes de medida de un experimento que están en correlación con la función de una proteína (canal iónico, receptor, enzima).
- 10 - *Manipulado por ingeniería genética*: Manipulación de células, tejidos u organismos de tal modo que se introduce material genético en los mismos.
- *Expresado de forma endógena*: Expresión de una proteína que presenta una línea celular bajo condiciones de cultivo adecuadas, sin que dicha expresión de la proteína haya sido inducida mediante manipulación por ingeniería genética.
- 15 - *Proteína G*: Abreviatura internacional habitual para una proteína que se une a guanosin-trifosfato (GTP), que se activa como proteína de señal a través de receptores acoplados a la proteína G.
- 20 - *Gen indicador*: Designación general para genes cuyos productos genéticos se pueden comprobar fácilmente con ayuda de sencillos métodos bioquímicos o histoquímicos, por ejemplo luciferasa, fosfatasa alcalina o *Green Fluorescent Protein* (GFP) (proteína fluorescente verde).
- *Constructo de DNA (recombinante)*: Designación general para todo tipo de moléculas de DNA formadas por ligadura *in vitro* de moléculas de DNA.
- 25 - *Vector de clonación*: Designación general para moléculas de ácido nucleico que durante la clonación actúan como portadores de genes extraños o de partes de estos genes.
- 30 - *Vector de expresión*: Designación para vectores de clonación contruidos especialmente, los cuales, después de introducirlos en una célula huésped adecuada, permiten la transcripción y traducción del gen extraño incorporado por clonación en el vector.
- *Secuencia LTR*: Abreviatura de *long terminal repeat*. Designación general para regiones de secuencia más largas que se encuentran en ambos extremos de un genoma lineal. Estas regiones de secuencia se encuentran, por ejemplo, en el genoma de retrovirus y en los extremos de transposones eucarióticos.
- 35 - *Cola poli-A*: Los restos adenilo (aproximadamente 20-250) fijados en el extremo 3' de RNA mensajeros mediante poliadenilación.
- 40 - *Secuencia promotora*: Designación para una región de secuencia de DNA a partir de la cual se controla la transcripción de un gen, es decir, la síntesis de mRNA.
- *Secuencia ORI*: Abreviatura de *origin of replication* (origen de replicación). La secuencia ORI permite que una molécula de DNA se reproduzca como unidad autónoma en la célula.
- 45 - *Secuencia intensificadora*: Designación para elementos genéticos relativamente cortos, que se presentan en parte en forma de repeticiones y que en general refuerzan la expresión de algunos genes en diferente medida.
- 50 - *Factor de transcripción*: Designación para una proteína que influye en la transcripción de un gen a través de una unión con secuencias de DNA específicas.
- *Cultivar*: Mantener células o tejidos bajo condiciones de cultivo adecuadas.
- 55 - *Condiciones que permiten la expresión*: Por este concepto se entiende la selección y aplicación de condiciones de cultivo que permiten la expresión de la proteína de interés, entre las que se encuentran la modificación de la temperatura, el cambio de medio, la adición de sustancias inductoras, la supresión de sustancias inhibidoras.
- 60 - *Tiempo de incubación*: Tiempo durante el cual las células o tejidos son incubados, es decir, sometidos a una temperatura determinada.
- *Presión de selección*: Aplicación de condiciones de cultivo que proporcionan una ventaja de crecimiento a las células con un producto genético determinado, el denominado marcador de selección.
- 65 - *Célula de anfibio*: Célula de un animal de la clase *Amphibia*.

ES 2 276 964 T3

- *Célula bacteriana*: Célula asignable al dominio de las eubacterias o arqueobacterias, o procedente del mismo.
- *Célula de levadura*: Célula asignable al orden de los *Endomycetales*, o procedente del mismo.
- *Célula de insecto*: Célula asignable al orden de los *Hexapoda*, o procedente del mismo.
- *Célula de mamífero nativa*: Célula procedente de un mamífero, cuyas características relevantes corresponden a las de la célula que se encuentra en el organismo.
- *Célula de mamífero immortalizada*: Célula que, mediante las condiciones de cultivo aplicadas o mediante manipulación por ingeniería genética, ha adquirido la propiedad de dividirse en el cultivo más allá de la frecuencia de división habitual (aproximadamente 100).
- *Marcado*: Hecho accesible mediante modificación o derivación correspondiente para una reacción de comprobación. Por ejemplo, radiactivo, fluorescente o luminiscente.
- *Ligando*: Sustancia que se une a una molécula que se encuentra en el cuerpo o en una célula, especialmente un receptor.
- *Desplazamiento*: Separación total o parcial de un ligando de su sitio de unión.
- *Actividad relacionada*: Valor de medida registrado bioquímica o físicamente, que está en correlación con la cantidad de ligando unida a un receptor.
- *Regulación*: La inhibición o activación de un proceso como parte de un proceso de regulación.
- *Inhibición*: Como caso especial de regulación, impedimento/reducción de un proceso.
- *Activación*: Como caso especial de regulación, intensificación de un proceso.
- *Receptores*: En el sentido más amplio, todas las moléculas presentes en el organismo procariota o eucariota a las que se puede unir un principio activo. Más concretamente, proteínas o complejos de varias proteínas unidos a la membrana, los cuales provocan una modificación en la célula mediante la unión de un principio activo.
- *Canales iónicos*: Proteínas o complejos de varias proteínas unidos a la membrana, a través de los cuales la membrana puede ser atravesada por cationes o aniones.
- *Enzimas*: Designación para proteínas o complejos de un componente activador no albuminoide con una proteína, que poseen propiedades catalíticas.
- *Expresión genética (expresar/expresable)*: La traducción de la información genética de un gen en RNA (expresión de RNA) o en una proteína (expresión de proteína).
- *Medio iónico*: Concentración de uno o más iones en un compartimento determinado.
- *Potencial de membrana*: Diferencia de tensión a través de una membrana a causa de un exceso de cationes en un lado de la membrana y de aniones en el otro.
- *Modificación de la actividad enzimática*: Inhibición o inducción de la actividad catalítica de una enzima.
- *2º mensajero*: Molécula pequeña que se forma en el citosol o penetra en el mismo como respuesta a una señal extracelular y ayuda a transmitir la información al interior de la célula, por ejemplo cAMP, IP₃.
- *Sonda (genética)*: Designación para todo tipo de ácidos nucleicos con cuya ayuda se puede detectar un gen buscado o una secuencia de DNA determinada. Además, mediante derivación de la sonda genética (por ejemplo biotina, perlas magnéticas, digoxinina) se pueden extraer moléculas de DNA de una mezcla. Como sondas se utilizan genes clonados, fragmentos de genes, oligonucleótidos sintetizados químicamente y también RNA, que en la mayoría de los casos está marcado de forma radiactiva.
- *DNA*: Designación internacional para el ácido desoxirribonucleico.
- *DNA genómico*: Designación general para el DNA procedente del núcleo de una célula en organismos eucariotas.
- *cDNA*: Abreviatura de *complementary DNA* (DNA complementario). Designación para la copia de DNA de cadena simple o doble de una molécula de RNA.

ES 2 276 964 T3

- *Banco/biblioteca de cDNA*: Designación para una colección de fragmentos de cDNA clonados de forma arbitraria, que en conjunto representan la totalidad de los RNAs sintetizados de una célula o un tejido.
- 5 - *Clon de cDNA*: Designación para una población de células genéticamente uniformes que se derivan de una única célula, conteniendo esta célula un fragmento de cDNA incorporado de forma artificial.
- *Hibridación*: Formación de una molécula de ácido nucleico de cadena doble a partir de dos cadenas simples independientes mediante emparejamiento de bases.
- 10 - *Condiciones estrictas*: Condiciones bajo las que sólo se forman cadenas de ácido nucleico con un emparejamiento de bases perfecto y que permanecen estables.
- *Aislar*: Localizar y separar de una mezcla una molécula buscada.
- 15 - *Secuenciación de DNA*: Determinación de la sucesión de bases de una molécula de DNA.
- *Secuencia de ácido nucleico*: Designación para la estructura primaria de una molécula de DNA, es decir, la sucesión de las bases individuales de las que está compuesto un DNA.
- 20 - *Cebador de oligonucleótido específico de gen*: Ácidos oligonucleicos, es decir, fragmentos de ácido nucleico con una longitud de 10-40 bases, que permiten, en su composición de bases, una hibridación estricta en el gen o el cDNA buscado.
- *Descubrimiento de cebadores de oligonucleótido*: La búsqueda manual o asistida por ordenador de oligonucleótidos para una secuencia de DNA predeterminada, que sean óptimamente adecuados para una hibridación y/o para una reacción en cadena de polimerasa.
- 25 - *PCR*: Abreviatura de reacción en cadena de polimerasa. Procedimiento *in vitro* para el enriquecimiento selectivo de regiones de ácido nucleico de longitud y secuencia definidas de una mezcla de moléculas de ácido nucleico.
- 30 - *DNA-molde*: Molécula de ácido nucleico o mezcla de moléculas de ácido nucleico a partir de las cuales se multiplica una sección de DNA con ayuda de una PCR (véase más arriba).
- 35 - *RNA*: Abreviatura internacional usual para los ácidos ribonucleicos.
- *mRNA*: Abreviatura internacional usual para los ácidos ribonucleicos mensajeros, que intervienen en la transferencia de la información genética del núcleo a la célula y contienen la información para la síntesis de un polipéptido o de una proteína.
- 40 - *Polinucleótido antisentido*: Molécula consistente en varios ácidos nucleicos naturales o modificados, cuya sucesión de bases es complementaria a la sucesión de bases de una región parcial de un RNA presente en la naturaleza.
- 45 - *PNA*: Abreviatura internacional usual de *peptidic nucleic acids* (ácidos nucleicos peptídicos). En este contexto, los aminoácidos enlazados peptídicamente forman una cadena, portando los aminoácidos, como cadena lateral, una base apta para la hibridación con DNA o RNA.
- *Secuencia*: Sucesión de nucleótidos o aminoácidos. En el sentido específico de esta invención, con este término se hace referencia a la secuencia de ácidos nucleicos.
- 50 - *Ribozima*: Designación para un ácido ribonucleico catalíticamente activo (por ejemplo ligasa, endonucleasa, polimerasa, exonucleasa).
- 55 - *DNA-enzima*: Designación para una molécula de DNA que posee actividad catalítica (por ejemplo ligasa, endonucleasa, polimerasa, exonucleasa).
- *RNA/DNA catalítico*: Designación general para ribozimas o DNA-enzimas (véase más arriba).
- 60 - *Adenovirus*: Virus citopatógenos presentes en los vertebrados.
- *Virus adenoasociado (AAV)*: Forma parte de la familia de los parvovirus. Para lograr una reproducción eficaz del AAV es necesaria una coinfección de las células huésped con virus auxiliares (por ejemplo herpesvirus, virus de la vaccinia o adenovirus). La propiedad del AAV de integrarse de forma estable en el genoma huésped lo hace especialmente interesante como vector de transducción para células de mamíferos.
- 65 - *Herpesvirus*: Patógeno viral de la infección herpes.

ES 2 276 964 T3

- *Modificación postraducciona*l: Modificación en proteínas o polipéptidos realizada después de la traducción, por ejemplo fosforilación, glicosilación, amidación, acetilación o proteolisis.
- 5 - *Glicosilar*: Designación para la acción de añadir moléculas de azúcar individuales o cadenas de azúcares completas a proteínas.
- *Fosforilar*: Designación para la acción de añadir uno o más restos fosfato a una proteína, preferentemente a los grupos OH de los aminoácidos serina, treonina o tirosina.
- 10 - *Amidar*: Designación para la acción de transformar una función carboxilo en una función amida, por ejemplo en el resto aminoácido carboxi-terminal de un péptido o proteína.
- *Proveer de anclaje de membrana*: Modificación postraducciona
- 15 - *Proveer de anclaje de membrana*: Modificación postraducciona
- *Segmentar*: En este caso específico, la segmentación de un péptido o proteína en varias subsecuencias.
- *Acortar*: Acortar en una o varias partes una molécula consistente en varias partes individuales.
- 20 - *Anticuerpos*: Proteínas solubles o unidas a membranas celulares, designadas como inmunoglobulinas, con un sitio de unión específico para antígenos.
- *Anticuerpos monoclonales*: Anticuerpos con una selectividad extremadamente alta dirigidos contra un único determinante antigénico de un antígeno.
- 25 - *Anticuerpos policlonales*: Mezcla de anticuerpos dirigidos contra varios determinantes de un antígeno.
- *Transgénico*: Modificado genéticamente.
- 30 - *Mamífero no humano*: La totalidad de los mamíferos (clase de los Mammalia) excepto la especie humana.
- *Célula germinal*: Célula con genoma haploide que permite la formación de un nuevo organismo mediante fusión con una segunda célula germinal.
- 35 - *Célula somática*: Célula diploide como componente de un organismo.
- *Introducción cromosómica*: Intervención en la secuencia de nucleótidos a nivel cromosómico.
- 40 - *Genoma*: Definición general de la totalidad de los genes de un organismo.
- *Ascendiente del animal*: Un animal (el ascendiente) que, por transmisión de su material genético de forma natural o artificial, está emparentado en línea directa con otro (el descendiente).
- 45 - *Expresable*: Una molécula de ácido nucleico es expresable cuando incluye la información para la síntesis de un polipéptido o de una proteína y está provista de secuencias reguladoras correspondientes que permiten la síntesis de este polipéptido o proteína *in vitro* o *in vivo*. Cuando ya no se dan estas condiciones, por ejemplo por intervención en la secuencia codificadora, la molécula de ácido nucleico ya no es expresable.
- 50 - *Roedor*: Animal del orden de los Rodentia, por ejemplo la rata o el ratón.
- *Identificable como sustancia reguladora del dolor*: Sustancia que al ser incorporada en un organismo vivo produce un cambio de comportamiento que los especialistas designan como inhibidor del dolor (antinociceptivo, antihiperálgico o antialodínico). En el caso del procedimiento de screening (rastreo), este concepto se refiere a que la sustancia, durante el rastreo, debido a una mayor unión o provocación de una variación de un parámetro funcional, supera claramente, por ejemplo en un 100%, a la unión o la interacción de la media de las sustancias ensayadas.
- 55 - *Compuesto*: Otro nombre para una molécula consistente en varios átomos. En este caso una molécula identificable mediante el procedimiento según la invención.
- 60 - *Principio activo*: Un compuesto que al ser administrado a un organismo provoca un cambio en dicho organismo. Por este concepto se entienden principalmente moléculas sintetizadas de forma orgánico-química que tienen un efecto curativo en el organismo. En este caso se trata en particular de moléculas que se unen a las proteínas y péptidos según la invención.
- 65 - *De bajo peso molecular*: Molécula con un peso molecular < 2 kDa.

- *Medicamento*: Una sustancia correspondiente a la definición dada en el Artículo 1 §2 de la Ley Reguladora del Tráfico de Medicamentos.
- *Diagnóstico*: Compuesto o procedimiento a utilizar para diagnosticar una enfermedad.
- *Tratamiento del dolor*: Procedimiento destinado a mitigar o eliminar dolores, o para inhibir la posible aparición de dolores (analgesia preventiva).
- *Dolor crónico*: Una sensación de dolor de duración prolongada, frecuentemente caracterizada porque va más allá del momento y el lugar del estímulo inicial y aumenta la sensibilidad del cuerpo al dolor.
- *Terapia genética*: Por “terapia genética” se entienden todos los procedimientos que tienen el objetivo de tratar de forma causal enfermedades genéticas mediante modificaciones adecuadas del genoma.
- *Terapia genética in vivo*: Introducción de material genético en el organismo vivo con el objetivo de la terapia genética. Se puede distinguir entre intervención somática e intervención en la línea germinal, que tienen lugar en un caso en células diploides y en otro caso en células haploides.
- *Terapia genética in vitro*: Introducción de material genético en células fuera del cuerpo humano con el fin de usar éstas posteriormente para la terapia genética introduciéndolas de nuevo en el cuerpo humano.
- *Diagnosis*: Procedimiento para identificar una enfermedad.
- *Análisis de eficacia*: Análisis para examinar la eficacia de un compuesto después de su actuación en un organismo vivo.

En una forma de realización preferente del procedimiento, la célula se manipula por ingeniería genética antes del paso (a). En este proceso se introduce material genético en la célula, en particular una o más secuencias de polinucleótidos. En otra variante preferente de esta forma de realización, la manipulación por ingeniería genética permite la medición de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la sustancia de ensayo. En esta forma de realización, mediante manipulación por ingeniería genética se crean condiciones que permiten medir o mejorar la medida de la variación de un parámetro funcional. En este contexto es especialmente preferente que, mediante la manipulación por ingeniería genética, se exprese una proteína G no expresada de forma endógena en la célula o se introduzca un gen indicador. Por este concepto se ha de entender principalmente la introducción por ingeniería genética de una proteína G no presente de forma endógena o no expresada fisiológicamente (proteína de unión a GTP) en la célula, por ejemplo la introducción de una proteína G quimérica, que permite una modificación de la vía de señales, o de una proteína G promiscua, que tiene mucha facilidad de unión. La introducción de un gen indicador permite a su vez medir una expresión inducida (provocada de forma extracelular) del producto genético.

En otra forma de realización preferente, la célula se manipula por ingeniería genética de tal modo que contenga como mínimo un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, preferentemente en como mínimo un 95%, en particular en como mínimo un 97%. De este modo se puede lograr, por ejemplo, que la célula sintetice una proteína que no es expresada de forma endógena en la célula o en el preparado utilizados en el procedimiento. En este contexto es especialmente preferente que el polinucleótido esté contenido en un constructo de DNA recombinante. Por el concepto “constructo de DNA (recombinante)” se entiende una molécula de DNA producida *in vitro*.

Si en el procedimiento la célula se manipula por ingeniería genética antes del paso a), es preferible cultivar la célula después de la manipulación genética y antes del paso (a) bajo condiciones que permitan una expresión, dado el caso bajo presión de selección. Por “cultivar” se entiende mantener células o tejidos en condiciones que aseguran la supervivencia de las células o de su siguiente generación. Las condiciones deberían elegirse de tal modo que permitan una expresión del material introducido mediante manipulación por ingeniería genética. Para ello, el pH, el contenido en oxígeno y la temperatura se deberían mantener en niveles fisiológicos y se deberían añadir suficientes nutrientes y los cofactores necesarios. La presión de selección permite cultivar únicamente aquellas células en las que la manipulación por ingeniería genética ha tenido éxito como mínimo en parte. En este concepto se incluye, por ejemplo, la incorporación de una resistencia a los antibióticos a través del constructo de DNA.

En el procedimiento según la invención es especialmente preferente que la célula utilizada consista en una célula de anfibio, célula bacteriana, célula de levadura, de insecto o una célula de mamífero inmortalizada o nativa. Como ejemplos se mencionan: como células de anfibio, oocitos de *Xenopus*; como células bacterianas, células de *E. coli*; como células de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*; como células de insecto, células Sf9; como células de mamífero inmortalizadas, células HeLa; y como células de mamífero nativas, la célula CHO (*Chinese Hamster Ovary* - ovario de hámster chino).

En un método de medida utilizado para determinar la unión de la sustancia a la biomolécula o proteína en el procedimiento según la invención, la medida de la unión se realiza mediante el desplazamiento de un ligando marcado conocido de la biomolécula o de la proteína y/o mediante la actividad relacionada de una sustancia de ensayo marcada. El ligando es una molécula que se une a la proteína con una alta especificidad y que es desplazada del sitio de unión por

una sustancia a ensayar que también se une a la proteína. Por “marcado” se ha de entender una modificación artificial en la molécula que facilita su detección. Los marcados son por ejemplo radiactivos, fluorescentes o luminiscentes.

En otro método de medida preferente para determinar la modificación de los parámetros funcionales provocada por la unión de la sustancia a la proteína en el procedimiento según la invención, la medida de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la sustancia de ensayo se realiza mediante la medición de la regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales iónicos y/o enzimas, en particular por la medida de la modificación de la expresión genética, del medio iónico, del pH o del potencial de membrana, mediante la modificación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero. De este modo, por una parte se registra directamente la medida del efecto de la sustancia por la influencia en los receptores, canales iónicos y/o enzimas, y por otra parte, como ejemplos a medir de forma preferente, parámetros variables tales como la expresión genética, el medio iónico, el pH, el potencial de membrana, la actividad enzimática o la concentración del 2º mensajero. En este contexto, por “medio iónico” se entiende principalmente la concentración de uno o más iones en un compartimento celular, en particular en el citosol; por “potencial de membrana” se entiende la diferencia de carga entre ambos lados de una biomembrana; y por “2º mensajero” se entienden mensajeros de la vía de señales intracelular, por ejemplo AMP cíclico (cAMP), inositol-trifosfato (IP3) o diacilglicerol (DAG).

Un objeto especialmente preferente de la invención es el procedimiento según la invención, en el que un primer procedimiento según la invención se acopla a un segundo procedimiento según la invención de tal modo que los valores de medida y los resultados del primer procedimiento, en cuanto a la sustancia a medir, se comparan con los valores de medida y los resultados del segundo procedimiento en cuanto a la sustancia a medir, caracterizado porque en el paso (a) de uno de los dos procedimientos, denominado en lo sucesivo procedimiento principal, la sustancia a ensayar

se incuba con una biomolécula seleccionada entre el grupo II:

la proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f) o 1h) y/o una proteína similar a una de estas proteínas en como mínimo un 90%, y/o una proteína que codifica un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g) o a su polinucleótido antisentido,

y/o con una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas o biomoléculas del grupo II anteriormente mencionadas,

y

porque en el paso (a) del otro de los dos procedimientos, denominado en lo sucesivo procedimiento secundario, la sustancia a ensayar se incuba con una biomolécula del grupo I o con una biomolécula del grupo II, no eligiéndose la biomolécula con la que ha sido incubada la sustancia en el procedimiento principal.

Por esta forma de realización especialmente preferente se ha de entender sobre todo la combinación de la medida de la unión a BNPI, o a biomoléculas derivadas de éste, o de la medida de la modificación subsecuente de parámetros celulares, dado que precisamente una comparación a la vista de la distribución, completamente independiente pero estrechamente cercana, de los dos canales en el tejido puede proporcionar una información importante sobre las funciones fisiológicas. De este modo, la comparación diferencial de los datos permite identificar aquellas sustancias con una eficacia farmacéutica o medicinal óptima.

Mediante el procedimiento de screening (rastreo) según la invención se puede identificar un compuesto como sustancia farmacéuticamente relevante eficaz en como mínimo una de las indicaciones anteriormente mencionadas. En este contexto, el término “compuesto” se refiere sobre todo a principios activos de bajo peso molecular, pero también a péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. El término “identificable” significa que el compuesto presenta la característica consistente en que, en lo que respecta a la unión en el procedimiento de screening (rastreo) según la invención, se une de forma claramente más intensa, preferentemente con el doble de intensidad, que la media de las sustancias de ensayo, o que, en lo que respecta a la variación de los parámetros funcionales, se desvía claramente de la media de las sustancias de ensayo. De forma especialmente preferente, el compuesto identificado mediante un procedimiento según la invención es un compuesto de bajo peso molecular.

Junto con el polinucleótido utilizado en el procedimiento según la invención también están incluidos los propios fragmentos del gen representado, y también un polinucleótido que corresponde por completo o como mínimo a partes de la secuencia codificadora del gen correspondiente al fragmento. Con ello también se incluyen polinucleótidos que presentan una coincidencia de como mínimo un 90%, preferentemente un 95% y en particular como mínimo un 97%, en la sucesión de bases con la secuencia codificadora de los polinucleótidos representados o de la secuencia codificadora del gen. Además es preferible que el polinucleótido consista en un RNA o en DNA de cadena simple o doble, en particular mRNA o cDNA. También es preferente que el polinucleótido consista en un polinucleótido antisentido o PNA que presente una secuencia que se pueda unir específicamente a un polinucleótido según la invención. PNA significa “*peptidic nucleic acid*” (ácido nucleico peptídico) que, si bien porta los pares de bases, su esqueleto está unido peptídicamente. Un polinucleótido antisentido presenta la sucesión de bases complementaria a como mínimo

una parte de un ácido nucleico base. También es preferible que el polinucleótido sea parte de un ribozima o de otra enzima de DNA o un RNA o DNA catalítico. Por ribozima se ha de entender un ácido ribonucleico catalíticamente activo, y por enzima de DNA el ácido desoxirribonucleico correspondiente, es decir RNA o DNA catalítico.

También se puede utilizar un polinucleótido o un oligonucleótido en el que como mínimo uno de los nucleótidos y en particular varios de los nucleótidos son “*locked nucleic acids*” (“LNA”) (ácidos nucleicos bloqueados), o como mínimo uno de los nucleótidos y en particular todos los nucleótidos son fosfotioatos, preferentemente uno en el que varios de los nucleótidos son “*locked nucleic acids*” (“LNA”). Los “*locked nucleic acids*” (“LNA”) son ribonucleótidos que contienen un puente metileno que une el oxígeno 2’ de la ribosa con el carbono 4’ (véase la Figura 27). Braasch D.A. y Corey, D.R. (2001) presentan una vista general de los LNA en “*Locked nucleic acids (LNA); fine-tuning the recognition of DNA and RNA*”, Chem. Biol, 8, 1-7. Se pueden adquirir LNAs, por ejemplo, de la firma Proligo, Boulder, CO, EE.UU. Los fosfotioatos también son conocidos por los especialistas y se pueden encargar, por ejemplo, a MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemania.

En el caso de la proteína a utilizar en el procedimiento según la invención, o de una proteína parcial derivada de la misma, es preferible que ésta haya sido sometida a modificación postraducciona, en particular que haya sido glicosilada, fosforilada, amidada, metilada, acetilada, ADP-ribosilada, hidroxilada, provista de un anclaje de membrana, segmentada o acortada. Las modificaciones postraduccionales se describe, por ejemplo, en Voet/Voet, Biochemistry, 1ª edición, 1990, páginas 935-938.

El polinucleótido utilizado (dado el caso según el punto a) y/o el punto b)) puede ser un RNA o un DNA de cadena simple o doble, en particular mRNA o cDNA.

El polinucleótido utilizado (dado el caso según el punto b)) puede ser una parte de un ribozima u otra enzima de DNA o un RNA o DNA catalítico.

Los siguientes ejemplos y figuras explican más detalladamente la invención sin limitarla a los mismos.

Figuras y ejemplos

Figuras

Figura 1a) Secuencia de cDNA de BNPI, humano; AN: NM_020309.

Figura 1b) Secuencia de aminoácidos de BNPI, humano; AN: NM_020309.

Figura 1c) Secuencia de cDNA de BNPI, humano; N°: AAT42064 de WO96/34288.

Figura 1d) Secuencia de aminoácidos de BNPI, humano; N°: AAT42064 de WO96/34288.

Figura 1e) Secuencia de cDNA de BNPI, rata; AN: U07609.

Figura 1f) Secuencia de aminoácidos de BNPI, rata; AN: U07609.

Figura 1g) Secuencia de cDNA de BNPI, ratón; AN: XM_133432.

Figura 1h) Secuencia de aminoácidos de BNPI, ratón; AN: XM_133432.

Figura 2a) Secuencia de cDNA de DNPI, humano; AN: AB032435.

Figura 2b) Secuencia de aminoácidos de DNPI, humano; AN: AB032435.

Figura 2c) Secuencia de cDNA de DNPI, rata; AN: AF271235.

Figura 2d) Secuencia de aminoácidos de DNPI, rata; AN: AF271235.

Figura 2e) Secuencia de cDNA de DNPI, ratón; AN: NM_080853.

Figura 2f) Secuencia de aminoácidos de DNPI, ratón; AN: NM_080853.

Figura 3) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en sinapsis y áreas motoras de la médula espinal lumbar de rata (véase el Ejemplo 2a).

Figura 4) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en sinapsis de las áreas del asta dorsal de la médula espinal lumbar de rata (véase Ejp. 2b).

Figura 5) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en sinapsis de la médula espinal sacra de rata (véase Ejp. 2c).

Figura 6) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en sinapsis del conducto médulo-cervicoespinal del nervio trigémino de rata (véase Ejp. 2d).

Figura 7) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2e).

Figura 8) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2f).

Figura 9) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2g).

Figura 10) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2h).

Figura 11) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2i).

Figura 12) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2j).

Figura 13) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2k).

Figura 14) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2l).

Figura 15) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2m).

Figura 16) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2n).

Figura 17) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2o).

Figura 18) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2p).

Figura 19) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata (véase Ejp. 2q).

Figura 20) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata. AS significa antisentido y se refiere a la tinción.

Figura 21) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales de rata. AS significa antisentido y se refiere a la tinción.

Ejemplos

Ejemplo 1

Observación diferencial de la expresión entre DNPI y BNPI a través de tinción inmunocitoquímica

Para la tinción inmunohistoquímica se utilizaron antisueros de conejo policlonales contra la proteína de fusión de DNPI o BNPI recombinante. En general se aplicaron secciones de diferentes regiones del SNC y se comparó la expresión de DNPI con la de BNPI. El proceso se corresponde, en cuanto a las secciones y la tinción, al procedimiento descrito por Persson S., Schäfer MK-H., Nohr D., Ekström G., Post C., Nyberg F. y Weihe E. (1994), Neuroscience 63; 313-326 o por Nohr D., Schäfer MK-H., Romeo H., Persson S., Nyberg F., Post C. y Weihe E. (1999), Neuroscience 93; 759-773. La revelación, descripción o enseñanza técnica de estos artículos se incorpora expresamente como parte de la revelación, descripción o enseñanza técnica de la invención aquí presentada.

Ejemplo 2a con referencia a la Figura 3)

Se puede ver la distribución diferencial de la inmunorreactividad de BNPI y DNPI en la médula espinal lumbar de la rata. Las secciones A a D desparafinadas adyacentes están teñidas de la siguiente manera:

A = anti-DNPI;

B = anti-DNPI preadsorbido con proteína de fusión de DNPI;

C = anti-BNPI;

D = anti-BNPI preadsorbido con proteína de fusión de BNPI.

Los inmunocolorantes DNPI-(A) y BNPI-(C) eran completamente preadsorbibles con la proteína de fusión de BNPI-(D) y BNPI-(B) recombinante homóloga, lo que demuestra la especificidad de la reacción inmune.

Resulta notable el patrón de distribución mutuamente excluyente de la inmunotinción de DNPI y BNPI en el asta dorsal exterior y profunda (A/C). La inmunotinción punteada de DNPI se encuentra en los extremos sinápticos del asta dorsal exterior (lámina 1 y sustancia gelatinosa) (flecha en A), mientras que la inmunorreactividad de BNPI falta

por completo (flechas en B). Se encuentra en el asta dorsal profunda una acumulación de una inmunotinción de BNPI, punteada positiva, mientras que la tinción de DNPI es relativamente baja. El DNPI está presente en el núcleo espinal lateral (LSN en A), mientras que el BNPI falta por completo (LSN en C). El DNPI es abundante en la lámina X alrededor del canal central, mientras que el BNPI es escaso. La inmunotinción de BNPI es débil en el asta ventral lateral y débil o ausente en el asta ventral medial. La tinción de DNPI punteada es abundante en todo el asta ventral, algo menos en el asta lateral que en la ventral medial. Hay una débil tinción de BNPI y DNPI en algunos cuerpos celulares de las neuronas motoras del asta ventral, pero no había sido preadsorbida por las proteínas de fusión del transportador homólogo y, en consecuencia, se había clasificado como no específica.

10 Ejemplo 2b con referencia a la Figura 4)

Se puede ver la distribución diferencial de la inmunorreactividad de BNPI y DNPI en la médula espinal lumbar dorsal superficial lateral izquierda (*left lateral superficial dorsal lumbar spinal cord*) de la rata. A y B teñidas respectivamente para BNPI (A) y DNPI (B) muestran muchas tinciones punteadas para DNPI, que están concentradas en la lámina I y en la sustancia gelatinosa, donde el BNPI falta prácticamente por completo. También se pueden ver complejos densos de puntos positivos de DNPI en el núcleo espinal lateral, donde el BNPI falta prácticamente por completo. También se pueden encontrar puntos positivos de DNPI finos en el asta dorsal profundo, aunque con menor densidad.

20 Ejemplo 2c con referencia a la Figura 5)

Se puede ver la distribución diferencial de la inmunorreactividad de BNPI y DNPI en la médula espinal sacra de la rata. Las secciones adyacentes A y B teñidas respectivamente para BNPI (A) y DNPI (B) muestran zonas de exclusión mutua de inmunotinción de DNPI y BNPI punteada en el asta dorsal. El DNPI está presente en toda la sustancia gris y se concentra en las capas más externas del asta, donde forma una banda estrecha en el límite con la sustancia blanca. El DNPI es abundante en el núcleo espinal lateral y en la lámina X, al igual que en la lámina V/VI y en todo el asta ventral. El BNPI es abundante en el asta dorsal profunda y escaso en la ventral.

Ejemplo 2d con referencia a la Figura 6)

Se puede ver la distribución diferencial de la inmunorreactividad de BNPI y DNPI en el bulbo raquídeo inferior en la transición a la médula espinal cervical. Las secciones adyacentes A y B teñidas respectivamente para BNPI (A) y DNPI (B) muestran una acumulación preferente de la tinción de BNPI en la parte medial del núcleo trigeminal espinal y en la parte central e inferior de la médula dorsal. En la médula ventral sólo se observa una tinción muy débil con BNPI. El DNPI es abundante en la sustancia gris de la médula. La tinción de DNPI se solapa con la tinción de BNPI en el núcleo espinal interior V. Se ha de observar que el BNPI también se encuentra en el núcleo trigeminal espinal superior, que es igual a la sustancia gelatinosa espinal. La tinción de DNPI es más débil en las regiones con presencia de BNPI que en las regiones en las que la presencia de BNPI es baja o nula. En la región motora gris ventral se pueden ver unos pocos puntos de BNPI.

40 Ejemplo 2e con referencia a la Figura 7)

Distribución diferencial complementaria de la inmunorreactividad de DNPI y BNPI en 2 secciones progresivas del cerebro de rata en regiones cerebrales relevantes para el dolor, como el córtex parietal sensitivo, el córtex cingular, el tálamo, el cuerpo amigdalino y también el hipotálamo. El DNPI se concentra en el córtex en las capas sensitivas granulares, en particular en la lámina IV; el BNPI es abundante en el córtex, pero más débil en la lámina IV que en las otras láminas. En el córtex cingular (C vs D como ampliado), la distribución de DNPI y BNPI es alternativamente excluyente de forma complementaria o recíproca en la densidad de las sinapsis correspondientes. El DNPI predomina en el tálamo claramente sobre el BNPI. En el hipotálamo, el BNPI es escaso y el DNPI abundante. En el hipocampo, el abundante BNPI predomina sobre el escaso DNPI con una distribución alternativa complementaria.

50 Tálamo = Th

Cuerpo amigdalino = Amyg.

55 Hipocampo = Hip

Córtex cingular = Cg

Hipotálamo = Hy

60 Córtex parietal = PC.

Ejemplo 2f con referencia a la Figura 8)

Distribución diferencial complementaria de inmunorreactividad de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor, como el córtex cingular (Cg) y el tectum, y también la sustancia gris periacueductal dorsal. Dominancia de DNPI en el tectum y la sustancia gris dorsal. Secciones progresivas de un cerebro de rata a través del mesencéfalo superior.

Ejemplo 2g con referencia a la Figura 9)

Distribución diferencial complementaria de inmunorreactividad de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor, como el tectum (T) y también la sustancia gris periacueductal (PAG). Dominancia de DNPI en el tectum y la sustancia gris dorsal. Se observa una distribución diferencial de DNPI y BNPI en el cuerpo geniculado medial (cgm) de la vía auditiva. Secciones progresivas de un cerebro de rata a través del mesencéfalo superior; plano del colículo superior.

Ejemplo 2h con referencia a la Figura 10)

Abundancia de DNPI y BNPI en las habénulas (Hb). El DNPI está presente en todo el complejo habenular (ampliación baja, figura superior; ampliación alta, figura central). El BNPI sólo se encuentra en el núcleo habenular medial (mHb figura inferior, sección progresiva con respecto a la figura central).

En los siguientes Ejemplos 2i a 2q y las en Figuras correspondientes 11 - 19 se utilizan los términos VGLUT1 para BNPI y VGLUT2 para DNPI. Estos conceptos son completamente sinónimos en ambos casos, exactamente iguales en cuanto a su contenido y se refieren al mismo objeto, es decir: VGLUT1 = BNPI y VGLUT2 = DNPI. El término "preabs" significa preabsorción con proteína de fusión de VGLUT1 o VGLUT2 antes de la inmunotinción.

Ejemplo 2i con referencia a la Figura 11)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución y la especificidad en la médula espinal lumbar a través de la inmunorreactividad.

Las secciones adyacentes A-D están teñidas alternativamente con anti-VGLUT2 (A), anti-VGLUT2, preabsorbido con proteína de fusión de VGLUT2 (B), anti-VGLUT1 (C) y anti-VGLUT1, preabsorbido con proteína de fusión de VGLUT1 (D). Las inmunorreacciones en (A) y (C) son preabsorbidas por completo con las proteínas de fusión recombinantes homólogas (B) y (D), lo que demuestra la especificidad de la reacción inmune. Se observa el patrón de distribución diferencial en el asta dorsal superficial y profundo (A;C). Se puede reconocer una inmunotinción punteada para VGLUT2 en el asta dorsal superficial (las flechas en A identifican la lámina 1 y la sustancia gelatinosa), donde la inmunorreactividad con VGLUT1 es mínima (flechas en C). También se puede observar la acumulación de VGLUT1 punteado muy positivo en el asta dorsal profunda, donde el VGLT2 es relativamente débil. El VGLUT2 está presente en el núcleo espinal lateral (LSN; flechas en A), donde el VGLUT1 tiene una escasa presencia (flechas en C). El VGLUT2 está muy presente en la lámina X alrededor del canal central, donde el VGLUT1 es escaso. La inmunotinción de VGLUT1 tiene una intensidad de débil a mediana en el asta ventral lateral y muy floja en la medial. En el asta ventral (VH) hay una tinción punteada fina de VGLUT2 densa y abundante.

Ejemplo 2j con referencia a la Figura 12)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el prosencéfalo (1).

Los pares de micrografías de baja y alta potencia de dos secciones frontales adyacentes están teñidas alternativamente para VGLUT2 (A-D, I, K, M) y VGLUT1 (E-H, J, L, N). Esto muestra la clara diferencia y la exclusividad parcialmente mutua de la distribución, densidad e intensidad de la inmunorreactividad ("ir") de VGLUT1 y VGLUT2 en regiones corticales, hipotálamicas, diencefálicas y límbicas.

Hipotálamo y tálamo (A,E): La VGLUT2-ir es relativamente fuerte en todo el hipotálamo y tálamo, donde el VGLUT-2 presenta una distribución limitada en el núcleo premamilar ventral (PMV) del hipotálamo y en partes del núcleo del tálamo, incluyendo el núcleo talámico posterior lateral (LP), el núcleo geniculado lateral dorsal (DLG) y el núcleo talámico posteromedial ventral (VPM). Núcleo pretectal olivar (OPT); núcleo pretectal anterior dorsal (APTD); núcleo precomisural (PrC).

Corteza (A; E; I; J; K; L; M; N): La tinción de VGLUT2 es moderada en una banda del neocórtex que contiene lámina IV. Es débil en una banda neocortical que contiene lámina VI y mínima en las otras capas neocorticales. La VGLUT1-ir punteada intensa es muy fuerte en todo el córtex, incluyendo el córtex piriforme (Pir), y es algo más débil en la banda neocortical de la lámina VI, donde se acumula una tinción de VGLUT2 moderada. Se puede observar la exclusión mutua de la tinción VGLUT1 y VGLUT2 en las capas de la corteza granular retroespinal (RSG en A y E), que se muestran con una mayor ampliación en (I) y (J). Las grandes ampliaciones M y N de la lámina IV en K y L muestran diferentes densidades de VGLUT1-ir y VGLUT2-ir punteada en la comparación entre cuerpos y procesos celulares neuronales inmunonegativos.

Hipocampo (A, E; B-D, F-H): Los puntos VGLUT2-ir finos están limitados normalmente a las capas granulares (g) del giro dentado (DG) y la capa piramidal (p) de los campos CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Los puntos VGLUT1-ir densos tienen una presencia muy fuerte en todo el hipocampo a excepción de las capas celulares granulares (g) y piramidales (p). Las secciones identificadas con rectángulos en A y las correspondientes con secciones adyacentes en E se muestran con una gran ampliación en B-D y F-H, respectivamente. Se puede observar la distribución y densidad diferencial de VGLUT1-ir y VGLUT2-r en la capa oriens (o), la capa piramidal (p), en el stratum lacunosum (r) y en

el stratum lacunosum molecular (I) de CA1 (B, F) y CA3 (C, G) y en la capa molecular (m), granular (g) y polimorfa (p) del giro dentado (DG) (D,H).

Complejo amigdalino: En este caso se constata un determinado solapamiento, pero se puede ver claramente la densidad e intensidad diferencial de la inmunotinción de puntos de VGLUT1-ir y VGLUT2-ir en el núcleo amigdalino basomedial (BMP), en el núcleo amigdalino lateral (La) y en el núcleo amigdalino cortical (Co), y también en el núcleo endopiriforme dorsal (DEn) adyacente.

También se puede comprobar que la “sustancia blanca” y los tractos fibrosos son negativos con respecto a VGLUT1 y VGLUT2 (comisura posterior (pc), fórnix (f), fasciculus retroflexus (fr), tracto mamilotalámico (mt)).

Ejemplo 2k con referencia a la Figura 13)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el prosencéfalo (2).

Los pares de micrografías de baja y alta potencia de dos secciones frontales adyacentes están teñidas alternativamente para VGLUT2 (A-B, E, G) y VGLUT1 (C-D, F, H). Esto muestra la clara diferencia y la exclusividad parcialmente mutua de la distribución, densidad e intensidad de la inmunorreactividad (ir) de VGLUT1 y VGLUT2 en el neocórtex (lámina IV, VI) caudate putamen (CPu), globulus pallidum (GP), córtex piriforme (Pir), núcleo accumbens centro (AcC), núcleo accumbens borde (AcSh), pallidum ventral (VP), tubérculo olfatorio (Tu), islas de Calleja (ICj), la banda diagonal ventral (VDB) y el septum lateral (LS). En el CPu, el VGLUT1 tiene una presencia algo más débil que el VGLUT2. El VGLUT2 está presente (B) en el globus pallidum (GP), donde el VGLUT1 falta prácticamente por completo (D). En el córtex piriforme (Pir) y las islas de Calleja (ICj), la VGLUT1-ir punteada es más fuerte y densa que la VGLUT2-ir. En (E) se puede observar una acumulación de VGLUT1-ir entre débil y moderada en las capas celulares piramidales, donde la VGLUT2-ir falta prácticamente por completo (F). Además se puede observar un solapamiento y reciprocidad determinados en la tinción de VGLUT1 y VGLUT2 en las ICj (G, H), y también la ausencia de VGLUT1-ir y de VGLUT2-ir en el tracto fibroso comisural/cuerpo calloso (cc, comisura anterior (ac)).

Barras en A, C = 1 mm, en B, D = 500 μ m; en E-H = 200 μ m.

Ejemplo 2l con referencia a la Figura 14)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el núcleo talámico e hipotalámico.

Las secciones frontales (A, B) adyacentes del diencefalo muestran la fuerte presencia diferencial específica de núcleo de VGLUT2 (A) y VGLUT1 (B) en el tálamo y el hipotálamo. Se observa la muy fuerte presencia de VGLUT2-ir (A) en el núcleo talámico paraventricular (PVA), núcleo talámico reuniente (Re), núcleo talámico reticular (Rt), núcleo talámico paracentral (PC) y núcleo talámico anterodorsal (AD). Aquí falta prácticamente por completo VGLUT1-ir (B) o sólo está presente en una baja concentración. El VGLUT1 (B) está presente de forma moderada en el núcleo talámico posterior (PT), donde el VGLUT2 (A) es escaso. El VGLUT1 falta prácticamente por completo en la estría medular (sm), donde VGLUT2-ir es escasa.

Las secciones frontales adyacentes C, D del diencefalo muestran la frecuencia de VGLUT2 (C) en el núcleo hipotalámico anterior (AH), pero la escasez en el núcleo paraventricular (PVN) y la escasez extrema de VGLUT1-ir en el núcleo hipotalámico anterior (AH) y la ausencia total en el PVN. También se observa la presencia de VGLUT1 (D) y la ausencia de VGLUT2 (C) en el núcleo talámico ventromedial (VM) y el núcleo talámico reuniente (Re).

Las secciones frontales adyacentes del hipotálamo (E, F) muestran la frecuencia de VGLUT2 en LH, en el núcleo talámico ventromedial (VHM) y el núcleo talámico dorsomedial (DM), y la escasez de VGLUT1 en el núcleo de VMH, pero la presencia moderada en su borde. Se puede observar la tinción débil de VGLUT2 en la eminencia mediana (ME). El VGLUT1 y el VGLUT2 faltan en los tractos fibrosos del fórnix (f) y del tracto mamilotalámico (mt). Tercer ventrículo (3V); barra = 500 μ m (para A-F).

Ejemplo 2m con referencia a la Figura 15)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el epitalámico.

Las micrografías de alta potencia de secciones adyacentes, que están teñidas alternativamente para VGLUT2 (A) y VGLUT1 (B), muestran la abundancia de VGLUT2 tanto en el núcleo habenular medial (MHb) como en el núcleo habenular lateral (LHb). Se puede observar que VGLUT1-ir en el MHb es menos densa que VGLUT2-ir. El VGLUT1 falta prácticamente por completo en el LHb.

Barras = 100 μ m (para A, B).

Ejemplo 2n con referencia a la Figura 16)

Se trata de una comparación entre VGLUT1, tirosina-hidroxilasa y VGLUT2 con respecto a la distribución en el mesencéfalo y el metatálamo.

Las micrografías de baja potencia (A, C, E) y de alta potencia (B, D, F) de tres secciones adyacentes están teñidas alternativamente para tirosina-hidroxilasa (TH), VGLUT2 y VGLUT1 y muestran la distribución diferencial, densidad e intensidad de la inmunotinción para VGLUT1 y VGLUT2 en comparación con la TH. Los puntos VGLUT2-ir están concentrados en el tectum, encontrándose las mayores cantidades en la capa “gris” superficial del colículo superior (SuG) y cantidades menores en la capa “gris” intermedia del colículo superior (InG), mientras que son escasas en la capa del núcleo óptico del colículo superior (Op). Los puntos VGLUT2-ir se encuentran en todo el tegmentum, incluyendo el núcleo rojo (R) y la parte compacta de la sustancia negra (SNC) positiva con respecto a PH, y se acumulan especialmente en la sustancia gris periacueductal dorsal (PAG), en particular en el núcleo terminal medial del “accessory optic tract” (MT), del tracto de acceso óptico, y también en la parte mediocaudal del núcleo posterior lateral (LPMC), en el núcleo talámico intralaminar posterior (PIL), en el núcleo peripeduncular (PP) y en el núcleo talámico supragenículado (SG). La VGLUT1-ir es mínima aquí. La tinción de VGLUT1 se observa en cantidades moderadas en el núcleo geniculado medial ventral (MGV), donde las cantidades de VGLUT2 son mínimas. El VGLUT1 sólo está presente de forma mínima en todo el tectum, la sustancia gris periacueductal y el tegmento, y falta casi por completo en la parte compacta (SNC) y en la parte reticulada (SNR) de la sustancia negra. En los pericariones y puntos neuronales de la SNR hay una débil presencia de tinción de VGLUT2 (D, micrografía de alta potencia de la indicada en (C) con un rectángulo, donde el VGLUT1 falta prácticamente por completo (correspondiente en F)). Acueducto mesencefálico (Aq).

Barras en A, C, E = 1 mm; en B, D, F = 200 μ m.

Ejemplo 2o con referencia a la Figura 17)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el tronco encefálico pontomedular.

Las micrografías de baja y alta potencia de dos secciones frontales adyacentes están teñidas alternativamente para VGLUT2 (A-D) y VGLUT1 (E-H). Éstas muestran una gran cantidad de inmunorreactividad (ir) de VGLUT2 punteado (B, D) en la oliva superior medial (MSO), donde la VGLUT1-ir es baja (F, H). La VGLUT2-ir es relativamente débil en el núcleo del cuerpo trapezoide (TZ) (B-C), donde hay mayor presencia de VGLUT1-ir (F-G). Se puede observar que grandes puntos confluentes claramente positivos con respecto a VGLUT1 rodean cuerpos celulares neuronales inmunonegativos en el TZ (G). En el núcleo sensitivo central del nervio trigémino (Pr5) hay fuertes puntos de VGLUT1-ir, donde VGLUT2-ir es muy baja. En el núcleo trigeminal motor (Mo5) hay puntos moderadamente positivos con respecto a VGLUT1, donde la VGLUT2-ir es baja. La VGLUT1-ir y la VGLUT2-ir están presentes en menor cantidad en el núcleo parabranchial medial lateral (LPB, MPB). El locus coeruleus (LC) presenta una acumulación moderada de VGLUT2-ir, donde la VGLUT1-ir es muy baja. La VGLUT1-ir y VGLUT2-ir faltan en el tracto piramidal (pyr). Sectores adyacentes (I, J), teñidos alternativamente para VGLUT2 (I) y VGLUT1 (J), presentan una gran cantidad de inmunorreactividad (ir) de VGLUT1 punteada en el núcleo coclear ventral anterior (VCA), donde, en principio, el VGLUT2 falta por completo. Una micrografía de alta potencia (K) de J muestra puntos de VGLUT-ir muy positivos, que encierran cuerpos celulares neuronales inmunonegativos. En el núcleo coclear dorsal (DC) hay una mayor cantidad de puntos de VGLUT1-ir que de puntos positivos de VGLUT2-ir.

Barras en A, E = 500 μ m; en B, F, I, J = 200 μ m; en C, D, G, H, K = 25 μ m.

Ejemplo 2p con referencia a la Figura 18)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el tronco encefálico inferior.

Las micrografías de baja y alta potencia de dos secciones frontales adyacentes están teñidas alternativamente para VGLUT2 (A, C, E, G) y VGLUT1 (B, D, F, H), y muestran una cantidad moderada de inmunorreactividad (ir) de VGLUT2 punteada pequeña en el núcleo trigeminal espinal superficial (Sp5), lo que está marcado con las flechas (A, G), donde, en principio, la VGLUT1-ir falta por completo (flechas en B, H). El VGLUT2 está presente de forma moderada en el núcleo motor dorsal del vago (10), el núcleo hipogloso (12), la formación reticular (Rt) y la parte ventral del tracto solitario (SolV) (A, C, E), donde, en principio, el VGLUT1 falta por completo (B, D, F). La VGLUT2-ir es muy baja en el tracto solitario dorsal (SolD). Se puede observar la preponderancia del VGLUT1 en el Sp5 profundo (B, F, H), el cuneato (Cu) y el núcleo grácil (GR), donde la VGLUT2-ir es muy baja. Las estrellas marcan el canal central.

Barras en A, B = 500 μ m; C, D = 200 μ m, E, F = 100 μ m; G, H = 100 μ m.

Ejemplo 2q con referencia a la Figura 19)

Se trata de una comparación entre VGLUT1 y VGLUT2 con respecto a la distribución en el cerebelo.

- 5 Las micrograffías de baja y alta potencia de dos secciones frontales adyacentes, teñidas alternativamente para VGLUT2 (A, B) y VGLUT1 (C, D), muestran una densidad extrema de puntos positivos con respecto a VGLUT1 con una tinción intensa en la capa molecular (m), muy pocos puntos de VGLUT1 alrededor de cuerpos de la célula de Purkinje en la capa celular de Purkinje (p), y una acumulación de tipo glomerular de puntos de VGLUT1 confluentes con una fuerte tinción en la capa granular (g). Los puntos de VGLUT2-ir son mucho menos densos en la capa mole-
10 cular, donde están dispuestos a modo de banda. Los puntos de VGLUT2-ir, que forman estructuras de tipo glomerular en la capa glomerular (g), son menos densos que los correspondientes a la tinción de VGLUT1.

Barras en A, C = 500 μ m; en B, D = 100 μ m.

15 *Discusión y análisis con respecto a los Ejemplos 2 en general*

La distribución diferencial de BNPI y DNPI en la sinapsis del sistema aferente primario, trigeminal espinal y supraespinal es una fuerte evidencia de la posibilidad de influir selectivamente en las funciones sensitivas mediante la modulación selectiva del transporte de glutamato por medio de DNPI o BNPI.

- 20 La presencia de BNPI y DNPI en el DRG indica la posibilidad de influir selectivamente en inflamaciones neurogénicas periféricas mediante la intervención selectiva en la diana de DNPI o BNPI. La presencia en el DRG también indica una función inmunomoduladora y la determinación de dianas correspondiente. Una presencia de BNPI y DNPI en el vago sensitivo o el ganglio glossofaríngeo indica la diana para baroaferencia, quimioaferencia, función cardiovascular o cardiorrespiratoria, incluyendo asma, hipertensión, etc., y también para emesis. También es interesante la
25 distribución para el eje intestino-cerebro, es decir la regulación de la saciedad, de la “*inflammatory bowel disease*” (trastorno intestinal inflamatorio) o la enfermedad de Crohn, y también para la autoinmunidad en el sistema nervioso central o periférico, diabetes autoinmune, neuropatía alcohólica, pancreatitis crónica inducida por alcohol con neuroproliferación (Fink y col. mit Weihe; Neuroscience). Ya sólo la distribución en el SNC y el SNP hace que estas dianas
30 sean objetos interesantes en las demás indicaciones arriba mencionadas.

- No obstante, otro punto decisivo consistía en que se pudo detectar BNPI y DNPI en las regiones aferentes de las zonas sensitivas del ojo y el oído, lo que, en combinación con el resto de conocimientos, sugiere una función importante en caso de trastornos de la vista, retinitis pigmentosa, degeneración óptica, cataratas, desprendimiento
35 de retina, degeneración de retina, glaucoma o nistagmo, o trastornos auditivos, tinnitus, M. Menière, pérdida repentina del oído, enfermedades del órgano auditivo y/o del órgano del equilibrio o enfermedades de la vía auditiva o vestibular.

- También es decisivo que la distribución de VGLUT2 (=DNPI) en la mayoría de las regiones del cerebro y la
40 médula espinal sea complementaria y mutuamente excluyente con respecto a la expresión de VGLUT1 (=BNPI). Los dos transportadores de glutamato juntos podrían ser responsables de la absorción de glutamato por vesículas sinápticas de todas las neuronas glutamatérgicas centrales.

- Aquí se ha comprobado que los centros talámicos y de transmisión del tronco encefálico de la vía visual y estatoacústica se activan mediante señales diferenciales controladas por VGLUT1 y VGLUT2. Los centros de transmisión
45 talámicos y mesenfálicos del sistema visual, como el colículo superior y el núcleo geniculado dorsolateral, y el núcleo terminal medial del “*accessory optic tracts*” del sistema óptico están controlados específicamente por VGLUT2, lo que sugiere que las células ganglionares de la retina, que representan la tercera neurona del sentido óptico, están recubiertas como mínimo parcialmente con VGLUT2. En cambio, los centros de transmisión coclear del tronco encefálico,
50 trapezoide olivar y geniculado medial metatalámico de la vía auditiva reciben una fuerte entrada (*input*) de sinapsis glutamatérgicas recubiertas de VGLUT1.

- Diferentes núcleos del sistema visual del tronco encefálico reciben un fuerte *input* a través de puntos sinápticos de VGLUT2. Por consiguiente, parece que el tronco encefálico del sistema óptico es abastecido exclusivamente por
55 sinapsis glutamatérgicas de VGLUT2.

- De las investigaciones se desprenden los siguientes resultados y conclusiones: El DNPI es un marcador para vesículas sinápticas glutamatérgicas, habiendo 2 tipos diferentes de neuronas o sinapsis. El VGLUT1 y el VGLUT2
60 presentan un patrón de distribución diferencial.

- En conjunto, la distribución del BNPI y DNPI en el SNC y el SNP indican que desempeñan una función en las diferentes indicaciones arriba mencionadas, para las que se buscan compuestos medicinales eficaces para dichas dianas con el procedimiento según la invención.

65

Ejemplo 3

Realización del procedimiento de screening (rastreo) con medida de la unión a través del desplazamiento de un ligando marcado radiactivo

Una sección de ácido nucleico que codifica BNPI se clona en un vector de expresión que permite una expresión constitutiva (por ejemplo promotor CMV) o una expresión inducible en células eucariotas. El DNA se introduce en células eucariotas (por ejemplo células CHO, células HEK293 o células NIH-3T3) con procedimientos de transfección adecuados, por ejemplo con lipofectamina (firma Roche Diagnostics). Las células se cultivan en presencia de un reactivo de selección (por ejemplo zeocina, higromicina o neomicina) de modo que sólo sobreviven aquellas células que han absorbido el constructo de DNA y que, en caso de una selección más duradera, también lo han incorporado en el genoma.

A partir de estas células se obtienen fracciones de membrana que contienen una mayor cantidad de BNPI y pueden ser utilizadas para un ensayo de unión. Éste consiste en 1.) membranas que contienen el BNPI; 2.) un ligando marcado radiactivo; 3.) un tampón de unión (por ejemplo 50 mM HEPES pH 7,4, 1 mM EDTA) y los ligandos analizados en cuanto a la unión. Después de la incubación de las mezclas de reacción arriba mencionadas (por ejemplo durante 30-60 minutos), a una temperatura adecuada (en la mayoría de los casos temperatura ambiente), las moléculas de ligando radiactivas no unidas se separan por filtración. La cantidad restante de ligando unido se mide en un β -Counter (por ejemplo Trilux, firma Wallac) después de añadir un cóctel de escintilación. Si la sustancia de ensayo presenta una unión con BNPI, éste se detecta como incorporación radiactiva reducida. Este procedimiento se miniaturiza adecuadamente de tal modo que se pueda llevar a cabo en microplacas tituladas (96, 384 o 1.536 pocillos) para llevarlo a cabo con un robot en el denominado procedimiento "highthroughput screening" (HTS) (rastreo de alto rendimiento).

Ejemplo 4

Realización del procedimiento de screening (rastreo) con BNPI según la invención y medida de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia

Una sección de ácido nucleico que codifica BNPI se clona en un vector de expresión que permite una expresión inducible en procariotas, por ejemplo *E. coli*. La sección de ácido nucleico se modifica de tal modo que se expresa como proteína de fusión con una secuencia de aminoácidos N-terminal o C-terminal adicional. Esta secuencia debería permitir, sin modificación de la función del BNPI, una purificación a través de un procedimiento específico, por ejemplo un fragmento de glutatión-S-transferasa, que permite su aislamiento a partir de la mezcla de proteínas por su unión al glutatión. Después de la transfección de las bacterias, la inducción del gen (por ejemplo con IPTG en el promotor lac) y la desintegración de las bacterias, las proteínas de fusión se purifican y se utilizan en un experimento de quinasa *in vitro*. Para ello, 5 μ g de proteína se tratan a 30°C durante 30 minutos con 50 μ l de tampón quinasa (20 mM PIPES, pH 7,0, 5 mM MnCl₂, 7 mM β -mercaptoetanol, 0,4 mM espermina, 10 mM rATP) complementados con 10 μ Ci [γ ³²P]-ATP. Como sustrato se añade proteína Histona H1 purificada (firma Sigma) o proteína de fusión GST-NFATc1 expresada de forma bacteriana. Después del período de incubación, el [γ ³²P]-ATP no incorporado se separa por filtración y la cantidad de ³²fosfato incorporado se determina por escintilación β (Trilux, firma Wallac). En un experimento para descubrir nuevos inhibidores de BNPI, las sustancias de ensayo se incuban conjuntamente en esta carga y se utiliza la disminución de la incorporación de ³²P como indicador de inhibición. Este procedimiento se miniaturiza adecuadamente de tal modo que se pueda llevar a cabo en microplacas tituladas (96, 384 o 1.536 pocillos) para realizarlo con un robot en el denominado procedimiento "highthroughput screening" (HTS) (rastreo de alto rendimiento).

Ejemplo 5

Ejemplo de un medicamento para el tratamiento del tinnitus o para el tratamiento de trastornos motoneuronales que contiene un compuesto identificado mediante el procedimiento según la invención - formulación en pastillas

Las pastillas se pueden producir mediante compresión directa de mezclas del compuesto según la invención con los materiales auxiliares correspondientes, o mediante la compresión de granulados que contienen dicho compuesto (en caso dado con otros materiales auxiliares). Los granulados se pueden producir bien por granulación en húmedo, por ejemplo con líquidos de granulación acuosos, y secado subsiguiente de los granulados, bien por granulación en seco, por ejemplo mediante compactación.

▪ **Compresión directa**

5	Por ejemplo por pastilla:	25 mg	Compuesto identificado mediante el procedimiento según la invención
10		271 mg	Ludipress TM (granulado para la producción directa de pastillas a partir de monohidrato de lactosa , povidona K30 y crospovidona)
15		4 mg	Estearato de magnesio
		300 mg	Total

Se prepara una mezcla homogénea del principio activo con los materiales auxiliares y ésta se comprime en una prensa para obtener pastillas con un Ø de 10 mm.

▪ **Granulación en seco**

25	Por ejemplo por pastilla:	25 mg	Compuesto identificado mediante el procedimiento según la invención
30		166 mg	Celulosa microcristalina
		80 mg	Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (I-HPC LH 11 TM)
35		5 mg	Dióxido de silicio altamente disperso
		4 mg	Estearato de magnesio
		280 mg	Total

Se prepara una mezcla homogénea del compuesto con la celulosa microcristalina y la I-HPC y se compacta. Después de tamizar los productos de compresión, el granulado formado se mezcla con estearato de magnesio y dióxido de silicio y se comprime en una prensa para obtener pastillas con un Ø de 9 mm.

▪ **Granulación en húmedo**

50	Por ejemplo por pastilla:	25 mg	Compuesto identificado mediante el procedimiento según la invención
		205 mg	Celulosa microcristalina
		6 mg	Povidona K30
55		10 mg	Crospovidona
		4 mg	Estearato de magnesio
		250 mg	Total

Se prepara una mezcla homogénea del compuesto con la celulosa microcristalina y la crospovidona y se granula en un granulador con una solución acuosa de la povidona. A continuación, el granulado húmedo se vuelve a someter a granulación y, después del secado, se somete a un secado adicional en un armario de secado (50°C) durante 10 horas. El granulado seco se tamiza junto con el estearato de magnesio, se somete a mezcla final y se comprime en una prensa para obtener pastillas con un Ø de 8 mm.

Ejemplo 6

Ejemplo de un medicamento para el tratamiento del tinnitus o para el tratamiento de trastornos motoneuronales que contiene un compuesto identificado mediante el procedimiento según la invención - solución parenteral

1 g de un compuesto identificado mediante un procedimiento según la invención se disuelve, a temperatura ambiente, en 1 l de agua para inyección y a continuación se ajusta a condiciones isotónicas por adición de NaCl (cloruro de sodio).

Bibliografía

Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano Setsuji, Kasuya H., Hori T, Yamada S., Tomura H, Yamada Y., Inoue I., Kojima I. und Takeda J. (2000), *J. Neurochem.* 74: 2622-2625.

Akopian AN, Sivilotti L & Wood JN (1995) *Nature* 379. 257-262.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DO, Seidman JG, Smith JA & Struhl K eds. (1990) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.

Baba H, Doubell TP, Woolf CJ 1999: Peripheral inflammation facilitates A β fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19: 859-867.

Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) *Nucl Acids Res* 21:4272-4289.

Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung. *Biochem Biophys Res Comm* 234:190.193.

Chih-Cheng *et al.*, (1995): A P2X prinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-432

Corderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993): Contribution of central plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52: 259-285.

Dickenson (1995) Novel pharmacological targets in the treatment of pain. *Pain Rev.*, 2, 1-12.

Dubuisson *et al.*, 1997 *Pain*, 4:161-174.

Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 231: 651.654.

Furukawa T, Yang Y, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T (1996): Identification of new genes expressed in a human erythroleukemia cell line. *Bloods Cell Mol & Dis* 22:11-22.

Gunasekar PG, Kanthasamy, AG, Borowitz, JL, Isom GE 1995: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.

Hawes BE, Fried S, Yao X, Weig, B, Graziano MP 1998: Nociceptin (ORL1) and μ -Opioid receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation in CHO cells through a Gi-coupled signaling pathway; evidence for distinct mechanisms of agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 71: 1024-1033.

Hubank M & Schatz DG (1994): identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648.

Kluzmann S *et al.*, 1996; *Nature Biotechnology* 14:1112.1115.

Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599.602.

Liang P & Pardee AB 1992: Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.

Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I (1997): A novel G Protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336.342.

Mohit AA, Martin JH & Miller CA 1995: p493F12 Kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* 14: 67-78.

Poirier GM.C, Pyati J, Wan JS, Erlander MG 1997: Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research* 25: 913-914.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*.

Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG & Danna KJ 1995: Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Research* 23: 4738-4739.

Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. *Neuroreport* 7:1382-13134.

Tölle TR (1997): Chronischer Schmerz. In: Klinische Neurobiologie, **Herdergen T, Tölle IR, Bähr M** (Hrsg.): S. 307-336; Spektrum Verlag, Heidelberg.

U.S. Patent 5,262,311

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.

Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs *Nature Biotech* 14:4685-1691.

Watson JS & Margulies JE (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Dev Neurosci* 15: 77-86.

Wilks AF (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1603-1607.

WO96134288

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE 1992: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.

Zimmermann, M & Herdegen, T (1996): Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. *Progr Brain Res* 110: 233-259.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la localización de sustancias farmacéuticamente relevantes con eficacia en las indicaciones o para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de las neuronas motoras espinales, atrofas musculares, distrofias musculares o esclerosis múltiple, con los siguientes pasos de procedimiento:

- (a) incubación de una sustancia a ensayar bajo condiciones adecuadas con como mínimo una biomolécula del grupo I seleccionada entre:

la proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f) o 1h) y/o una proteína similar a una de estas proteínas en como mínimo un 90%, y/o una proteína que codifica un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o a su polinucleótido antisentido,

y/o de una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas, o biomoléculas del grupo I, anteriormente mencionadas,

- (b) medida de la unión de la sustancia de ensayo con la o las biomoléculas del grupo I dado el caso sintetizadas por una célula, o con una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las biomoléculas del grupo I anteriormente mencionadas, o medida de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia de ensayo con la o las biomoléculas del grupo I dado el caso sintetizadas por una célula, o con una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las biomoléculas del grupo I anteriormente mencionadas,

mediante la medida de la regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales iónicos y/o enzimas, en particular mediante la medida de la modificación de la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, mediante la modificación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero,

o

mediante la medida de la unión por el desplazamiento de un ligando marcado conocido de la biomolécula y/o de la proteína y/o mediante la actividad de una sustancia de ensayo marcada unida con ésta.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la célula se manipula por ingeniería genética antes del paso (a).

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la manipulación por ingeniería genética permite medir como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la sustancia de ensayo.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque mediante manipulación por ingeniería genética se expresa una forma de una proteína G no expresada de modo endógeno o se introduce un gen indicador.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2-4, **caracterizado** porque la célula se manipula por ingeniería genética de tal modo que contiene como mínimo un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, preferentemente en como mínimo un 95%, en particular en como mínimo un 97%.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el polinucleótido está contenido en un constructo de DNA recombinante.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado** porque la célula, después de la manipulación por ingeniería genética según la reivindicación 2 y antes del paso (a) según la reivindicación 1, se cultiva bajo condiciones que permiten una expresión, dado el caso presión de selección.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la célula es una célula de anfibio, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero inmortalizada o nativa.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que un primer procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 se acopla con un segundo procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 de tal modo que los valores de medida y los resultados del primer procedimiento, en cuanto a la sustancia a medir, se comparan con los valores de medida y los resultados del segundo procedimiento, en cuanto a la sustancia a medir, **caracterizado** porque en el paso (a) de uno de los dos procedimientos, denominado en lo sucesivo procedimiento principal, la sustancia a ensayar

ES 2 276 964 T3

se incuba con una biomolécula seleccionada de entre el grupo II:

la proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f) o 1h) y/o una proteína similar a una de estas proteínas en como mínimo un 90%, y/o una proteína que codifica un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o a su polinucleótido antisentido,

y/o una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas o biomoléculas del grupo II, anteriormente mencionadas,

y

porque en el paso (a) del otro de los dos procedimientos, denominado en lo sucesivo procedimiento secundario, la sustancia a ensayar se incuba con una biomolécula del grupo I o con una biomolécula del grupo II, no eligiéndose la biomolécula con la que ha sido incubada la sustancia en el procedimiento principal.

Fig. 1a)

```

cgggaggag gagccgccac catggagttc cgccaggagg agtttcggaa gctagcgggt 60
cgtgctotcg ggaagctgca cgccttctg gagaagcggc aggaaggcgc ggagacgctg 120
gagctgagtg cggatgggcg cccggtgacc acgcagaccc gggacccgcc ggtgggtggac 180
tgcacctgct tcggcctccc tcgcgctac attatcgcca tcatgagtgg tctgggcttc 240
tgcacagct ttggcatccg ctgcaacctg ggcgtggcca tcgtotcoat ggtcaataac 300
agcacgaccc accgcggggg ccacgtggtg gtgcagaaag ccagttcag ctgggatcca 360
gagactgtcg gectcataca cggctccttt ttctggggct acattgtcac tcagattcca 420
ggaggattta tctgtcaaaa atttgagcc aacagagttt tcggctttgc tattgtggca 480
acatccactc taaacatgct gatccctca gctgcccgcg tccactatgg ctgtgtcatc 540
ttcgtgagga tcctgcaggg gttggtagag ggggtcacat acccgcctg ccatgggac 600
tggagcaaat gggcccccac cttagaacgg agtcgcctgg cgacgacagc cttttgtgg 660
tcctatgctg gggcggtggg cgcgatgcc ctcccgggg tccttgtgca gtactcagga 720
tggagctctg ttttctacgt ctacggcagc ttccggatct tctggtaoct gttctggctg 780
ctcgtotcct acgagtcctc cgcgtgcac ccagcatct cggaggagga gcgcaagtac 840
atcaggagcg ccacgggaga gagcgcgaaa ctcatgaacc ccctcacgaa gtttagcact 900
ccctggcggc gcttcttcac gtctatgcca gtctatgcca tcactgtggc caacttctgc 960
cgcagctgga cgttctacct gctgctcatc tcccagcccg cctacttcga agaagtgttc 1020
ggcttcgaga tcagcaaggt aggcctggtg tccgctgctc cccacctggg catgaccatc 1080
atcgtgccca tcggcggcca gatcgcggac ttctgcgga gccgcgcgat catgtccacc 1140
accaacgtgc gcaagttgat gaactgcgga ggcttcggca tgggaagccac gctgctgttg 1200
gtggtcggct actcgactc caagggcgtg gccatctcct tcctggtcct agccgtgggc 1260
ttcagoggct tcgcatctc tgggttcaac gtgaaccacc tggacatagc cccgcgtac 1320
gccagcatcc tcattgggcat ctccaacggc gtgggcacac tgtcgggcat ggtgtgcccc 1380
atcatcgtgg gggccatgac taagcacaag actcgggagg agtggcagta cgtgttccca 1440
attgctccc tgggtgacta tggaggtgtc atcttctacg gggctcttgc ttctggagag 1500
aagcagccgt gggcagagcc tgaggagatg agcaggaga agtgtggctt cgttggccat 1560
gaccagctgg ctggcagtg cgacagcgaa atggaggatg aggtgagcc cccgggggca 1620
ccccctgcac cccgcctc ctatggggcc acacacagca catttcagcc cccaggccc 1680
ccacccctg tcgggacta ctgaccatgt gctccact gaatggcagt ttccaggacc 1740
tcattccac tcattctctg cctgagtgc agtgtcaagg aacctgctc ctctctgtcc 1800
tgctcaggc ctaagaagca ctctccctg tcccagtg tgtcaaatcc tcttctctc 1860
ccaattgcct ctacggggtg gtgaagctgc agactgacag tttcaaggat acccaattc 1920
ccctaaagg tccctctcca ccggttctgc ctcatgggt tcaaatctct cctttcaggg 1980
ctttatttga atggacagt cgacctctta ctctctctg tggttttgag gcaaccacac 2040
cccccgctt cctttatctc cagggactct caggctaacc ttbgagatca ctgagctccc 2100
atctcctttc agaaaaattc aaggtcctcc tctagaagtt tcaaatctct cccaactctg 2160
ttctgcatct tcagattgg tttaaccaat tactcgtccc cgccattcca gggattgatt 2220
ctcaccagcg tttctgatgg aaaatggcgg tttcaagtcc cggattccgt gccacttca 2280
catctccct accagcagat tctgcgaaag caccaaattt ctaagaccc tcttctccct 2340
agcttagcat aatgtctggg gaaaca

```

Fig. 1b)

```

1   MEFRQEEFRK LAGRALGKLH RLLEKRQEGA ETLELSADGR PVTQTTRDPP
51  VVDCTCFGLP RRYIIAIMSG LGPCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG
101 HVVVQKAQFS WDPETVGLIH GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA
151 IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG LVEGVTPAC HGIWSKWAPP
201 LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV YGSFGIFWYL
251 FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPLTK FSTPWRRFFT
301 SMPVYAIIVA NPCRSWTFYL LLISQPAYFE EVFGPEISKV GLVSALPHLV
351 MTIIVPIGGQ IADFLRSRRI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS
401 KGVAISFLVL AVGFSGFAIS GFNVNHLDA PRYASILMGI SNGVGTLSGM
451 VCPIIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY GGVIFYGVFA SGEKQPWAEP
501 BEMSEKCGF VGHDLQAGSD DSEMEDAEP PGAPPAPPPS YGATHSTFQP
551 PRPPPPVRDY

```

Fig. 1c)

```

cgataagctt gatatogaat tcgggactct tgctcgggcy cettaaccg gcgttcggtt 60
catccgcag cgcagttct gcttaccaaa agtggcccac taggcactcg cattccacgc 120
ccggctccac gccagcgagc cgggcttctt acccatttaa agtttgagaa taggttgaga 180
tcgtttcggc cccaagacct ctaatcatte gctttaccgg ataaaactgc gtggcggggg 240
tgcgtcgggt ctgcgagagc gccagctatc ctgagggaaa cttcggaggg aaccagctac 300
tagatgggtt gattagtctt tgcacctat acccaggtcg gacgaccgat ttgcacgtca 360
ggaccgctac ggacctccac cagagtttcc tctggcttcg ccctgccag gcgatcggcg 420
gggggggacc ggggggtgac cggcggcagg agccgccacc atggagttcc gccaggagga 480
gtttcggaag ctagcgggtc gtgctctcgg gaagctgcac cgccttctgg agaagcggca 540
ggaaggcgcg gagacgtgg agctgagtgc ggatgggcgc cgggtgacca cgcagaccgc 600
ggaccgcgcg gtggtggact gcacctgctt cggcctccct cgcgctaca ttatcgccat 660
catgagtggc ctgggcttct gcatcagctt tggcatccgc tgcaacctgg gcgtggccat 720
cgtctccatg gtcaataaca gcacgaccca ccgcgggggc cagtggtggg tgcagaaagc 780
ccagttcagc tgggatccag agactgtcgg cctcatacac ggctcctttt tctggggcta 840
cattgtcact cagattccag gaggatttat ctgtcaaaaa tttgcagcca acagagtttt 900
cggttttgc attgtggcaa catccactct aaacatgctg atccctcag ctgcccgct 960
ccactatggc tgtgtcatct tcgtgaggat cctgcagggg ttggtagagg gggtcacata 1020
ccccgcctgc catgggatct ggagcaaatg ggccccacc ttagaacgga gtgcctggc 1080
gacgacagcc ttttgtggtt cctatgctgg gggggtggtc gcgatgcccc tcgccgggg 1140
ccttgtgcag tactcaggat ggagctctgt tttctacgtc tacggcagct tcgggatctt 1200
ctgggtacctg ttctggctgc tcgtctccta cgaagtcctc gcgctgcacc ccagcatctc 1260
ggaggaggag cgcaagtaca tcgaggacgc catcggagag agcgcgaaac tcatgaaccc 1320
cctcacgaag tttagcactc cctggcgggc cttcttcacg tctatgccag tctatgccat 1380
catcgtggcc aacttctgoc gcagctggac gttctacctg ctgctcatct ccagcccg 1440
ctacttcgaa gaagtgttcg gcttcgagat cagcaaggta ggcctggtgt ccgcgtgcc 1500
ccacctggtc atgaccatca tcgtgcccat cggcgccag atcgcgact tctgcgag 1560
ccgcgcgcat atgtccacca ccaacgtgcg caagtgtgat aactgcggag gcttcggcat 1620
ggaagccacg ctgctggttg tggtcggcta ctcgcactcc aagggcgtgg ccattctcct 1680
cctggctcta gcggtgggtc tcagcggctt cgcctctctt gggttcaacg tgaaccacct 1740
ggacatagcc ccgcgctaog ccagcatcct catgggcate tccaacggcg tgggcacact 1800
gtcgggcatg gtgtgcccc tcatcgtggg ggccatgact aagcacaaga ctcgggagga 1860
gtggcagtac gtgttcttaa ttgcctccct ggtgcactat ggaggtgtca tcttctacgg 1920
ggtctttgct tctggagaga agcagccgtg ggcagagcct gaggagatga gcgaggagaa 1980
gtgtggcttc gttggccatg accagctggc tggcagtgac gacagcgaat tggaggatga 2040
ggctgagccc ccgggggocac cccctgcacc cccgccctcc tatggggcca cacacagcac 2100
atctcagccc ccagggcccc caccctctgt ccgggactac tgacctgtg cctccactg 2160
aatggcagtt tccaggacct ccattcoact catctctggc ctgagtgaac gtgtcaagga 2220
acctgctcc tctctgtcct gectcaggcc taagaagcac tctccctgt tccagtgt 2280
gtcaaatcct ctttctctcc caattgcctc tcaggggtag tgaagctgca gactgacagt 2340
ttcaaggata ccaaatctcc cctaaagggt cctctccac ccgttctgcc tcagtgggtt 2400
caaatctctc ctttcaggggc tttatttgaa tggacagttc gacctcttac tctctctgt 2460
ggttttgagg caccacaccc ccccgcttcc ctttatctcc agggactctc aggctaacct 2520
ttgagatcac tcagctccca tctcctttca gaaaaattca aggtcctcct ctagaagttt 2580
caaatctctc ccaactctgt totgcatctt ccagattggg ttaaccaatt actcgtccc 2640
gccattccag ggattgatto tcaccagcgt ttctgatgga aaatggcggg aattcctgca 2700
gcccggggga tccact
2716

```

Fig. 1d)

```

1   MEFROEEFRK LAGRALGKLH RLLEKRQEGA ETLBLSADGR PVTTQTRDPP
51  VVDCTCFGLP RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG
101 HVVVQKAQFS WDPETVGLIH GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA
151 IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP
201 LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV YGSFGIFWYL
251 FWLLVSYESP ALHPSISEBE RKYIEDAIGE SAKLMNPLTK FSTPWRRFFT
301 SMPVYAIIVA NPCRSTWTFYL LLISQPDYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV
351 MTIIVPIGGQ IADFLRSRRI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS
401 KGVAISFLVL AVGFSGFAIS GFNVNHLDA PRYASILMGI SNGVGTLSGM
451 VCPPIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY GGVIFYGVFA SGEKQPWABP
501 EEMSEEKCGF VGHDQLAGSD DSEMEDEAEP PGAPPAPPPS YGATHSTFQP
551 PRPPPPVRDY

```

Fig. 1e)

```

gaattcggca  cgagcggagc  tgcggggccg  ggccggggccg  gggcggaccc  cgggatcccg  60
gacgcggccg  cccggggccc  cgggcggggg  gattggcagg  ggacccgcgt  gggcacagcc  120
accatggagt  tccggcagga  ggagtttcgg  aagctggcgg  ggcgcgccct  ggggaggctg  180
caccggttac  tggagaagcg  gcaggaaagg  gcggagacat  tggagctgag  cgccgacggg  240
cgcccagtg  ccacacacac  gcgggacccg  ccggtgggtg  actgcacttg  ctttggcctc  300
cctcgccgct  acatcatcgc  gatcatgagc  ggtctgggtt  tctgcatcag  ctttggcatc  360
cgctgcaacc  tgggcgtggc  catcgtatcc  atggtcaaca  acagtacaac  coaccgtggg  420
ggccacgtgg  tgggtgcagaa  agcccagttc  aactgggac  cagagactgt  cggcctcata  480
catggctcct  ttttctgggg  gtacattgtc  actcagattc  ctggaggatt  tatctgccaa  540
aaattcgag  ccaacagggt  ctttggcttt  gccattgtgg  ctacctccac  cctaantatg  600
ttgatccctt  cagcagcccg  tgttcaactat  ggctgtgtca  tcttcgtgag  gatccttcag  660
ggattgggtg  aggggggtcac  ataocctgct  tgccatggca  tctggagcaa  atggggccct  720
cccttagaac  ggagtgggt  ggogacgaca  gccttttgcg  gttcctatgc  cggggcagtg  780
gttgccatgc  ctctggctgg  ggtcctggta  cagtattcag  gatggagtgc  tgtcttctat  840
gtctatggca  gcttcgggat  ctttgggtac  ctgttctgg  tgcttgtctc  ctacgagtca  900
cctgcactac  accccagcat  ctccgaggag  gagcgcaaat  acattgagga  tgccatcgga  960
gaaagcgcca  agotcatgaa  ccctgttacg  aagtttaaca  caccctggag  gcgcttcttt  1020
acctccatgc  cggctctatgc  catcattgtc  gccaaacttt  gccgcagctg  gactttctac  1080
ctgctcctca  tctcccagcc  cgctactttt  gaagaagtgt  tcggctttga  gatcagcaag  1140
gtgggactgg  tgtcggcact  gcctcacctt  gtcatgacta  tcacgtacc  catcggaggc  1200
cagatcgccg  acttcctgcg  cagtctcat  ataatgtcca  cgaccaatgt  gcgaaagctg  1260
atgaactgcg  ggggtttcgg  gatggaagct  acgctgctgc  tgggtggtcg  atactcacac  1320
tccaaggggcg  tggccatctc  ctctctggtc  ctggctgtgg  gcttcagtgg  ctttgtctac  1380
tctgggttta  acgtgaacca  cttggacatc  gcccctcgat  atgccagcat  cttgatgggc  1440
atttccaatg  gcgtgggcac  actgtctggg  atggtgtgcc  ccatcatcgt  gggtgcaatg  1500
accaagcaca  agacgcggga  ggagtggcag  tacgtgttcc  tcatagcctc  cctggtgcac  1560
tatggagggt  tcatcttcta  tggggtcttt  gcttcgggag  agaaacagcc  gtgggcagag  1620
ccggaggaga  tgagcgagga  gaagtgtggc  tttgttggcc  acgaccagct  ggctggcagt  1680
gacgaaagtg  aaatggaaga  cgaggttgag  ccccgggggg  cccccccgc  acctccgct  1740
tctacgggg  ccacacacag  cacagttcag  cctccaaggc  cccaccccc  tgtccgggac  1800
tactgaccac  gtgcctccca  ctggtgggca  gtttcagga  cctccactcg  atacacctct  1860
agoctaaacg  gcagtgtcga  ggaaccccc  tctctcctg  cctcaggctt  aagatgcaag  1920
tcttcccttg  tgccagtg  tgtccgacca  gccctctctc  cttctcaact  gcctcttgca  1980
ggggtgaagc  tgcacactag  cagtttcaag  ctggtgccga  attc

```

Fig. 1f)

```

1    MEFRQEEFRK LAGRALGRLH RLLEKRQEGA ETELSADGR FVTTHTRDPP VVDCTCFGLP
51   RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG HVVVQKAQFN WDPETVGLIH
101  GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG
151  LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFTV
201  YGSFGIFWYL FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPVTK FNTPWRRFFT
251  SMPVYAIIVA NPCRSTWTFYL LLISQPAYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV MTIIVPIGGQ
301  IADFLRSRHI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS KGVASFLVL AVGFSGFAIS
351  GFNVNHLDA PRYASILMGI SNGVGTLSGM VCPPIVGAMT KHKTREBNQY VFLLIASLVHY
401  GGVIFYGVFA SGEKQFWAEP BEMSEKCGF VGHDQLAGSD ESEMEDEVEP PGAPPAPPPS
451  YGATHSTVQP PRPPPPVRDY

```

Fig. 1g)

```

1      cggccgccccg ggccccggggg cgggggggatt ggcagggggac ccgcgtgggc acagccacca
61     tggagttccg gcaggaggag ttccgggaagc tggcggggcg cgccctgggg aggtgacac
121    gggtactgga gaagcggcag gaaggcggcg agacactgga gctgagtgcc gacgggcggc
181    cagtgaccac gcacactcgg gaccgcctg tgggtgactg cactgcttt ggctccctc
241    gtcgtacat catcgccatc atgagcggtc tgggtttctg tatcagcttt ggcatccgt
301    gcaacctggg cgtggccatc gtgtccatgg tcaacaacag cacaaccac cgtggggggc
361    acgtgggtgg gcagaaagcc cagttcaact gggatccaga gactgtcggc ctcatatcg
421    gtccttttt ctggggctac attgtcactc agattcctgg aggtattatc tgccaaaaat
481    tcgcagccaa cagggtcttt ggctttgcca ttgtggctac ctccacccta aacatgttga
541    tccttcagc agcccgctt cactatggct gtgtcatctt cgtgaggatc cttcagggat
601    tgggtggagg gggtcacatac cctgcttggc atggcatctg gagcaaatgg gccccctct
661    tagaacggag tcggctggca acgacagcct ttgtcggttc ctatgctggg gcggtggttg
721    ccatgccctt ggctggggtc cttgtgcagt attcaggatg gaggttctgt ttctatgtct
781    atggcagctt cgggatcttt tggtagctgt tctggttgc tgtctcctat gagtccagg
841    cactgcaccc cagcatctct gaggaggagc gcaaatatc tgaggatgcc atcggggaga
901    ggcgcaagct catgaacct gttacgaagt ttaacacacc ctggaggcgc ttctttactg
961    ccatggcggt ctatgccatc atcgttgcca acttttgccg cagctggacc ttctacgtgc
1021   tcctcatctc tcagcccgcc tactttgaag aagtgttcgg ctttgagatc agcaagggtg
1081   ggctggtgtc ggcgctgctt caecttgtca tgaccatcat cgtaccatt ggaggccaga
1141   tcgotgactt tttgcgcagt cgtcacataa tgtccactac caacgtgcca aagctcatga
1201   actgccccgg tttcgggatg gaagccacgc tgcctgctgg ggtcgggatac tcgcactcca
1261   agggcggtgg catctccttc ctggctctgg ctgtgggctt cagtggcttt gccatctctg
1321   ggtttaacgt gaaccacttg gacatcgccc ctgctatgc cagcatcttg atgggcatct
1381   ccaatggcgt gggcacactg tctgggatgg tgtgccccat catcgtgggt gcaatgacca
1441   agcacaaagc gcgggaggag tggcagtagc tgttctcat agcctccctg gtgcactacg
1501   gcggtgtcat cttctatggg gtctttgctt cgggagagaa gcagccgtgg gcagagccgg
1561   aggagatgag caggagagaag tgtggctttg ttggccacga ccagctggct ggcagtgcg
1621   aaagtgaant ggaggacgag gctgagcccc caggggcgcc cccgcgcgcg cctccgtct
1681   acggggccac acacagoaca gtgcagcctc cgaggccccc gccccctgtc cgggactact
1741   gaccaogggc ctcccactgt ggggcagttt ccaggacttc cactccatac acctctagcc
1801   tagcgggtag tgcgaggaa cccactcct cccctgctc aggccttaaga tgcaagtcct
1861   cccttggttc cagtgtgtc cgaccagccc tctttcctc tcaactgcct cctgoggggg
1921   gtgaagctgc acactagcag ttccaaggat acccagactc cctgaaagt cgttctcgc
1981   ttgtttctgc ctgtgtgggc tcaaatctcc cctttgagg ctttatttgg agggacagtt
2041   caacctcttc ctctcttgtg gttttgaggt ttcacccct cccccaagac ccagggtatt
2101   ctcaggctac cccgagatta ttcagggtgt cccctactca gaagacttca tggctgtct
2161   ctattagttt caaggctcgc ctaaccaant ctacattttt ccaagctggt ttaacctaac
2221   caccaatgoc gcggttccca ggactgatc tcaccagcgt ttctgaggga aaatggcggt
2281   ttcaagtcct cccaccccc ttttcttccc tcgtccctc accagcacac tttgcggggc
2341   cttagacctt gcttagtaca atcattgtc agggaaatgg ccaaatggc tctgctcac
2401   ccgtgctctt tttctgactc agttttcagg tctcagtagt ggtgccccaa agctattaat
2461   tcagcggttc gaggccacct ctctctccc gtggtggttt caggatcccc ctgcccccc
2521   cccccccaaa tcttgcact ttattctctt ggggtggttc aggcgcctt cgtttctca
2581   gtggccattt gttgtgtgtc cctcaggggc taatgatctt caaatctggg gtgcttcccc
2641   tcatagacac cctctctca acgtagaat ctgggtgggg gtgaggtgtg tgagagaagt
2701   tacagaatcc caggaaaggg agcggggctg ggaggagagg gttgttctg gggcagggtc
2761   gtgtcttgggt gtctgtctct gtgacgtaaa tctgccccg cccacccca ctcccaataa
2821   acgctctggt gtacgg

```

Fig. 1h)

```

1      MEFRQBEFRK LAGRALGR LH RLEKREQEGA ETLELSADGR PVTTHTRDPP VVDCTCFGLP
61     RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAVISM VNNSTTHRGG HVVVQKAQFN WDPETVGLIH
121    GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG
181    LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFFV
241    YGSFGIFWYL FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPFVK FNTFWRFFFT
301    SMPVYAIIVA NFCRSWTFYL LLISQPAYFE EVFGPEISKV GLVSALPHLV MTIIVPIGGQ
361    IADFLRSRHI MSTTNVRKLM NCGGPGMEAT LLLVVGYSHS KGVASIFLVL AVGFSGFAIS
421    GFNVNHLIDIA FRYASILMGI SNGVGTLSGM VCPPIVGAMT KHKTREEWQY VFLLIASLVHY
481    GGVIFYGVFA SGEKQPWAEF EEMSEBKCGF VGHDQLAGSD ESEMEDEAEF PGAPPAPPPS
541    YGATHSTVQP PRPPFPVRDY

```

Fig. 2a)

```

cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgaattcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgcgct ctttgccacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct cccttctctc actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgcacac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tcctcgccct 360
tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaattggaat 420
ccgtaaaaca aaggattttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatttt gctggaaaat 480
cactcgggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc 540
tgacgggga tgggaagccc cttagagggtg ccgagaggaa ggccgcgctg tgcgactgca 600
cgtgcttcgg cctgccccgc cgctacatta tcgccatcat gagcggcctg ggcttctgca 660
tctccttcgg tatcgctgc aacctgggcg tggccattgt ggacatggtc aacaacagca 720
ccatccaccg cgggggcaag gtcacaaagg agaaagccaa attcaactgg gaccggaaa 780
ccgtggggat gatccacggg tcttctttt ggggctacat catcactcag attccgggag 840
gctacatcgc gtctcggtg gcagccaaca gggttttcgg agctgccata cttcttacct 900
ctaccctaaa tatgctaatt ccatcagcag ccagagtga ttatggatgt gtcactttt 960
tcagaatact gcagggactt gttgagggtg tgacctacc agcatgtcat gggatatgga 1020
gcaaatggc cccacctcta gagaggagta gactggcaac cacctcctt tgtggttcct 1080
atgcgggagc tgtgattgca atgcctttag ctggcattct tgtgcagtac actggctgg 1140
cttcagtgtt ttatgtctac ggaagctttg gaatggtctg gtacatgttt tggcttttgg 1200
tgtcttatga aagtcttgc aagcatccta ctattacaga tgaagaacgt aggtacatag 1260
aagaaagcat tggagagagt gcaaatctt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat 1320
ggaggaagtt ttttacatcc atgocagtct atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa 1380
gctggacttt ttatttattg cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat 1440
ttgaaattag caaggttgg atgctatctg ctgtgcaca cttagtaatg acaattattg 1500
tgctattgg gggacaaatt gcagattttc taagaagcaa gcagattctt tcaactacga 1560
cagtgaagaa tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1620
ttggctattc tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1680
gtggatttgc tatatctggg ttcaatgta accacttgg tatcgctcca agatattgcca 1740
gtatcttaat gggcatttgc aatgggtgtg gcacattgtc aggaatgggt ttgtctatca 1800
ttgttgggtc aatgacaaag aataagtcac gtgaagagtg gcagtatgtc ttctgatcg 1860
ctgccctagt ccactatggg ggagttatat ttatgcaat atttgctca ggagagaaac 1920
aaccctgggc agaccggag gaaacaagtg aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg 1980
aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatgg accaccaagt 2040
cttatgggtc cacaacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaaaggag 2100
aatttgtaca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat 2160
aacaaaacta attactggat ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac 2220
aaaaatttta aaaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgctg 2280
taaaaatgaa aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taaaattgtg 2340
aagtccatc atttccattc aagtcacca ttcttgcat tgtgacttaa aggttgactg 2400
gtcaaaattg tagaaacaag tagttacca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
atttactaaa gcacaacatc tcactctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
gcaaatgca cttatatatt tgttacactg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
aagaatata ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
aatgtgagat attttgttag toctcaaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcag 2820
ttcttcacat catttaocta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa actcaattt 2880
tcatttagog tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaatgt 2940
attttttatt acaactttgt actgggtgtg acttgcatga gaaaaaaaaa agagatatat 3000
aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
taagaacaaa gaaatagaaa atgggtttaga tatctttctt cttcataat taaatactat 3120
atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatattg 3180
taagtaggta attttattat ttaaagtctt attaagaaat atttgtctta aatatatagg 3240

```

```

acaatacatt atattaaaaat ggtctctctc tatatatatc tgtatatctt atacatgtcc 3300
atacacagaa acataataaaa caatcttcac acgaaaccaa aaatagcata cacctaattgt 3360
tgggttaggg aattgcaatt tctactttca tagagtcata gaattttagg tggggaagag 3420
gcattttgct tgtcatttct taatataact caacaagaat tgcaacattt gtgtaccaag 3480
caataagtgc aatgcataaa atttcctgtc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag 3540
ctgtttgggt ggttggaata attttatttt tcttttaaaa aagctaacat cagacccctt 3600
tataatgtcc taaaattatg ataatacatt tcccaattca actcaaaaata ttattgggtgt 3660
atthttgtcta ttctggatat ttgatctgtt taatgtactg tgctagtgtac tggaggccct 3720
gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt ttaaaaaaat gcaaatcatt ctttacctta 3780
agaaaaaaaa aatacccttt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt 3840
gttgtgttga atgaaaatat gtggactgtc atthttgttg agcaaaaaag tgtaataaaa 3900
atgctctatt tatccttttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Fig. 2 b)

```

1   MESVKQRILA PGKEGLKNFA GKSLGQIYRV LEKKQDTGET IELTEDGKPL EVPERKAPLC
61  DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISFGIRCN LGVAIVDMVN NSTIHRGGKV IKEKAKFNWD
121 PETVGMINGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA ANRVFGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV
181 IFVRILQGLV EGVTPACHG IWSKNAPPLE RSRLATTSFC GSYAGAVIAM PLAGILVQYT
241 GNSSVFFVYG SFGMVWYMFV LLVSYESPAK HPTITDEERR YIBESIGESA NLLGAMEKFK
301 TPWRKFPTSM PVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFEEV FGFEISKVGM LSAVPHLVM
361 IIVPIGGQIA DFLRSKQILS TTTVRKIMNC GGFGMEATLL LVVGYSHTRG VAISFLVLAV
421 GPSGFAISGF NVNHLDIAPR YASILMGISN GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREENQYVF
481 LIAALVHYGG VIFYAIFASG EKQPWADPEE TSBEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT
541 TKSYGATTQA NGGWPSGWEK KEEFVQGEVQ DSHSYKDRVD YS

```

Fig. 2c)

```

agacagtaag gttcttttgc ttttttccct tacacaagga ttcgatgaog tttttggtca 60
atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gttaagactt caaaaccggg aatttacgtt 120
gtttttoggt gaggtgactt ccagAACggg gactcatcag caccgcCCA aataccacgg 180
cactgogcgc gccctcggcc accggatcct ccccttccaa tgagactttg tgaotgtgtg 240
taccaattct cctattagga aaccctggg ctgaatgcag ctattccgtt gtactctctt 300
tctcgctctc cctcccctct ccaactcaca gccttgcTga aaagctcatc totgctgaga 360
agaaaacggt ctaccttaac ctattaagac tatgCgcaga actcgccctt catagccatc 420
acaattttaa tctggtaagg ctggacaoga gtctttacaa gaatggagtc ggtaaaaaa 480
aggattttgg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc cctcggaacg 540
atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccacogagct gacagaggac 600
ggcaagcccc tggaggtgcc tgagaagaag gctccgctat ggcactgtac gtgcttcggc 660
ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcgccctog gcttctgcat ctcccttggT 720
atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatggtca acaacagcac catccaccgg 780
ggtggcaag ttatcaagga gaaagccaag tttaactggg accccgagac tgtggggatg 840
attcacgggt ogttcttctg gggctatctc atcacgcaga ttccgggggg atacatcgca 900
tcgcgactgg ctgctaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttaoctc taccctcaat 960
atgctgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgog tcatctttgt tagaatattg 1020
caaggacttg tggagggcgt cacotaccca gcctgtcacg ggatatggag caagtgggcc 1080
cctcctttgg agaggagtag gttggctacc acctccttct gtggttccta tgctggagca 1140
gtcattgcaa tgcccctagc tggatcctg gtgcagtaca ctggatggte ttcagtattt 1200
tacgtatatg gaagctttgg tatggctctg tatatgttct ggcttctggT gtcttacgag 1260
agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc 1320
ggggagagcg caaatctgtt aggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagtTt 1380
ttcacatcca tgcccgctca tgcgataatt gttgcaaact totgcaggag ttggactttt 1440
tatttactgc tcatcagTca accagcttat ttogaggagg tttttggatt tgaaatcagc 1500
aaggttggca tgttgtctgc ggtcccacac ctggtcatga caatcattgt gcctatcggg 1560
gggcaaattg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaag 1620
atcatgaact gcgggggttt tggcatggaa gccacactgc ttctggttgt tggctactct 1680
catactagag gggTggccat ctccctcttg gtgcttgCag tgggattcag tggatttgcT 1740
atctctgggt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatatgccag tatcttaatg 1800
ggcatttcaa atgggtgttg cacgctgtcg ggaatggctt gcccgatcat tgttggTgca 1860
atgaogaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggTc 1920
cactatgggt gagtcatatt ttatgcacta ttTgcctcag gagagaagca accttgggca 1980
gacctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa 2040
gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccaccaaate ctacggcgcc 2100
acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga atttgtgcaa 2160
gaaagtgcgc aagacgcgta ctocataaag gaccgagatg attattcata acgaagctag 2220
ttgctggatt cctttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgattgcaca aaatcatttt 2280
aagaaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttgctg ttcaaaaaat 2340
aataataata tgaattcaa acagaccgtg agagtcccat caagtgcaat ctgtggcggc 2400
agtcacgtga cgcattttcc attcaggcca ttcgctcctt tcgtttgtga tttaaaggTt 2460
tctgtagaa ataagtaggt attcgTtgg tccatcacca cgttagagag tacaactaca 2520
acagttggca catgtcatcc tacggaagtT aggaagccaa agctaactgga ttatgtgaac 2580
tgcaattatt tatttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga 2640
catagtagaa ctggaaagat ggctagattg ggtactgaog ataatcattg tgtgtatctc 2700
atggagtggc tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg 2760
aattattatt aggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat ctccaaaag ctatatctTg 2820
agtgttttgt gaaacgcTtg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg 2880
gaggagtatg tccatgctc tccaktcac tccctgacag tatcaaacct tcacattTca 2940
atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaatataaga 3000
agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggTtgtaac ttgcattagg 3060
aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat 3120
agcccttaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttctctg 3180

```

```

ataactagag actatatgga actcacacca caaagctata tataatatga aaagataaac 3240
aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaattgt cccattttaag aggtattttgt 3300
cttgagtata tagtacaaag tatattaaaa ttatatctac atccctgtat atcttataca 3360
tatccactca cacaacata acaataactt ttcacacaga accaaaaaca agcatacacc 3420
taatgttggg tttggggatt gcaattttct ctttcataga gtcatagaat tttagatggg 3480
aaaaaaaaag gcatttttgc cgtcattttct taatataatt aattcaacag gaactgcaac 3540
at ttgtgttac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gtgtgtaaac tatcccata 3600
ctgcttggg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcgag ctctttacaa 3660
tg ttttgcgc tgataagaat gcacatccca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgtt 3720
acctgtctgt tttgggtatt tgggtctgtt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggcctg 3780
ctactgcgaa tataaaacgt gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga 3840
aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgaccat aacccttgc 3900
gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttgctgc gaagcaagtg ttaataaaat 3960
gttctattta aaaaaaaaaa aa

```

Fig. 2d)

```

1   MESVKQRILA PGKEGIKNFA GKSLGQIYRV LEKKQDNRET IELTEDGKPL
51  EVPEKKAPLC DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISFGIRCN LGVAIVDMVN
101 NSTIHRGGKV IKEKAKFNWD PETVGMINGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA
151 ANRVPGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV IFVRILQGLV EGV TYPACHG
201 IWSKWAPPLE RSRLATTSFC GSYAGAVIAM PLAGILVQYT GWSSVFYVYG
251 SFGMVWYMFV LLVSYESPAC HPTITDEERR YIEESIGESA NLLGAMEKFK
301 TPWRKFFTSM PVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFEEV FGFEISKVGM
351 LSAVPHLVMT IIVPIGGQIA DFLRSKQILS TTTVRKIMNC GGFGMEATLL
401 LVVGYSHTRG VAISFLVLAV GFSGF AISGF NVNHLDIAPR YASILMGISN
451 GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREEWQYVF LIAALVHYGG VIFYALFASG
501 EKQPWADPEE TSBEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT TKSYGATSQE
551 NGGWPNGWKEE KEFVQESAQ DAYSYKDRDD YS

```

Fig. 2e)

```

1   ggcacgagggc tcagtcttaa ttccactctg ccactctgcc gcagagcaca attacgcggg
61  cgcgatggga ggagaccatg ttaaggcagg aagctaacag cagccgctca cctgaggcct
121 aggaagctcc caagggttct gagagotatg agctctgate agcaagtca ccattttaga
181 cagtaggggtt cttttgcttt ttcccttaca caagggttcg atgacgtttc tggccaatct
241 gattaaaaga cagcggtatt gattgcgata agacttcaaa accgggaatt tacgttggtt
301 ttcggtgagg tgacttccag aacagggaact catcagcacc cgcccaata ccacggcact
361 gcgcgcgccc tcggccaccg gatcctcccc ttccaatgag actttgtgac tgtgtgtacc
421 aattctccta ttaggaaacc cgtgggctgc atgcagctat tctgtgtac totctttctc
481 gccctccctc ccctctccaa ctccacagct tgctggaag ctcacctctg ctgagaagaa
541 aaagctctac cttaaaccaac taagactatg cgcagaatcc gtctttcata gccacaacaa
601 tttaaatctg gtaaggctgg acaccagtct ttacaagaat ggagtcggta aaacaaagga
661 ttttggcccc ggggaaagag gggataaaga attttgcctg aaaatccctc ggacagatct
721 acaggggtget ggagaagaag caggacaacc gagagaccat cgagctgaca ggggacggta
781 agccccctga ggtgcctgag aagaaggctc cgtatgcga ctgcacgtgc ttcggcctgc
841 ogcgccgcta catcatagcc atcatagcgc gcctcggtt ctgcatacc ttcggcctcc
901 gctgtaacct gggcgtggcc atcgtggaca tggtaacaa cagcactatc caccgcggag
961 gcaaagttat caaggagaaa gccaaattta actgggaccc cgagaccgtg gggatgatcc
1021 acggatcggt cttctggggc tataatcatca ccoagattcc aggaggatat atcgcatcgc
1081 ggctggctgc taaccgggtc tttggggctg cgatactgct cactctacc ctcaatatgc
1141 tgatcccatc tgcagccaga gtgcattatg gatgtgtcat ctttgttagg atattgcaag
1201 gacttgtgga ggtgtgcacc taccagcct gtcatgggat atggagcaag tgggcccctc
1261 cctggagag gagtaggttg gctacaacct cctttgtgg ttccatgct ggagcagta
1321 ttgcaatgcc cttagctggt atccttctgc agtacactgg atggtcgtca gtattttatg
1381 tgtatggaag ctttggcatg gtctggtaca tgttctggct tctggtgtct tatgagagcc
1441 ctgcaaagca tctaccatt acagatgaag aacgtaggta catagaggag agcattggag
1501 agagcgcaaa tctgctaggt gcaatggaaa aatttaagac cccatggagg aagtttttca
1561 catccatgcc cgtctacgcg ataattgttg ccaacttctg caggagctgg actttttatt
1621 tactgetcat cagtcagcca gcttattttg aggaggttt tggatttgaa atcagcaagg
1681 ttgcatggtt gtctgcagtc cctcaccttg tcatgacaat cattgtgcct atcggggggc
1741 aaattgcaga tttcctaagg agcaagcaaa ttctctcaac aactacagtg agaaagatca
1801 tgaattgtgg gggtttttgg atggaagcca cgtgcttct ggttgttggc tactctcata
1861 ctgagggggt ggcacatctc ttcttggctg ttgcagtagg attcagtggg tttgctatct
1921 ctggtttcaa tgttaatcac ttggatatgt ctccaagata tgccagtatc ttaatgggca
1981 tttcaaatgg cgttggcacg ctgtcgggga tggtttggcc tatcattgtt ggtgcaatga
2041 caaagaataa gtcccgtaa gaatggcagt atgtcttct cattgtgca ctctgcact
2101 atggtggagt catattttat gcactatttg cctcaggaga gaascaacct tgggcagacc
2161 ctgaggaaac aagogaagaa aaatgtggct tcattcacga agatgaactg gatgaagaaa
2221 cgggggacat cactcagaat tacataaatt acgggtaccac caaatcttac ggtgctacct
2281 cacaggagaa tggaggctgg cctaaccggt gggagaaaaa ggaagaattt gtgcaagaag
2341 gtgcgcaaga cgcgtacacc tataaggacc gagatgatta ttcataacga tgcagttgc
2401 tggattcatt tgtagtgtt gtgaatcaat taattgtgat tgcacaaaaa taatttttaa
2461 aatgtggtgt gaacatgtaa acatatcaac caagcaagtc ttgctgttca aaaaaaaaaa
2521 aaaaaaaaaa

```

Fig. 2f)

```

1   MESVKQRILA PGKEGIKNFA GKSLGQIYRV LEKKQDNRET IELTEDGKPL EVPEKKAPLC
61  DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISPGIRCN LGVAIVDMVN NSTIHRGKV IKEKAKFNWD
121 PETVGMHGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA ANRVFGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV
181 IFVRILQGLV EGVTPACHG IWSKWAPPLE RSRLATTSFC GSYAGAVIAM FLAGILVQYT
241 GWSSVFYVYG SFGMVWYMFV LLVSYESPAK HPTITDEERR YIEESIGESA NLLGAMEKPK
301 TPWRKFFTSM FVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFEEV FGFEISKVGM LSAVPHLVM
361 IIVPIGQIA DFLRSKQILS TTVRKIMNC GGFGMEATLL LVVGYSHTRG VAISFLVLAV
421 GFSGFALSGF NVNHLDIAPR YASILMGISN GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREEWQYVF
481 LIAALVHYGG VIFYALPASG EKQPWADPEE TSEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT
541 TKSYGATSQE NGGWPNWWEK KEFVQBSAQ DAYTYKDRDD YS

```

Fig. 3)



Fig. 4)

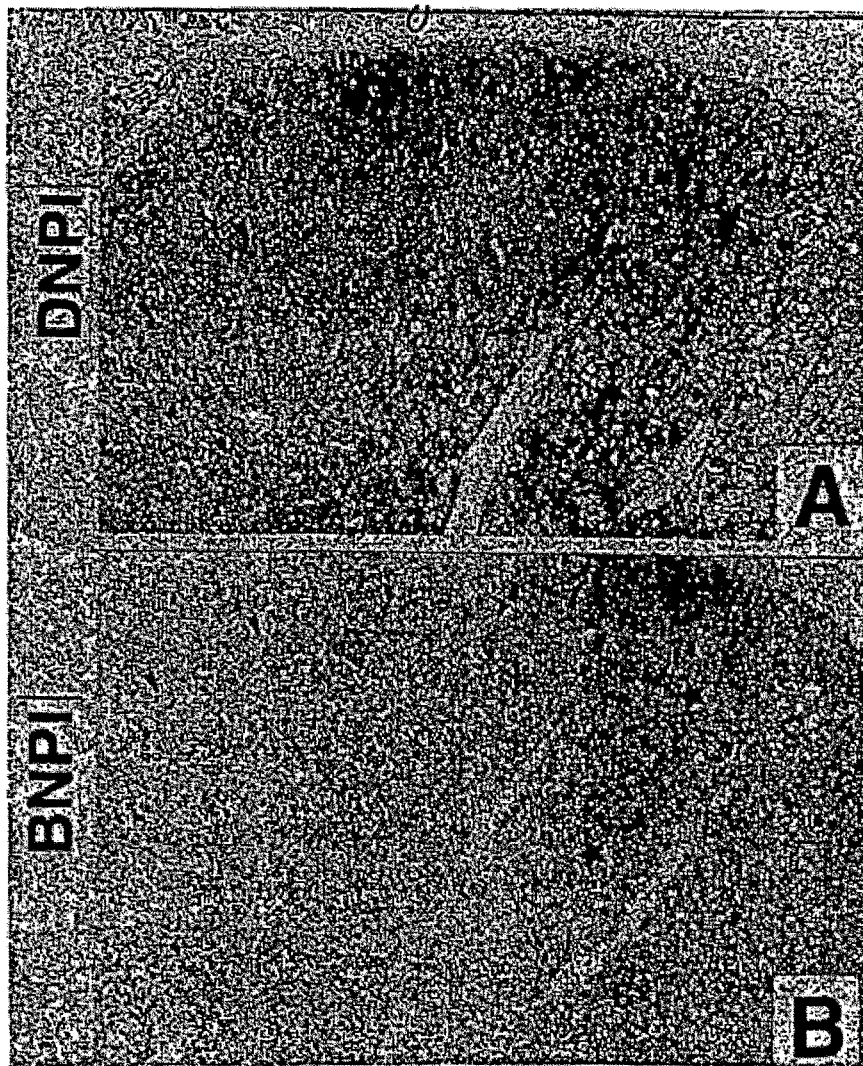


Fig. 5)

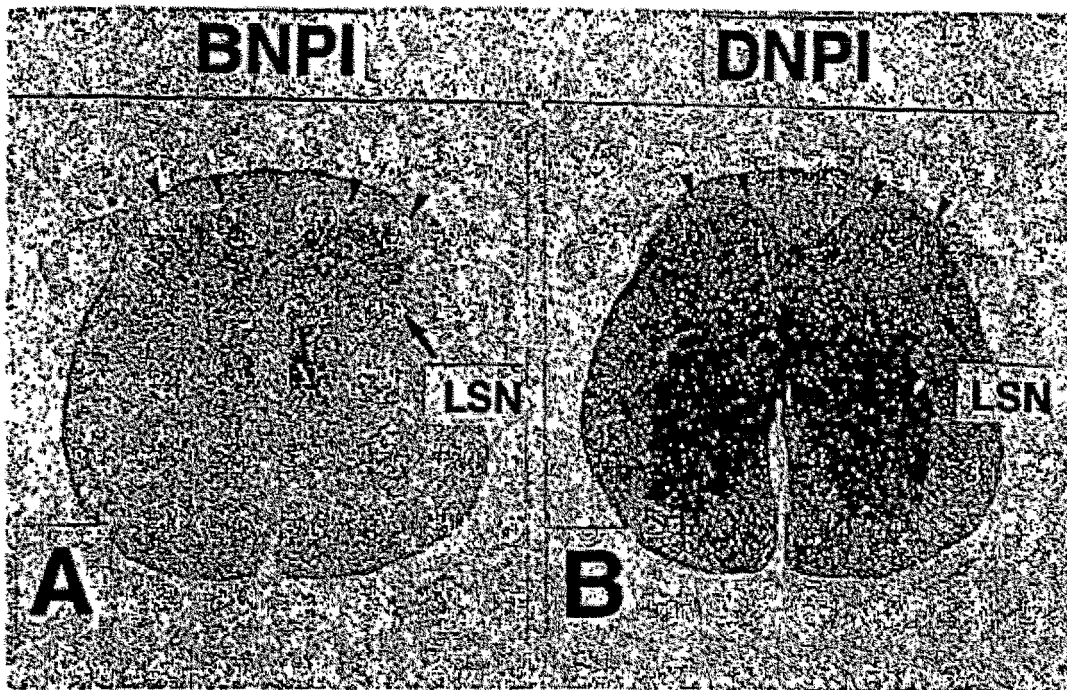


Fig. 6)

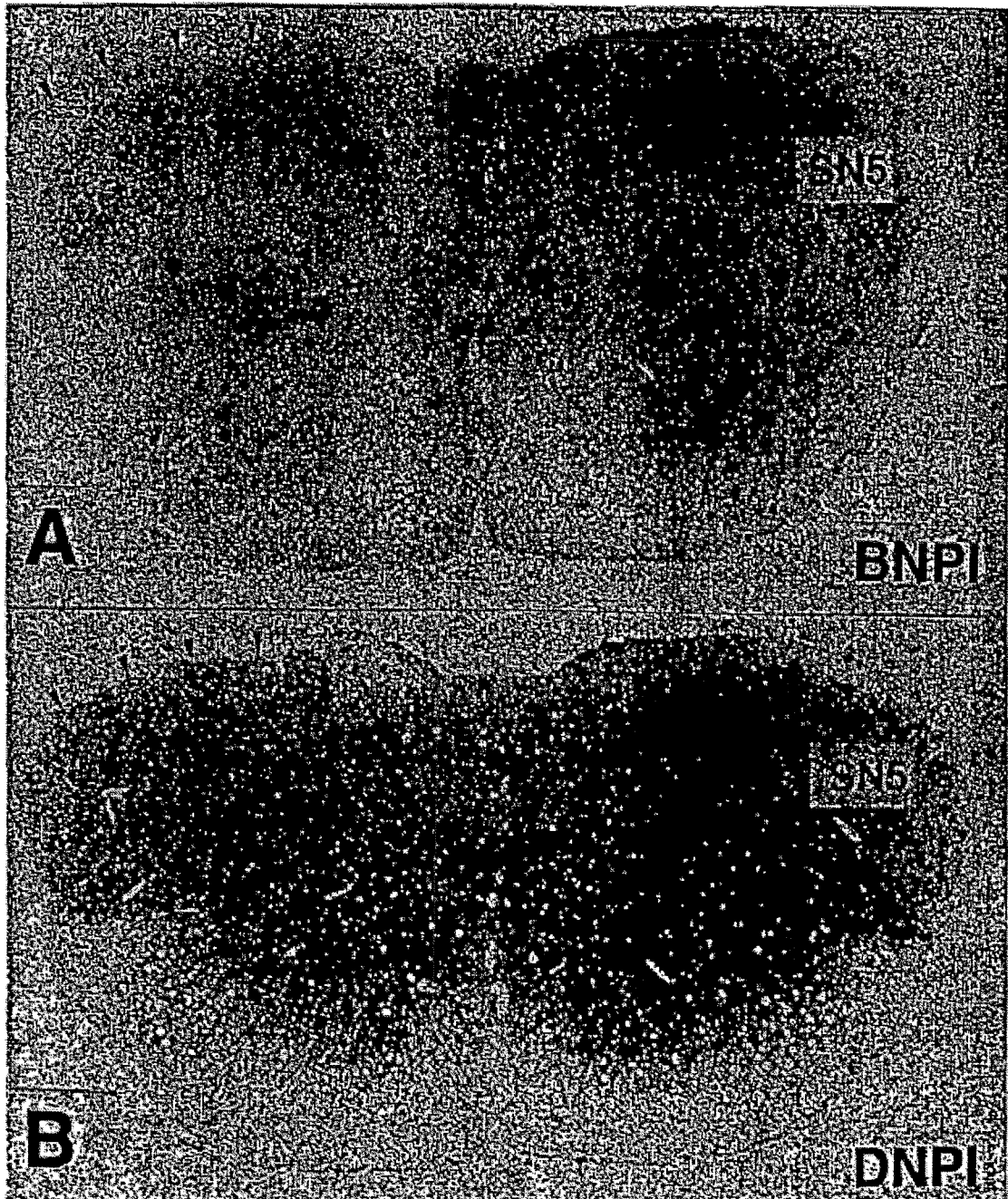


Fig. 7)

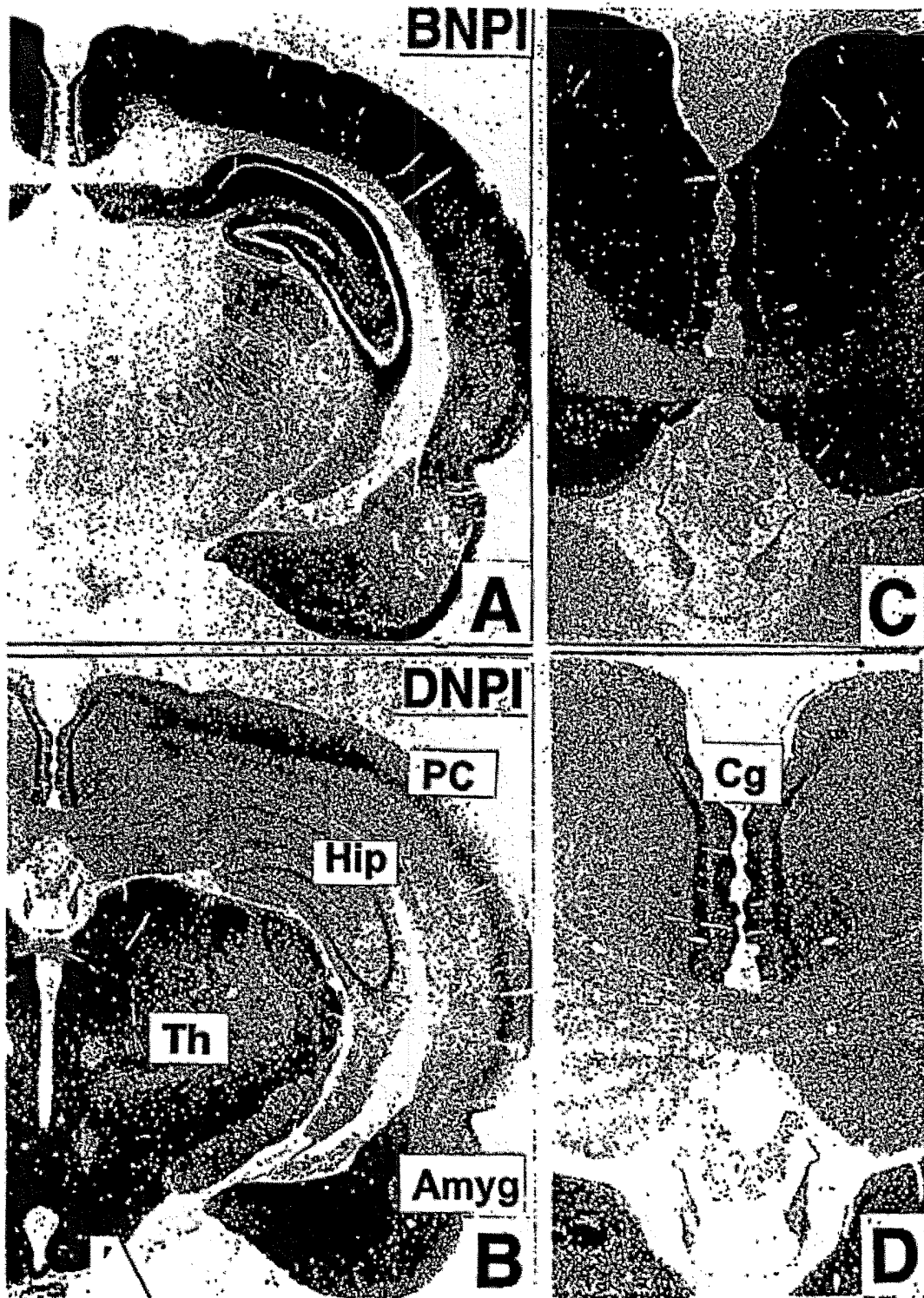


Fig. 8)

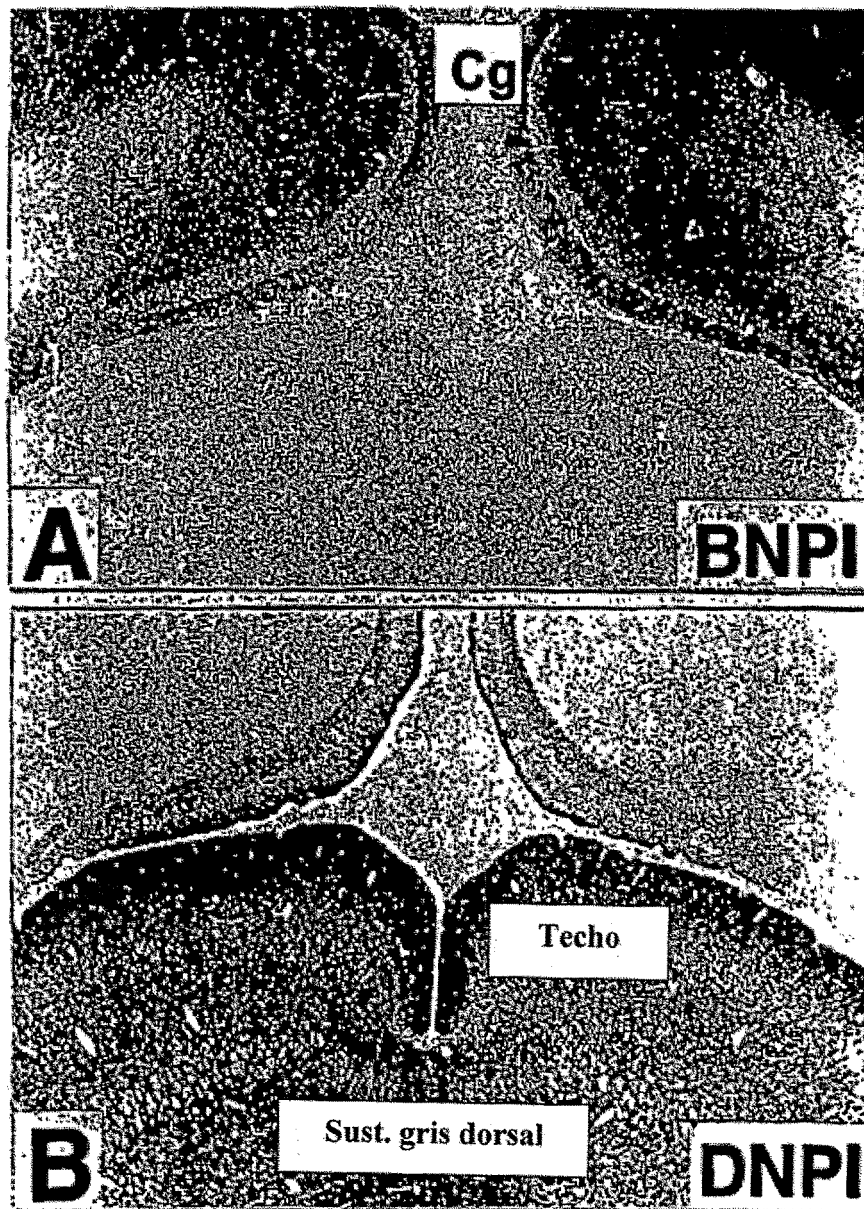


Fig. 9)

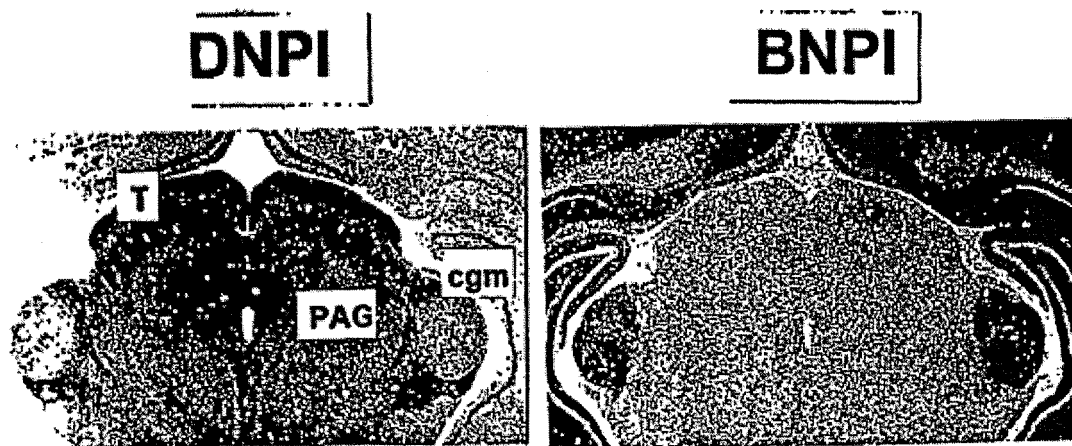


Fig. 10)

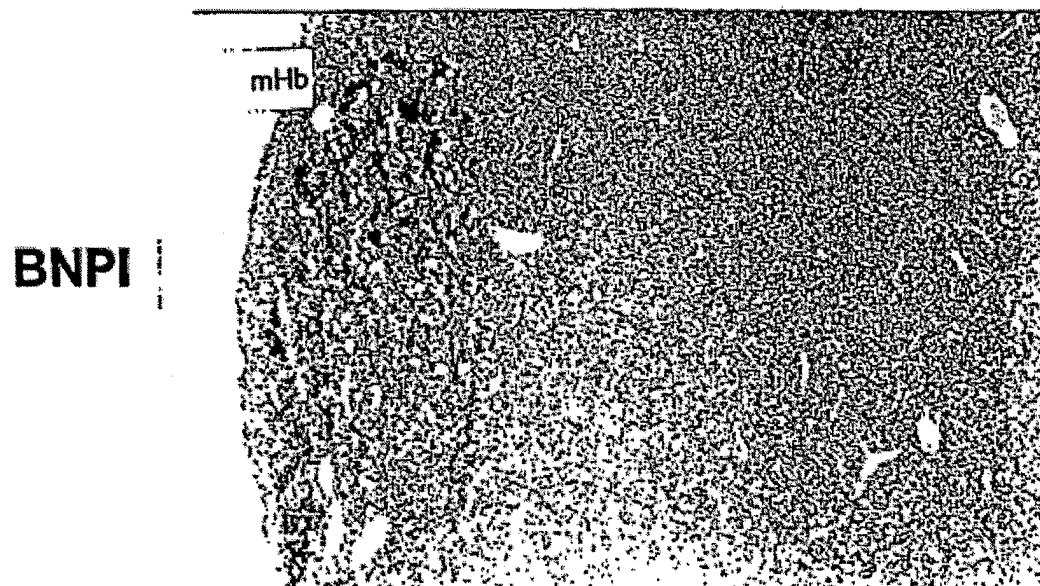
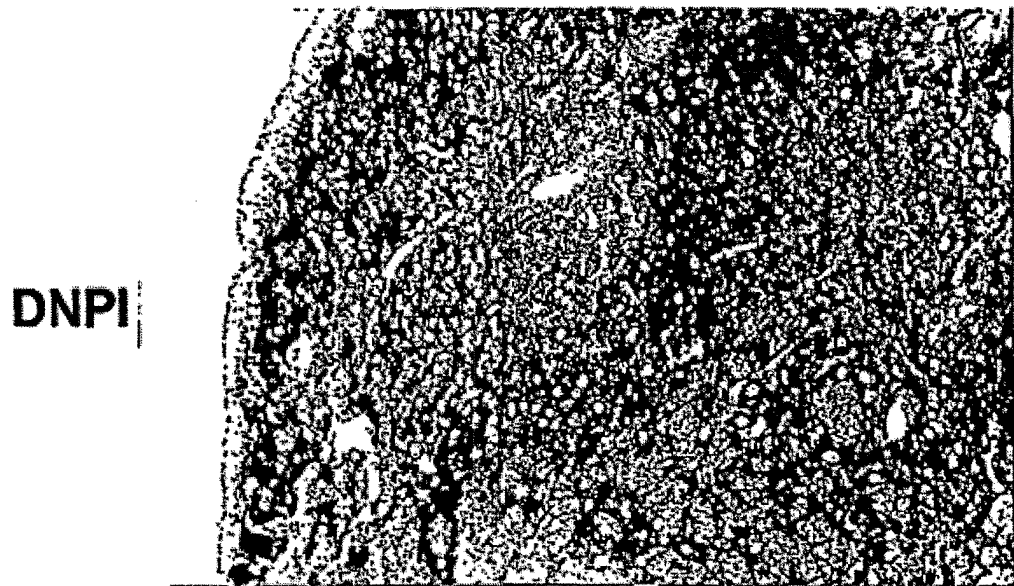
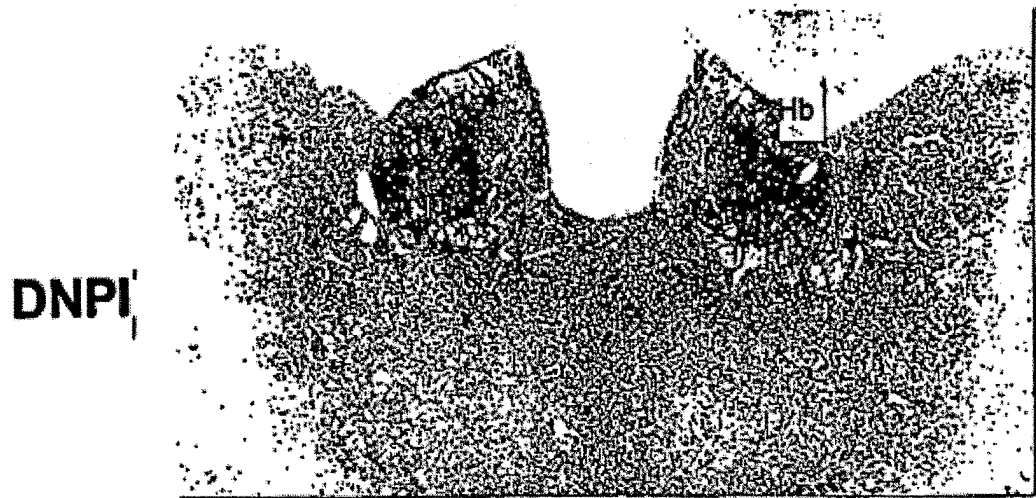


Fig. 11)

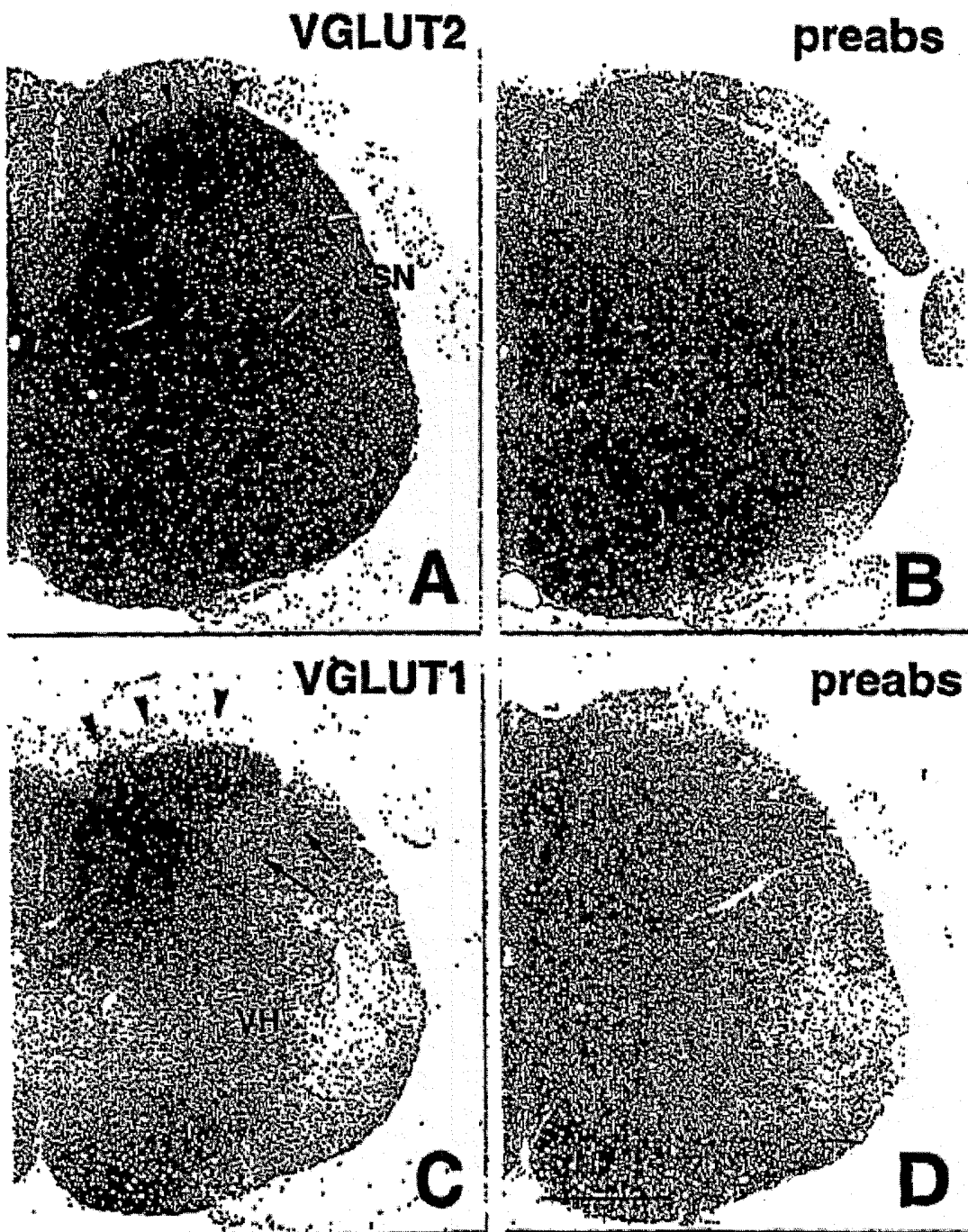


Fig. 12)

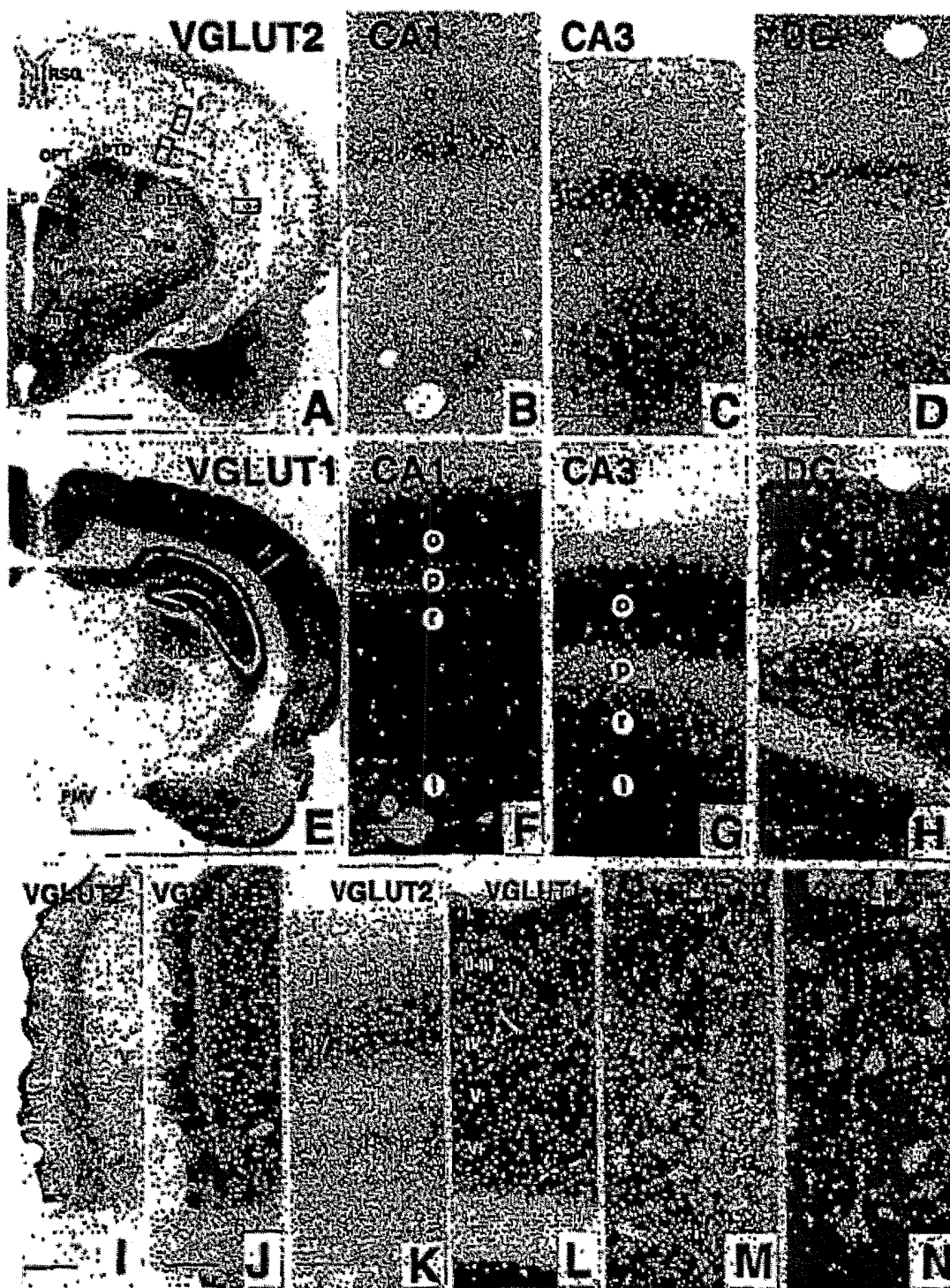


Fig. 13)

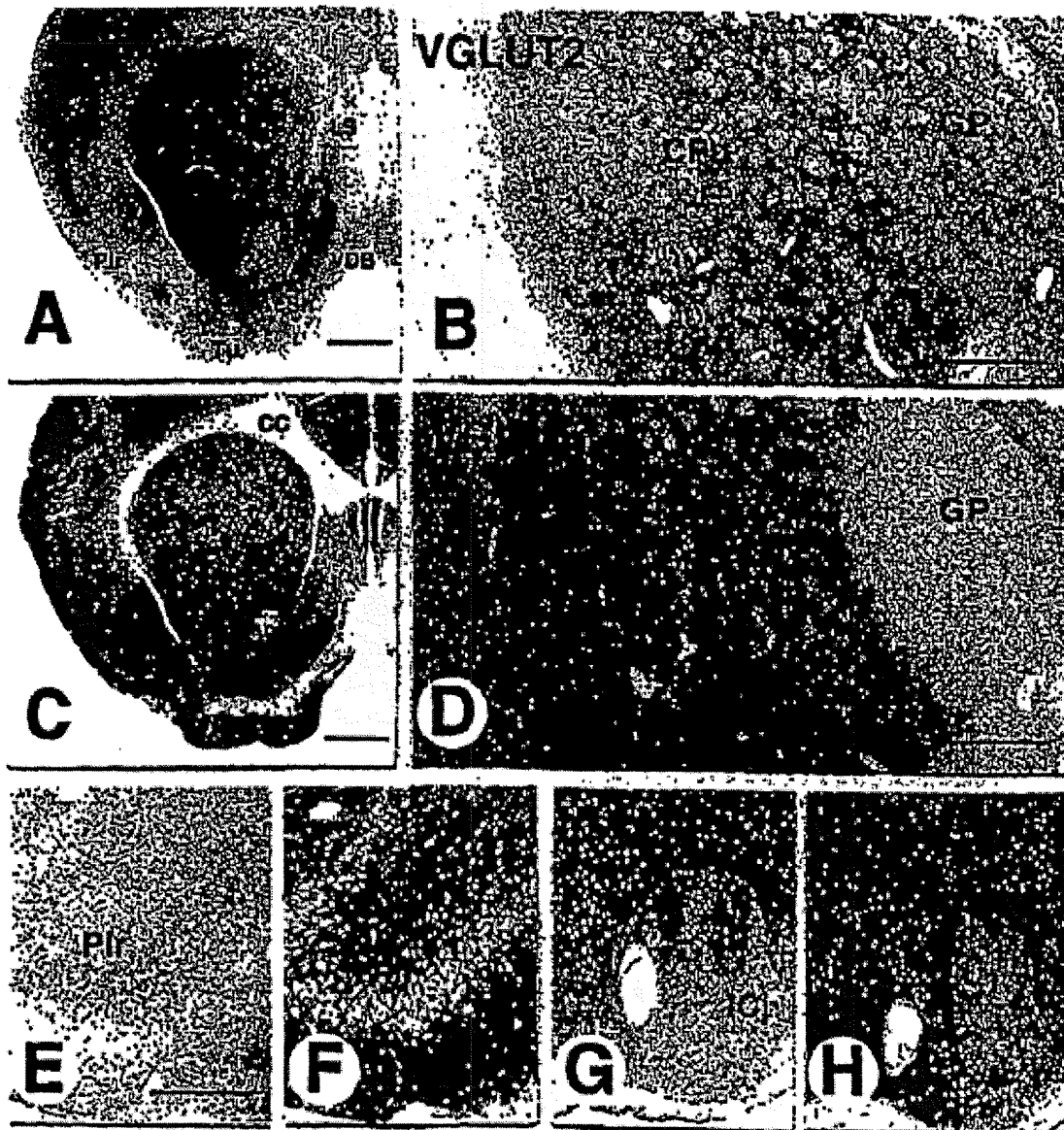


Fig. 14)

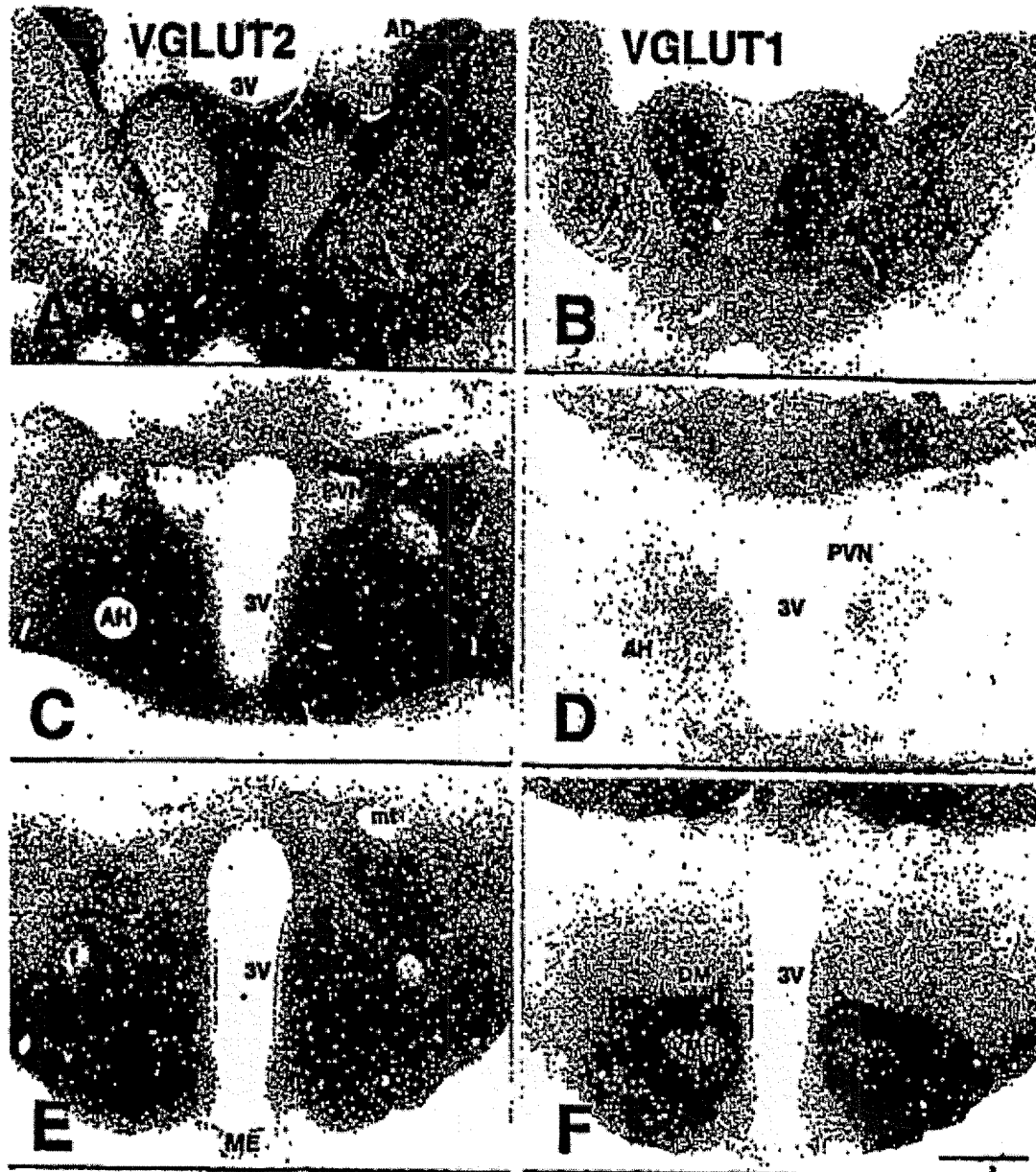


Fig. 15)

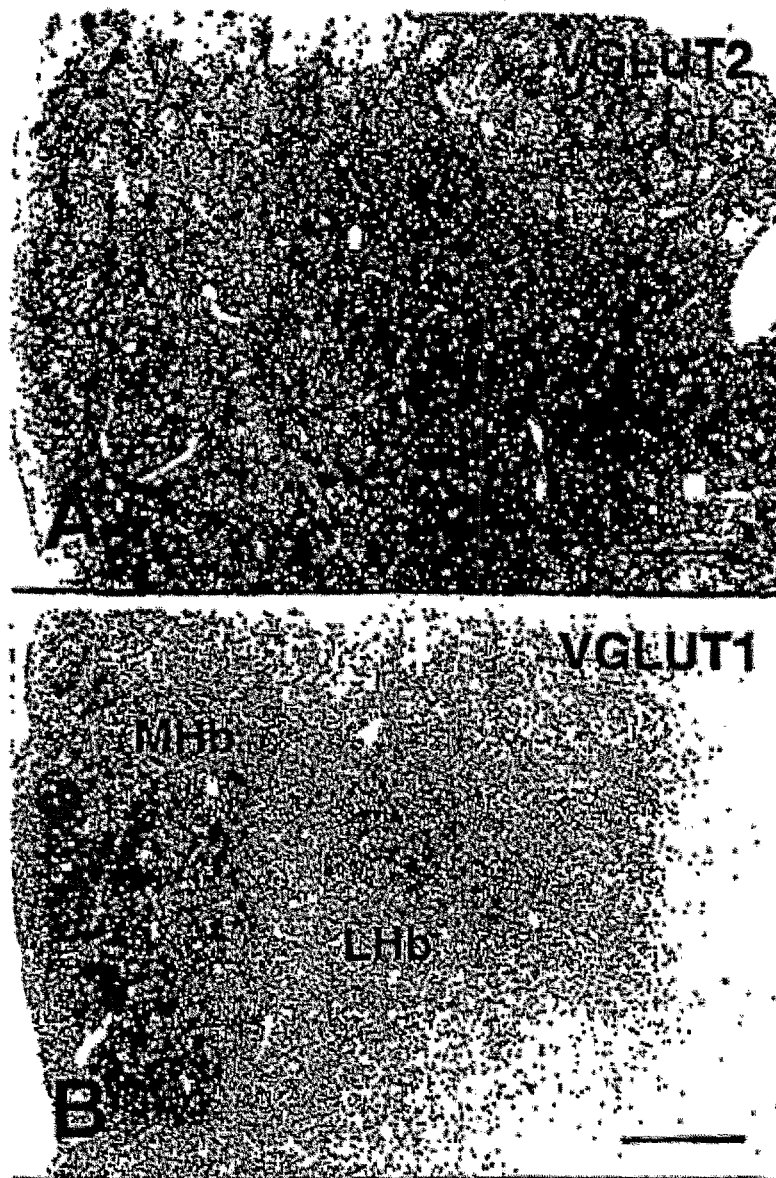


Fig. 16)

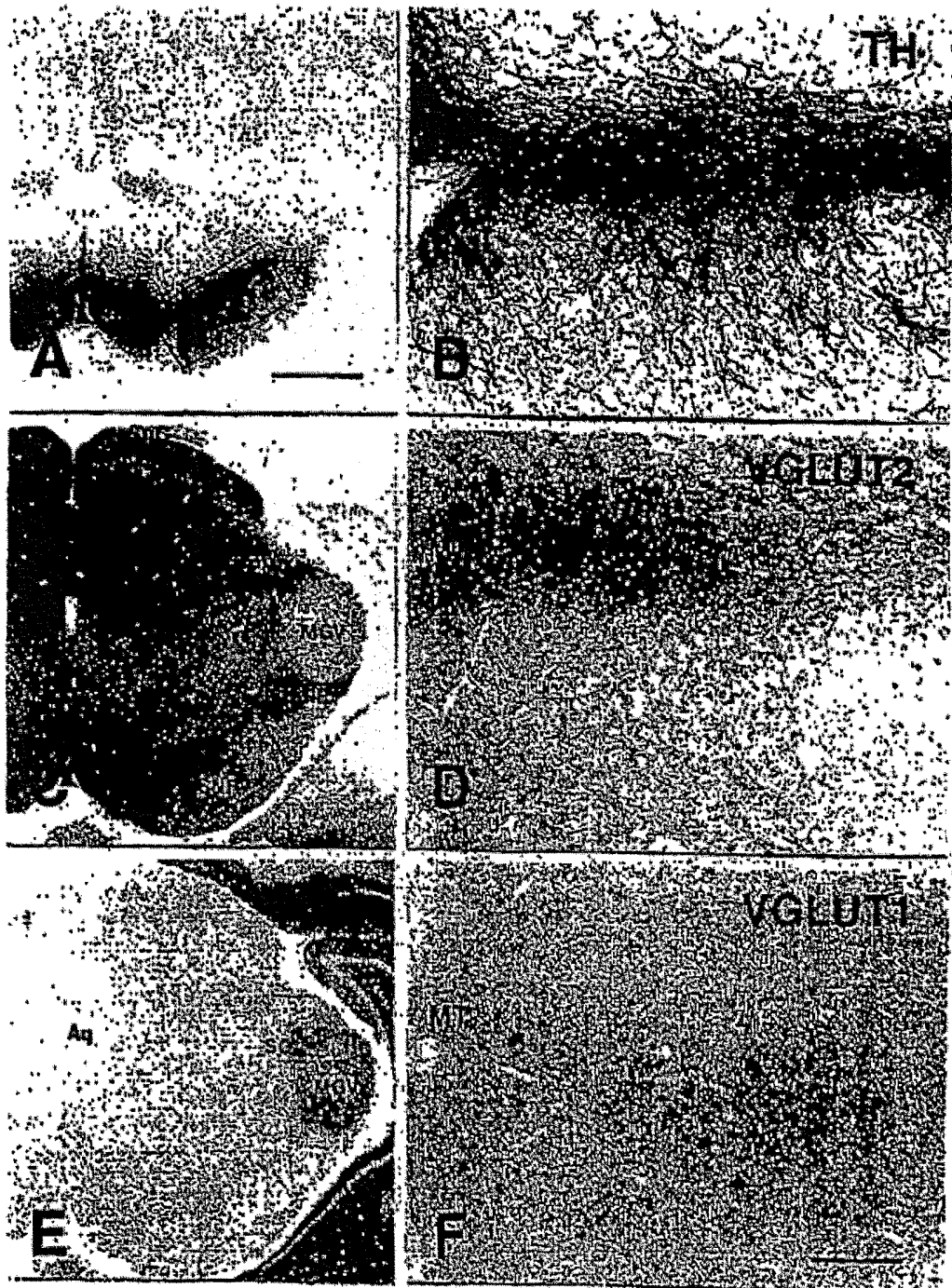


Fig. 17)

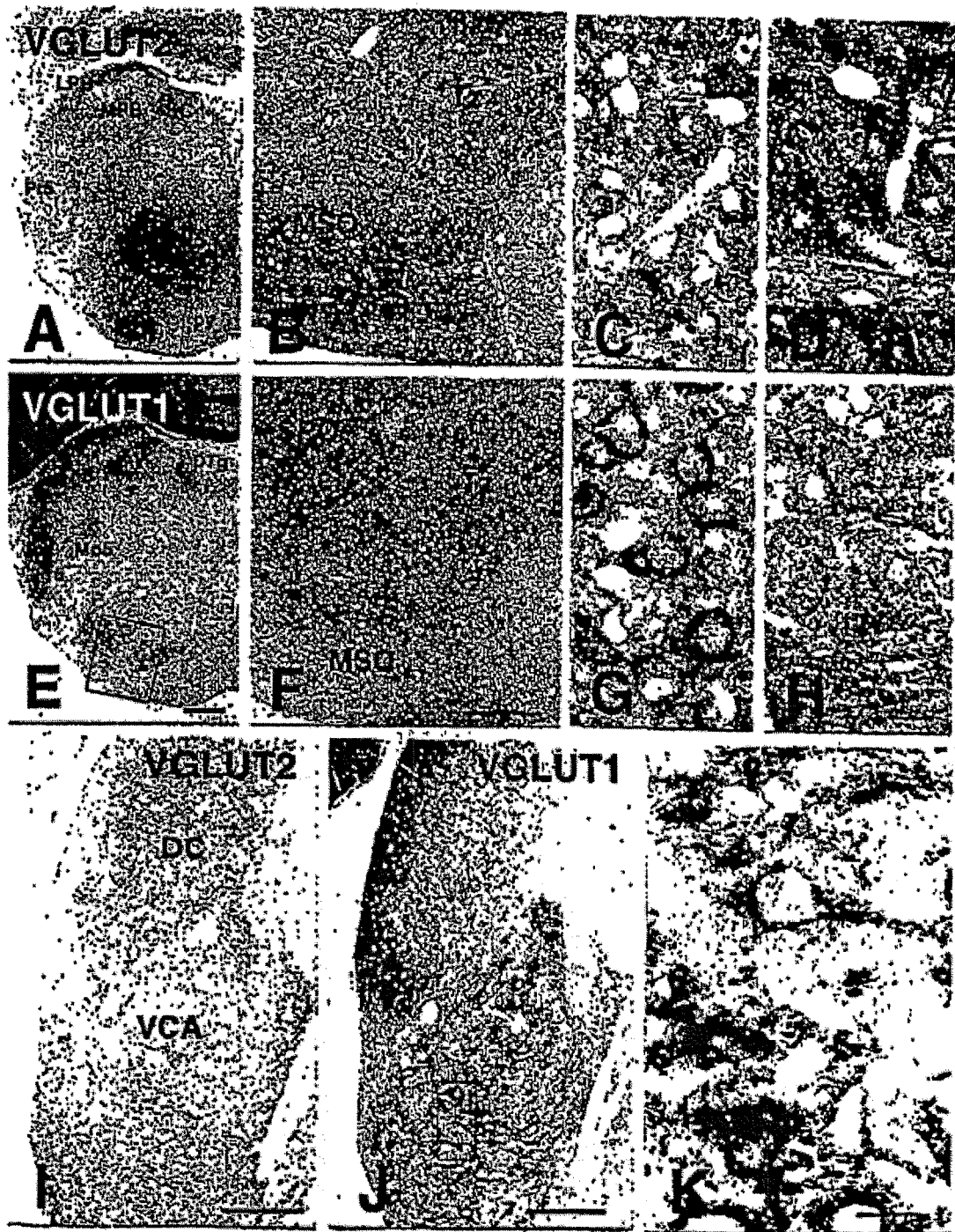


Fig. 18)

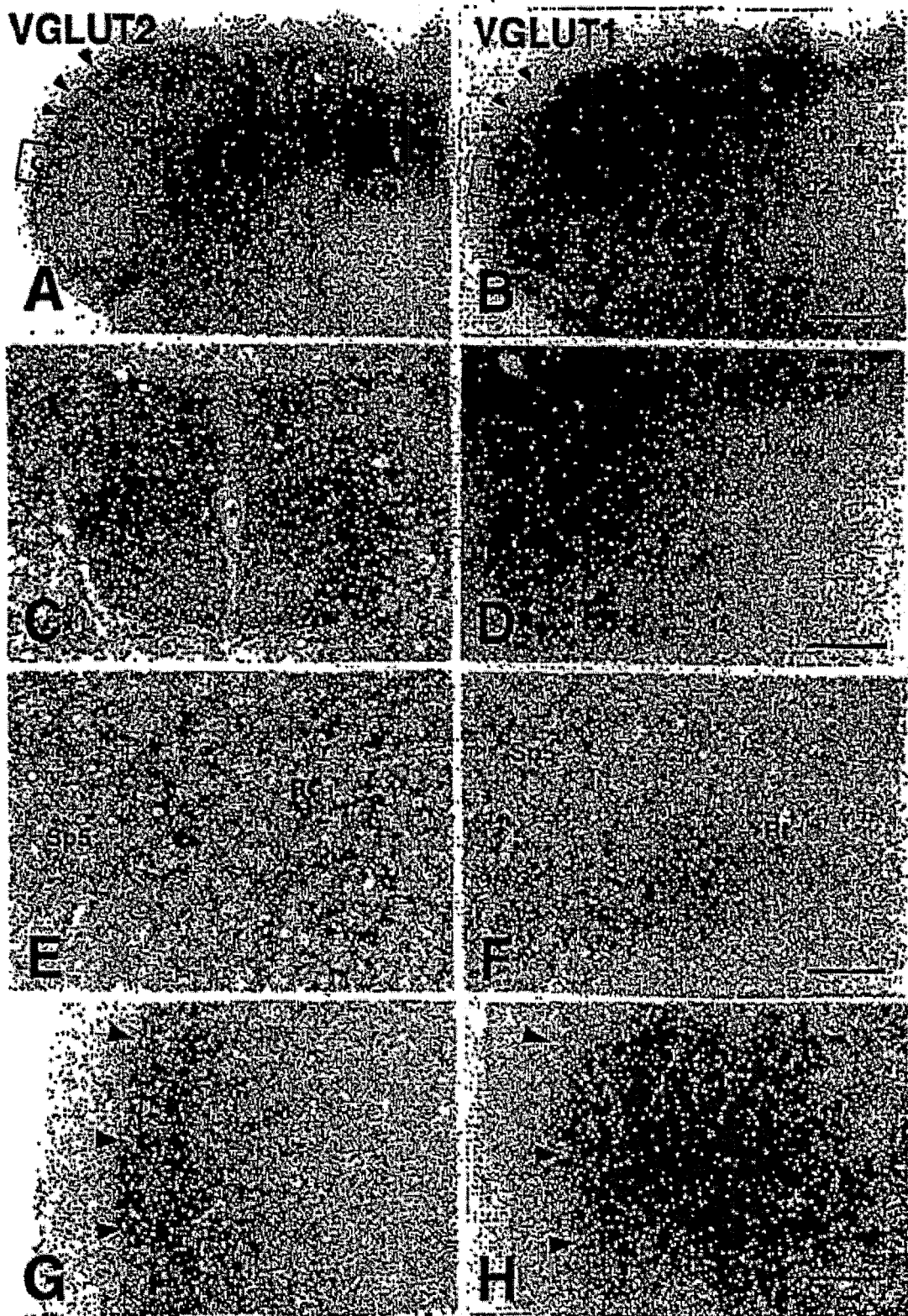


Fig. 19)

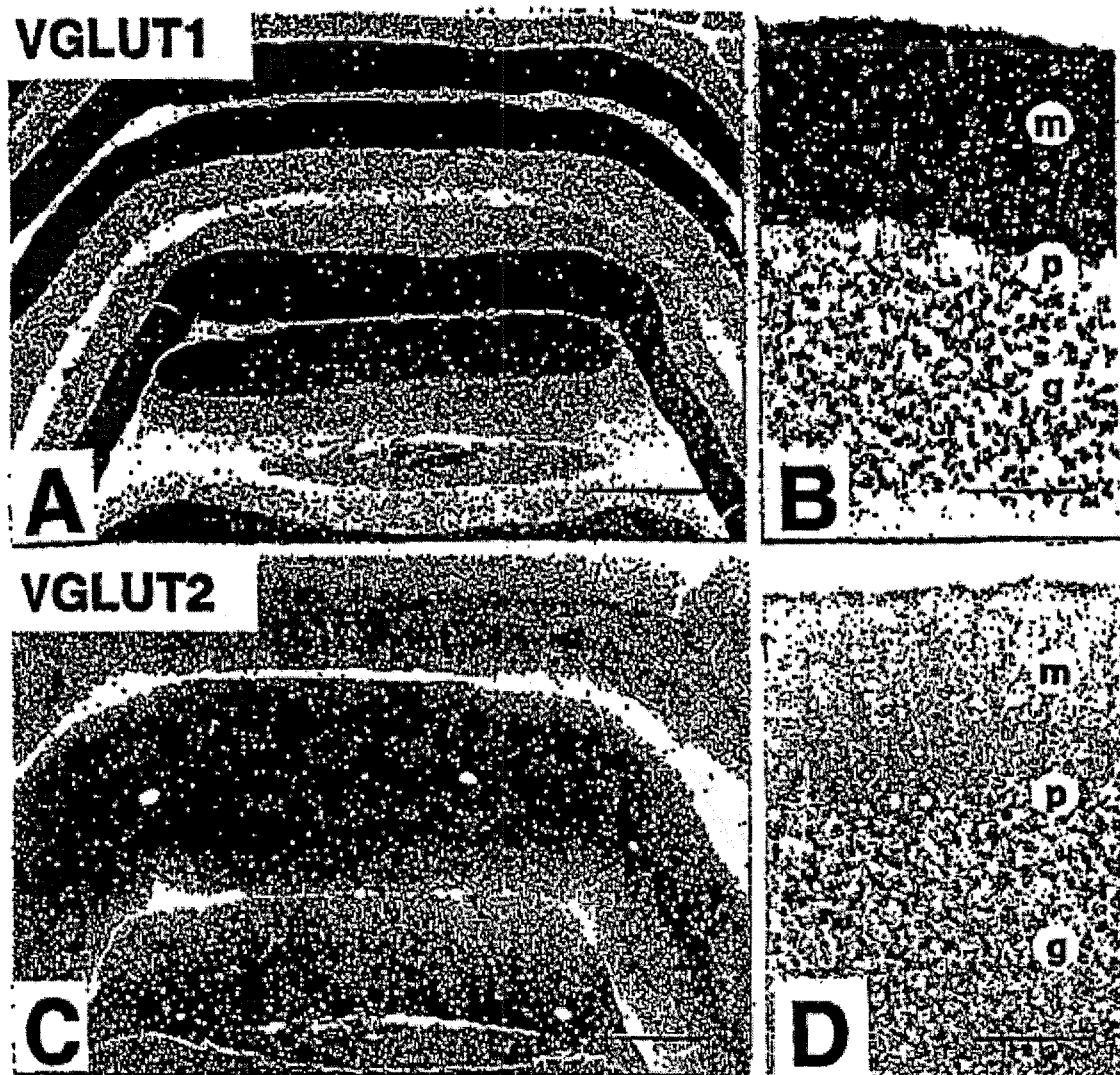


Fig. 20)

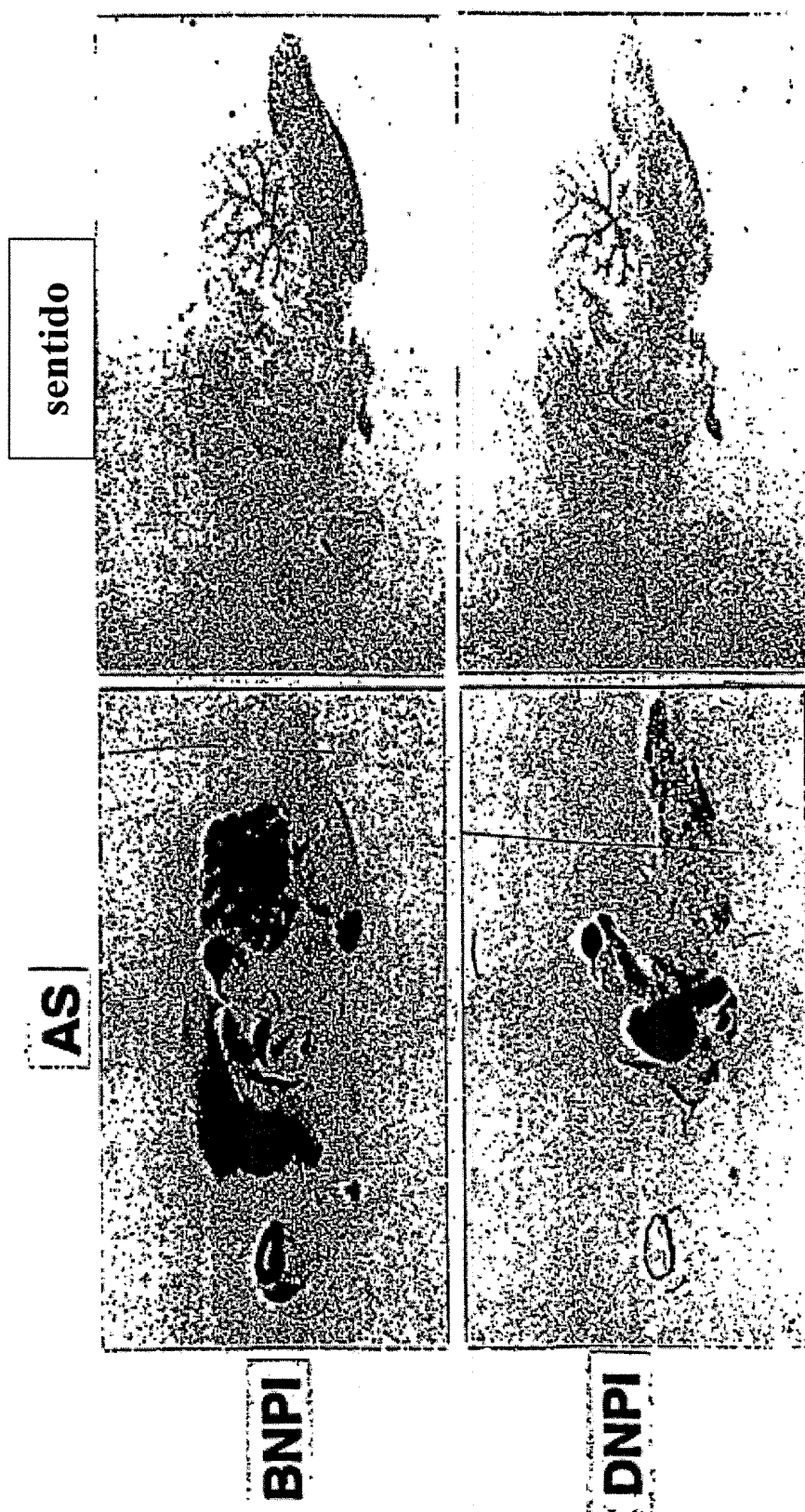
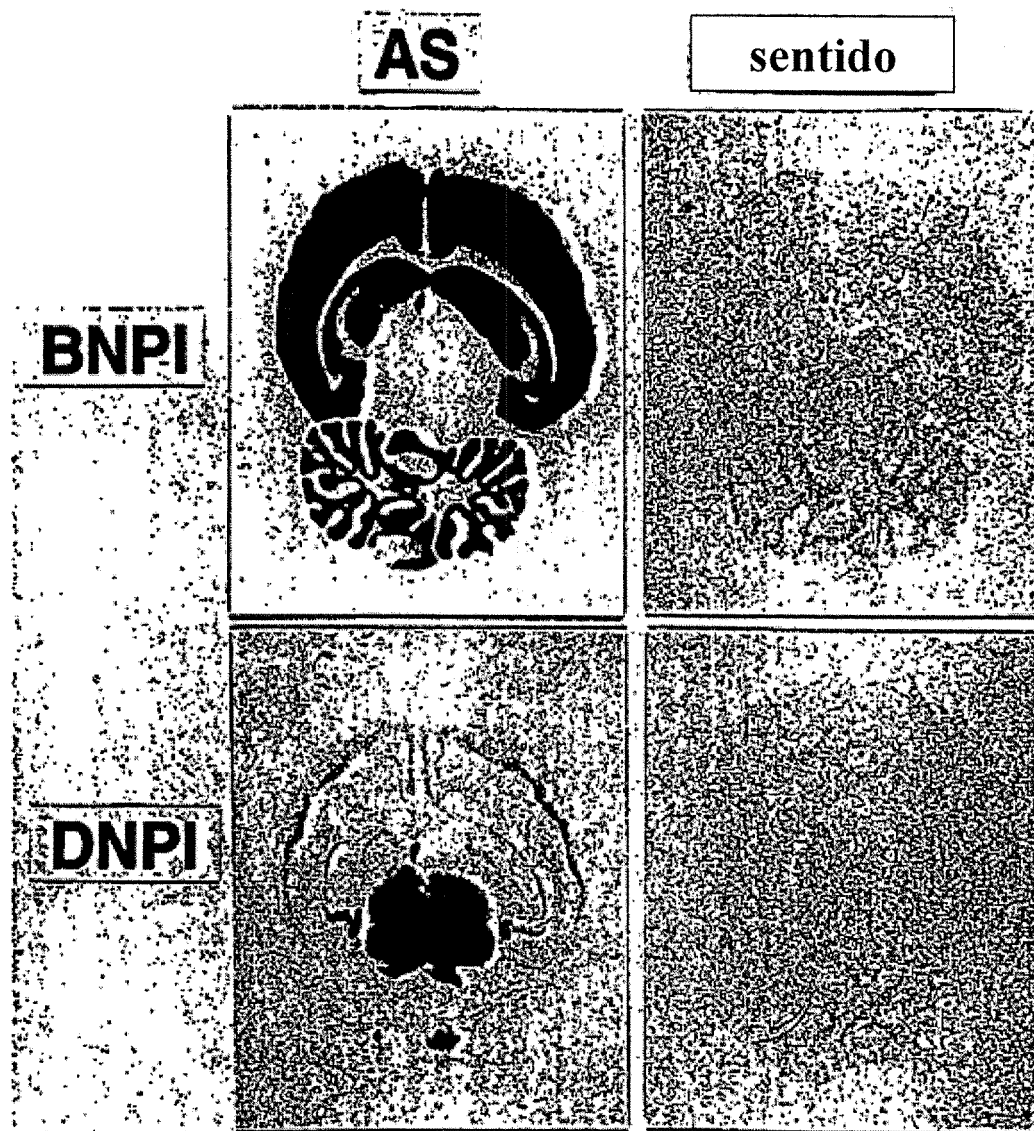


Fig. 21)



ES 2 276 964 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GRÜNENTHAL GmbR

5 <120> Procedimiento de screening (rastreo) para diferentes indicaciones con BNPI y/o DNPI

<130> GRA 3070-PCT

10 <140> PCT/EP 02/10707

<141> 2002-09-24

<150> DE10147006.1

15 <151> 2001-09-24

<160> 14

20 <170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 2366

25 <212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 1

30

```

cgggcggcag gagccgccac catggagttc cgccaggagg agtttcggaa gctagcgggt 60
cgtgctctcg ggaagctgca ccgccttctg gagaagcggc aggaaggcgc ggagacgctg 120
gagctgagtg cggatgggcg ccgggtgacc acgcagaccc gggaccgcgc ggtgggtggac 180
tgcacctgct tgggcctccc tcgcccgtac attatcgcca tcatgagtgg tctgggcttc 240
tgcattcagct ttggcatccg ctgcaacctg ggcgtggcca tcgtctccat ggtcaataac 300
agcacgaccc accgcggggg ccacgtggtg gtgcagaaag cccagttcag ctgggatcca 360
gagactgtcg gcctcataca cggctccttt ttctggggct acattgtcac tcagattcca 420
ggaggattta tctgtcaaaa atttgagcc aacagagttt tcggctttgc tattgtggca 480
acatccactc taaacatgct gatccctca gctgcccgcg tccactatgg ctgtgtcacc 540
ttcgtgagga tcctgcaggg gttggtagag ggggtcacat accccgcctg ccatgggacc 600
tggagcaaat gggccccacc cttagaacgg agtcgcctgg cgacgacagc cttttgtggg 660
tcctatgtcg gggcgggtgg cgcgatgcc ctcgccggg tccttgtgca gtactcagga 720
tggagctctg ttttctacgt ctacggcagc ttccggatct tctggtacct gttctggctg 780
ctcgtctcct acgagtcctc cgcgctgcac cccagcatct cggaggagga gcgcaagtac 840
atcgaggacg ccatcggaga gagcgcgaaa ctcattgaacc ccctcagaa gtttagcact 900
ccctggcggc gcttcttcac gtctatgcca gtctatgcca tcatcgtggc caacttctgc 960
cgcagctgga cgttctacct gctgctcatc tcccagccc cctacttcga agaagtgttc 1020
ggcttcgaga tcagcaaggg aggcctggtg tccgcgtgc cccacctggt catgaccatc 1080
atcgtgcca tcggcgcca gatcgcggac ttctgcgga gccgccgcat catgtccacc 1140
accaacgtgc gcaagttgat gaactgcgga ggcttcggca tggaaagccac gctgctgttg 1200
gtggtcggct actcgcactc caaggcggtg gccatctcct tcctggctct agcgtgggc 1260
ttcagcggct tcgccatctc tgggttcaac gtgaaccacc tggacatagc cccgcgctac 1320
gccagcatcc tcatgggcat ctccaacggc gtgggcacac tgcgggcat ggtgtgcccc 1380

```

65

ES 2 276 964 T3

```

atcatcgtgg gggccatgac taagcacaag actcgggagg agtggcagta cgtgttccta 1440
attgcctccc tgggtgacta tggagggtgc atcttctacg ggggtctttgc ttctggagag 1500
aagcagccgt gggcagagcc tgaggagatg agcgaggaga agtgtggcct cgttggccat 1560
gaccagctgg ctggcagtga cgacagcgaa atggaggatg aggctgagcc cccgggggca 1620
ccccctgcac ccccgccctc ctatggggcc acacacagca catttcagcc ccccaggccc 1680
ccacccccctg tccgggacta ctgacctgt gcctccact gaatggcagt ttccaggacc 1740
tccattccac tcatctctgg cctgagtgc agtgtaagg aacctgctc ctctctgtcc 1800
tgcctcaggc ctaagaagca ctctcccttg ttccagtg cgtcaaacc tctttccttc 1860
ccaattgcct ctcaggggta gtgaagctgc agactgacag tttcaaggat acccaaattc 1920
ccctaaaggt tccctctcca ccggttctgc ctcagtgggt tcaaactctc cctttcaggg 1980
ctttatttga atggacagtt cgacctctta ctctctcttg tggttttgag gacccacac 2040
ccccgcttt cctttatctc cagggactct caggctaacc ttgagatca ctcagctccc 2100
atctccttc agaaaaattc aaggctctcc tctagaagtt tcaantctc cccaactctg 2160
ttctgcatct tccagattgg ttttaaccaat tactcgctcc cgccattcca gggattgatt 2220
ctcaccagcg tttctgatgg aaaatggcgg tttcaagtcc cegattccgt gcccaattca 2280
catctccct accagcagat tctgcgaaag caccaaattt ctcaagaccc tcttctccct 2340
agcttagcat aatgtctggg gaaaca 2366

```

<210> 2

<211> 560

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 2

```

Met Glu Phe Arg Gln Glu Glu Phe Arg Lys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
  1              5              10              15

Gly Lys Leu His Arg Leu Leu Glu Lys Arg Gln Glu Gly Ala Glu Thr
      20              25              30

Leu Glu Leu Ser Ala Asp Gly Arg Pro Val Thr Thr Gln Thr Arg Asp
      35              40              45

Pro Pro Val Val Asp Cys Thr Cys Phe Gly Leu Pro Arg Arg Tyr Ile
      50              55              60

Ile Ala Ile Met Ser Gly Leu Gly Phe Cys Ile Ser Phe Gly Ile Arg
      65              70              75              80

Cys Asn Leu Gly Val Ala Ile Val Ser Met Val Asn Asn Ser Thr Thr
      85              90              95

His Arg Gly Gly His Val Val Val Gln Lys Ala Gln Phe Ser Trp Asp
      100             105             110

Pro Glu Thr Val Gly Leu Ile His Gly Ser Phe Phe Trp Gly Tyr Ile
      115             120             125

```

ES 2 276 964 T3

	Val Thr Gln Ile Pro Gly Gly Phe Ile Cys Gln Lys Phe Ala Ala Asn	
	130	135 140
5	Arg Val Phe Gly Phe Ala Ile Val Ala Thr Ser Thr Leu Asn Met Leu	
	145	150 155 160
10	Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg	
		165 170 175
15	Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly Val Thr Tyr Pro Ala Cys His Gly	
		180 185 190
20	Ile Trp Ser Lys Trp Ala Pro Pro Leu Glu Arg Ser Arg Leu Ala Thr	
		195 200 205
25	Thr Ala Phe Cys Gly Ser Tyr Ala Gly Ala Val Val Ala Met Pro Leu	
		210 215 220
30	Ala Gly Val Leu Val Gln Tyr Ser Gly Trp Ser Ser Val Phe Tyr Val	
		225 230 235 240
35	Tyr Gly Ser Phe Gly Ile Phe Trp Tyr Leu Phe Trp Leu Leu Val Ser	
		245 250 255
40	Tyr Glu Ser Pro Ala Leu His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Arg Lys	
		260 265 270
45	Tyr Ile Glu Asp Ala Ile Gly Glu Ser Ala Lys Leu Met Asn Pro Leu	
		275 280 285
50	Thr Lys Phe Ser Thr Pro Trp Arg Arg Phe Phe Thr Ser Met Pro Val	
		290 295 300
55	Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu	
		305 310 315 320
60	Leu Leu Ile Ser Gln Pro Ala Tyr Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu	
		325 330 335
65	Ile Ser Lys Val Gly Leu Val Ser Ala Leu Pro His Leu Val Met Thr	
		340 345 350
	Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Arg	
		355 360 365
	Arg Ile Met Ser Thr Thr Asn Val Arg Lys Leu Met Asn Cys Gly Gly	
		370 375 380

ES 2 276 964 T3

Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu Leu Val Val Gly Tyr Ser His Ser
385 390 395 400

Lys Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly
405 410 415

Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Arg
420 425 430

Tyr Ala Ser Ile Leu Met Gly Ile Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser
435 440 445

Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val Gly Ala Met Thr Lys His Lys Thr
450 455 460

Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe Leu Ile Ala Ser Leu Val His Tyr
465 470 475 480

Gly Gly Val Ile Phe Tyr Gly Val Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro
485 490 495

Trp Ala Glu Pro Glu Glu Met Ser Glu Glu Lys Cys Gly Phe Val Gly
500 505 510

His Asp Gln Leu Ala Gly Ser Asp Asp Ser Glu Met Glu Asp Glu Ala
515 520 525

Glu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Thr
530 535 540

His Ser Thr Phe Gln Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Val Arg Asp Tyr
545 550 555 560

<210> 3

<211> 2716

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

cgataagctt gatatcgaat tccggactct tgctcgggag ccttaaccgc gcgttcgggt 60
catccgcag cggcagttct gcttaccaaa agtggccac taggcactcg cattccacgc 120
ccggctccac gccagcgagc cgggcttctt acccatttaa agtttgagaa taggttgaga 180

ES 2 276 964 T3

5 tcgttttcggc cccaagacct ctaatcattc gcttttaccgg ataaaactgc gtggcggggg 240
 tgcgtcgggt ctgagagagc gccagctatc ctgagggaaa cttcggaggg aaccagctac 300
 tagatgggtc gattagtcct tcgcccctat acccagggtcg gacgaccgat ttgcacgtca 360
 ggaccgctac ggacctccac cagagtttcc tctggcttcg ccctgcccag gcgatcggcg 420
 ggggggaccc gcggggtgac cggcggcagg agccgccacc atggagttcc gccaggagga 480
 gtttcggaag ctacggggtc gtgctctcgg gaagctgcac cgccttcttg agaagcggca 540
 10 ggaaggcgcg gagacgctgg agctgagtcg ggatgggcgc ccggtgacca cgcagaccgc 600
 ggaccgcgcg gtggtggact gcacctgctt cggcctccct cgcgctaca ttatcgccat 660
 catgagtggc ctgggcttct gcacagctt tggcatccgc tgcaaccttg gcgtggccat 720
 cgtctccatg gtcaataaca gcacgacca ccgcgggggc cagtggtgg tgcaaaagc 780
 15 ccagtccagc tgggatccag agactgtcgg cctcatacac ggctcctttt tctggggcta 840
 cattgtcact cagattccag gaggatttat ctgtcaaaaa tttgcagcca acagagtctt 900
 cggcttttgc attgtggcaa catccactct aaacatgctg atccccctag ctgcccgcgt 960
 20 ccactatggc tgtgtcatct tcgtgaggat cctgcagggg ttggtagagg gggctacata 1020
 ccccgccctgc catgggatct ggagcaaatg gggccacccc ttagaacgga gtcgcctggc 1080
 gacgacagcc ttttgtggtt cctatgtctg ggcggtggtc gcgatgcccc tcgcccgggt 1140
 ccttgtgcag tactcaggat ggagctctgt tttctacgtc tacggcagct tcgggatctt 1200
 25 ctggtacctg ttctggctgc tcgtctccta cgagtccccc gcgctgcacc ccagcatctc 1260
 ggaggaggag cgcaagtaca tcgaggagcg catcgaggag agcgcgaaac tcatgaaccc 1320
 cctcacgaag tttagcactc cctggcgggc cttcttcacg tctatgccag tctatgccat 1380
 catcgtggcc aacttctgcc gcagctggac gttctacctg ctgctcatct cccagcccga 1440
 30 ctacttcgaa gaagtgttcg gottcgagat cagcaaggta ggctggtgt ccgcgctgcc 1500
 ccacctggtc atgaccatca tcgtgccoat cggcgggccag atcgcggaact tcctgcgagg 1560
 ccgcccgcac atgtccacca ccaacgtgcg caagttagtg aactgcggag gcttcggcat 1620
 35 ggaagccacg ctgctgttgg tggctgggcta ctcgcactcc aaggcggtgg ceatctcctt 1680
 cctggctcta gcggtgggtc tcagcggtct cgccatctct ggggtcaacg tgaaccacct 1740
 ggacatagcc ccgcgctacg ccagcatcct catgggcac tccaacggcg tgggcacact 1800
 gtcgggcatg gtgtgcccc tcatcgtggg ggccatgact aagcacaaga ctggggagga 1860
 40 gtggcagtac gtgttctcta ttgcctccct ggtgcactat ggaggtgtca tcttctacgg 1920
 ggtcttttgc tctggagaga agcagccgtg ggcagagcct gaggagatga gcgaggagaa 1980
 gtgtggcttc gttggccatg accagctggc tggcagtgac gacagcgaaa tggaggatga 2040
 ggctgagccc ccgggggcac cccctgcacc ccgcgccctc tatggggcca cacacagcac 2100
 45 atttcagccc cccaggcccc caccctctgt ccgggactac tgaccatgtg cctccactg 2160
 aatggcagtt tccaggacct ccattccact catctctggc ctgagtgaca gtgtcaagga 2220
 accctgctcc tctctgtcct gcctcaggcc taagaagcac tctcccttgt tccagtgct 2280
 50 gtcaaatcct ctttccctcc caattgcctc tcaggggtag tgaagctgca gactgacagt 2340
 ttcaaggata cccaaattcc cctaaagggt ccctctccac ccgttctgcc tcagtgggtt 2400
 caaatctctc ctttcagggc tttatttgaa tggacagttc gacctcttac tctctcttgt 2460
 ggttttgagg caccacaccc ccccgcttct ctttatctcc agggactctc aggctaacct 2520
 55 ttgagatcac tcagctccca tctccttcca gaaaaattca aggtcctcct ctagaagttt 2580
 caaatctctc ccaactctgt tctgcactct ccagattggt ttaaccaatt actcgteccc 2640
 gccattccag ggattgatcc tcaccagcgt ttctgatgga aaatggcggg aattcctgca 2700
 60 gcccggggga tccact 2716

<210> 4

<211> 560

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

ES 2 276 964 T3

<400> 4

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

ES 2 276 964 T3

	Tyr Gly Ser Phe Gly Ile Phe Trp Tyr Leu Phe Trp Leu Leu Val Ser	
	245	250 255
5	Tyr Glu Ser Pro Ala Leu His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Arg Lys	
	260	265 270
10	Tyr Ile Glu Asp Ala Ile Gly Glu Ser Ala Lys Leu Met Asn Pro Leu	
	275	280 285
15	Thr Lys Phe Ser Thr Pro Trp Arg Arg Phe Phe Thr Ser Met Pro Val	
	290	295 300
20	Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu	
	305	310 315 320
25	Leu Leu Ile Ser Gln Pro Asp Tyr Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu	
	325	330 335
30	Ile Ser Lys Val Gly Leu Val Ser Ala Leu Pro His Leu Val Met Thr	
	340	345 350
35	Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Arg	
	355	360 365
40	Arg Ile Met Ser Thr Thr Asn Val Arg Lys Leu Met Asn Cys Gly Gly	
	370	375 380
45	Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu Leu Val Val Gly Tyr Ser His Ser	
	385	390 395 400
50	Lys Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly	
	405	410 415
55	Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Arg	
	420	425 430
60	Tyr Ala Ser Ile Leu Met Gly Ile Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser	
	435	440 445
65	Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val Gly Ala Met Thr Lys His Lys Thr	
	450	455 460
70	Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe Leu Ile Ala Ser Leu Val His Tyr	
	465	470 475 480
75	Gly Gly Val Ile Phe Tyr Gly Val Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro	
	485	490 495

ES 2 276 964 T3

Trp Ala Glu Pro Glu Glu Met Ser Glu Glu Lys Cys Gly Phe Val Gly
500 505 510

His Asp Gln Leu Ala Gly Ser Asp Asp Ser Glu Met Glu Asp Glu Ala
515 520 525

Glu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Thr
530 535 540

His Ser Thr Phe Gln Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Val Arg Asp Tyr
545 550 555 560

<210> 5

<211> 2024

<212> DNA

<213> *Rattus Norvegicus*

<400> 5

```

gaattcggca cgagcggagc tgcggggccg ggccgggccc gggcgggacc cgggatcccg 60
gacgcggccg cccggggccc cgggcggggg gattggcagg ggaccgcggt gggcacagcc 120
accatggagt tccggcagga ggagtttcgg aagctggcgg ggcgcgccct ggggaggctg 180
caccggttac tggagaagcg gcaggaaggc gcggagacat tggagctgag cgccgaocgg 240
cgcccagtga ccacacacac gcgggacccg ccggtggtgg actgcacttg ctttggcctc 300
cctcgccgct acatcatcgc gatcatgagc ggtctgggtt tctgcacag ctttggcatc 360
cgctgcaacc tgggcgtggc catcgtatcc atggtcaaca acagtacaac ccaccgtggg 420
ggccacgtgg tgggtgcagaa agcccagttc aactgggatc cagagactgt cggcctcata 480
catggctcct ttttctgggg gtacattgtc actcagatcc ctggaggatt tatctgccaa 540
aaattcgtag ccaacagggt ctttggcttt gccattgtgg ctacctccac cctaaatatg 600
ttgatccctt cagcagcccg tgtcactat ggctgtgtca tottcgtgag gatccttcag 660
ggattggtgg aggggggtcac ataccctgct tgccatggca tctggagcaa atgggcccct 720
cccttagaac ggagtcggct ggcgacgaca gccttttgcg gtccctatgc cggggcagtg 780
gttgccatgc ctctggctgg ggtcctggta cagtattcag gatggagttc tgtcttctat 840
gtctatggca gcttcgggat cttttggtac ctggtctggt tgcctgtctc ctacgagtca 900
cctgcactac accccagcat ctccgaggag ggcgcgcaat acattgagga tgccatcggg 960
gaaagcgcca agctcatgaa ccctgttacg aagtttaaca caccctggag gcgcttcttt 1020
acctccatgc cggctctatgc catcattgtc gccaaacttt gccgcagctg gactttctac 1080
ctgctcctca tctcccagcc cgcctacttt gaagaagtgt tcggctttga gatcagcaag 1140
gtgggactgg tgtcggcact gcctcacctt gtcattgacta tcatcgtaac catcgagggc 1200
cagatogccg acttcctgcg cagtcgtcat ataattgtcc cgaccaatgt gcgaaagctg 1260
atgaactgcg ggggtttcgg gatggaagct acgctgctgc tgggtggtcgg atactcacac 1320
tccaaggggc tggccatctc cttcctggtc ctggctgtgg gcttcagtggt ctttgcctatc 1380
tctgggttta acgtgaacca cttggacatc gccctcgat atgccagcat cttgatgggc 1440
atttccaatg gcgtgggcac actgtctggg atggtgtgcc ccatcatcgt ggggtgcaatg 1500

```

ES 2 276 964 T3

accaagcaca agacgcggga ggagtggcag tacgtgttcc tcatagcctc cctgggtgcac 1560
 tatggaggtg tcatcttcta tggggtcttt gcttcgggag agaaacagcc gtgggcagag 1620
 ccggaggaga tgagcgagga gaagtgtggc tttgttggcc acgaccagct ggctggcagt 1680
 gacgaaagtg aaatggaaga cgaggttgag cccccggggg cccccccgc acctccgcct 1740
 tcctacgggg ccacacacag cacagttcag cctccaaggc cccaccccc tgtccgggac 1800
 tactgaccac gtgcctccca ctggtgggca gtttccagga cctccactcg atacacctct 1860
 agcctaaacg gcagtgtcga ggaacccccac tctctcctg cctcaggctt aagatgcaag 1920
 tcttcccttg tgcccagtgc tgtccgacca gccctctctc cttctcaact gcctcttgca 1980
 ggggtgaagc tgcacactag cagtttcaag ctctgtccga attc 2024

<210> 6

<211> 560

<212> PRT

<213> *Rattus Norvegicus*

<400> 6

Met Glu Phe Arg Gln Glu Glu Phe Arg Lys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
 1 5 10 15

Gly Arg Leu His Arg Leu Leu Glu Lys Arg Gln Glu Gly Ala Glu Thr
 20 25 30

Leu Glu Leu Ser Ala Asp Gly Arg Pro Val Thr Thr His Thr Arg Asp
 35 40 45

Pro Pro Val Val Asp Cys Thr Cys Phe Gly Leu Pro Arg Arg Tyr Ile
 50 55 60

Ile Ala Ile Met Ser Gly Leu Gly Phe Cys Ile Ser Phe Gly Ile Arg
 65 70 75 80

Cys Asn Leu Gly Val Ala Ile Val Ser Met Val Asn Asn Ser Thr Thr
 85 90 95

His Arg Gly Gly His Val Val Val Gln Lys Ala Gln Phe Asn Trp Asp
 100 105 110

Pro Glu Thr Val Gly Leu Ile His Gly Ser Phe Phe Trp Gly Tyr Ile
 115 120 125

Val Thr Gln Ile Pro Gly Gly Phe Ile Cys Gln Lys Phe Ala Ala Asn
 130 135 140

Arg Val Phe Gly Phe Ala Ile Val Ala Thr Ser Thr Leu Asn Met Leu
 145 150 155 160

Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg

ES 2 276 964 T3

	165	170	175
5	Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly Val Thr Tyr Pro Ala Cys His Gly 180 185 190		
10	Ile Trp Ser Lys Trp Ala Pro Pro Leu Glu Arg Ser Arg Leu Ala Thr 195 200 205		
15	Thr Ala Phe Cys Gly Ser Tyr Ala Gly Ala Val Val Ala Met Pro Leu 210 215 220		
20	Ala Gly Val Leu Val Gln Tyr Ser Gly Trp Ser Ser Val Phe Tyr Val 225 230 235 240		
25	Tyr Gly Ser Phe Gly Ile Phe Trp Tyr Leu Phe Trp Leu Leu Val Ser 245 250 255		
30	Tyr Glu Ser Pro Ala Leu His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Arg Lys 260 265 270		
35	Tyr Ile Glu Asp Ala Ile Gly Glu Ser Ala Lys Leu Met Asn Pro Val 275 280 285		
40	Thr Lys Phe Asn Thr Pro Trp Arg Arg Phe Phe Thr Ser Met Pro Val 290 295 300		
45	Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu 305 310 315 320		
50	Leu Leu Ile Ser Gln Pro Ala Tyr Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu 325 330 335		
55	Ile Ser Lys Val Gly Leu Val Ser Ala Leu Pro His Leu Val Met Thr 340 345 350		
60	Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Arg 355 360 365		
65	His Ile Met Ser Thr Thr Asn Val Arg Lys Leu Met Asn Cys Gly Gly 370 375 380		
	Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu Leu Val Val Gly Tyr Ser His Ser 385 390 395 400		
	Lys Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly 405 410 415		
	Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Arg		

ES 2 276 964 T3

	420	425	430
5	Tyr Ala Ser Ile Leu Met Gly Ile Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser 435	440	445
10	Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val Gly Ala Met Thr Lys His Lys Thr 450	455	460
15	Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe Leu Ile Ala Ser Leu Val His Tyr 465	470	475 480
20	Gly Gly Val Ile Phe Tyr Gly Val Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro 485	490	495
25	Trp Ala Glu Pro Glu Glu Met Ser Glu Glu Lys Cys Gly Phe Val Gly 500	505	510
30	His Asp Gln Leu Ala Gly Ser Asp Glu Ser Glu Met Glu Asp Glu Val 515	520	525
35	Glu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Thr 530	535	540
40	His Ser Thr Val Gln Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Val Arg Asp Tyr 545	550	555 560

<210> 7

<211> 3946

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 7

```

cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgcgct ctttgcacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct ccttctctct actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgcaac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tcctcgccct 360
tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaattggaat 420
ccgtaaaaca aaggattttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatttt gctggaaaat 480
cactcggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc 540
tgacggagga tgggaagccc ctagaggtgc ccgagaggaa ggcgccgctg tgcgactgca 600
cgtgcttcgg cctgccccgc cgctacatta tcgcatcat gagcggcctg ggcttctgca 660

```

ES 2 276 964 T3

5 tctccttcgg tatccgctgc aacctgggcy tggccattgt ggacatggtc aacaacagca 720
 ccatccaccg cgggggcaag gtcacaaag agaaagccaa attcaactgg gacccggaaa 780
 ccgtggggat gatccacggg tcccttctttt ggggctacat catcactcag attccgggag 840
 gctacatcgc gtctcggtcg gcagccaaca ggggttttcgg agctgccata cttcttacct 900
 ctaccctaaa tatgctaatt ccatcagcag ccagagtgc tttatggatgt gtcattctttg 960
 10 tcagaatact gcaggggactt gttgaggggtg tgacctaccc agcatgtcat gggatatgga 1020
 gcaaatgggc cccacotcta gagaggagta gactggcaac caccctcttt tgtggttcct 1080
 atgccggagc tgtgattgca atgccttttag ctggcattct tgtgcagtac actggctggg 1140
 cttcagtggt ttatgtctac ggaagctttg gaatggctct gtacatgttt tggcttttgg 1200
 15 tgtcttatga aagtcctgca aagcatccta ctattacaga tgaagaacgt aggtacatag 1260
 aagaaagcat tggagagagt gcaaatcttt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat 1320
 ggaggaagtt ttttacatcc atgccagct atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa 1380
 gctggacttt ttatttattg cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat 1440
 20 ttgaaattag caagggttgg atgctatctg ctgtgccaca cttagttaat acaattattg 1500
 tgctatttgg gggacaaatt gcagattttc taagaagcaa gcagattctt tcaactacga 1560
 cagtgcagaa gatcatgaat tgtgggtggt ttggcatgga agccacactg ctctgggtcg 1620
 ttggctattc tctactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1680
 25 gtggatttgc tatatctggg ttcaatgta accacttga tatcgctcca agatatgcca 1740
 gtatcttaat gggcatttcg aatgggtgtg gcacattgtc aggaatggtt tgtcttatca 1800
 ttgttgggtc aatgacaaag aataagtcac gtgaagagt gcagtatgtc ttctgatcg 1860
 30 ctgccctagt ccactatggg ggagttatat tttatgcaat atttgctca ggagagaaac 1920
 aacctgggc agaccggag gaaacaagt aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg 1980
 aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatggt accaccaagt 2040
 cttatgggtc cacaacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaaagagg 2100
 35 aatttgtaca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat 2160
 aacaaaacta attactggat ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac 2220
 aaaaatttta aaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgctg 2280
 40 taaaaatgaa aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taaaatttgt 2340
 aagttccatc atttccattc aagtcattca ttcttgcat tgtgacttaa aggttgactg 2400
 gtcaaaattg tagaaacaag tagttacca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
 atttactaaa gcacaacatc tcatcctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
 45 gcaaaatgca cttatatatt tgttacctg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
 cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
 aagaaataca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
 aatgtgagat attttgttag tctcaaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
 50 ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcatt 2820
 ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa atcaaacctt 2880
 tcatgtagcg tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaantgt 2940
 55 attttttatt acaactttgt actggttgta acttgcatat gaaaaaaaaa agagatatat 3000
 aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
 taagaacaaa gaaatagaaa atgggtttaga tatctttctt ctttcataat taaatactat 3120
 atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaga ttaacttcat agagatattg 3180
 60 taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaaat atttgtctta aatatatagg 3240
 acaatacatt atattaaaaat ggtctctctc tatatatatc tgtatatctt atacatgtcc 3300
 atacacagaa acataataaa caatcttcac acgaaaccaa aaatagcata cacctaattgt 3360
 65 tgggttaggg aattgcaatt tctactttca tagagtcata gaattttagg tggggaagag 3420
 gcattttgct tgtcattttc taatataact caacaagaat tgcaacattt gtgtaccaag 3480
 caataagtgc aatgcataaa atttctgtc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag 3540

ES 2 276 964 T3

```

ctgtttgggt gggttgaata attttatttt tcttttaaaa aagctaacat cagacccctt 3600
tataatgtcc taaaattatg ataatacatt tcccaattca actcaaaata ttattgggtgt 3660
5 attttgtcta ttctggatat ttgatctgtt taatgtactg tgctagtgcac tggaggccct 3720
gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt ttaaaaaaat gcaaatcatt ctttacctta 3780
agaaaaaaaa aatacccttt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt 3840
gttgtgttga atgaaaatat gtggactgtc attttgttgc agcaaaaaag tgttaataaa 3900
10 atgctctatt tctccttttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3946

```

<210> 8

<211> 582

15 <212> PRT

<211> *Homo Sapiens*

<400> 8

```

20 Met Glu Ser Val Lys Gln Arg Ile Leu Ala Pro Gly Lys Glu Gly Leu
    1             5             10             15

25 Lys Asn Phe Ala Gly Lys Ser Leu Gly Gln Ile Tyr Arg Val Leu Glu
    20             25             30

30 Lys Lys Gln Asp Thr Gly Glu Thr Ile Glu Leu Thr Glu Asp Gly Lys
    35             40             45

35 Pro Leu Glu Val Pro Glu Arg Lys Ala Pro Leu Cys Asp Cys Thr Cys
    50             55             60

40 Phe Gly Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ile Met Ser Gly Leu Gly
    65             70             75             80

45 Phe Cys Ile Ser Phe Gly Ile Arg Cys Asn Leu Gly Val Ala Ile Val
    85             90             95

50 Asp Met Val Asn Asn Ser Thr Ile His Arg Gly Gly Lys Val Ile Lys
    100            105            110

55 Glu Lys Ala Lys Phe Asn Trp Asp Pro Glu Thr Val Gly Met Ile His
    115            120            125

60 Gly Ser Phe Phe Trp Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Ile Pro Gly Gly Tyr
    130            135            140

65 Ile Ala Ser Arg Leu Ala Ala Asn Arg Val Phe Gly Ala Ala Ile Leu
    145            150            155            160

    Leu Thr Ser Thr Leu Asn Met Leu Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His
    165            170            175

```

ES 2 276 964 T3

Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly
 180 185 190
 5
 Val Thr Tyr Pro Ala Cys His Gly Ile Trp Ser Lys Trp Ala Pro Pro
 195 200 205
 10
 Leu Glu Arg Ser Arg Leu Ala Thr Thr Ser Phe Cys Gly Ser Tyr Ala
 210 215 220
 15
 Gly Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Ala Gly Ile Leu Val Gln Tyr Thr
 225 230 235 240
 20
 Gly Trp Ser Ser Val Phe Tyr Val Tyr Gly Ser Phe Gly Met Val Trp
 245 250 255
 25
 Tyr Met Phe Trp Leu Leu Val Ser Tyr Glu Ser Pro Ala Lys His Pro
 260 265 270
 30
 Thr Ile Thr Asp Glu Glu Arg Arg Tyr Ile Glu Glu Ser Ile Gly Glu
 275 280 285
 35
 Ser Ala Asn Leu Leu Gly Ala Met Glu Lys Phe Lys Thr Pro Trp Arg
 290 295 300
 40
 Lys Phe Phe Thr Ser Met Pro Val Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe
 305 310 315 320
 45
 Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu Leu Leu Ile Ser Gln Pro Ala Tyr
 325 330 335
 50
 Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu Ile Ser Lys Val Gly Met Leu Ser
 340 345 350
 55
 Ala Val Pro His Leu Val Met Thr Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln
 355 360 365
 60
 Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Lys Gln Ile Leu Ser Thr Thr Thr Val
 370 375 380
 65
 Arg Lys Ile Met Asn Cys Gly Gly Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 70
 Leu Val Val Gly Tyr Ser His Thr Arg Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu
 405 410 415
 75
 Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val
 420 425 430

ES 2 276 964 T3

Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Ser Ile Leu Met Gly Ile
435 440 445

Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val
450 455 460

Gly Ala Met Thr Lys Asn Lys Ser Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe
465 470 475 480

Leu Ile Ala Ala Leu Val His Tyr Gly Gly Val Ile Phe Tyr Ala Ile
485 490 495

Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro Trp Ala Asp Pro Glu Glu Thr Ser
500 505 510

Glu Glu Lys Cys Gly Phe Ile His Glu Asp Glu Leu Asp Glu Glu Thr
515 520 525

Gly Asp Ile Thr Gln Asn Tyr Ile Asn Tyr Gly Thr Thr Lys Ser Tyr
530 535 540

Gly Ala Thr Thr Gln Ala Asn Gly Gly Trp Pro Ser Gly Trp Glu Lys
545 550 555 560

Lys Glu Glu Phe Val Gln Gly Glu Val Gln Asp Ser His Ser Tyr Lys
565 570 575

Asp Arg Val Asp Tyr Ser
580

<210> 9

<211> 3982

<212> DNA

<213> *Rattus Norvegicus*

<400> 9

```
agacagtaag gttcttttgc ttttttcctt tacacaagga ttcatgacg tttttggcca 60
atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gtttaagactt caaaaccggg aatttacgtt 120
gtttttcggg gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgccc aataccacgg 180
cactgcgcgc gccctcggcc accggatcct cccttccaa tgagactttg tgactgtgtg 240
taccaattct cctattagga aaccctgagg ctgaatgcag ctattccgtt gtactctctt 300
tctcgtcttc cctccctctt ccaactcaca gccttgcga aaagctcatc tctgctgaga 360
agaaaacgtt ctaccttaac ctattaagac tatgcgcaga actcgccttt catagccatc 420
acaattttaa tctggttaagg ctggacacga gtctttacaa gaatggagtc ggtaaaacaa 480
aggatttttg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc cctcggacag 540
atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccacgagct gacagaggac 600
```

ES 2 276 964 T3

ggcaagcccc tggagggtgcc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtgcttcggc 660
 ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcat ctcccttggc 720
 atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatggtea acaacagcac catccaccgg 780
 ggtggcaaaag ttatcaagga gaaagccaag ttttaactggg accccgagac tgtgggggatg 840
 attcacgggt cgttcttctg gggctatata atcacgcaga ttccgggcgg atacatcgca 900
 tcgcgactgg ctgctaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttacctc taccctcaat 960
 atgctgatec catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcatctttgt tagaatattg 1020
 caaggacttg tggaggggcgt cacctacca gcctgtcagc gcatatggag caagtgggccc 1080
 cctccttttg agaggagtag gttggctacc acctccttct gtgggttcta tgctggagca 1140
 gtcattgcaa tgccoctagc tgggtatctg gtgcagtaca ctggatggte ttcagtattt 1200
 tacgtatatg gaagcttttg tatggctctg tatatgttct ggcttctggg gtcttacgag 1260
 agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc 1320
 ggggagagcg caaatctgtt agggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagtgt 1380
 ttcacatcca tgcccgctcta tgcgataatt gttgcaaaact tctgcaggag ttggactttt 1440
 tatttactgc tcatcagtea accagcttat ttcgaggagg tttttggatt tgaaatcagc 1500
 aagggttgga tgttgtctgc ggtcccacac ctggtcatga caatcattgt gcctatcggg 1560
 gggcaaatg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaag 1620
 atcatgaact gcggggggtt tggcatggaa gccacactgc ttctgggtgt tggctactct 1680
 catactagag ggggtggccat ctcttctctg gtgcttgagc tgggattcag tggatttgct 1740
 atctctgggt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatatgccag tatcttaatg 1800
 ggcatttcaa atggtgttg gacgctgtcg ggaatggctt gcccgatcat tgttgggtgca 1860
 atgacgaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggct 1920
 cactatgggt gagtcatatt ttatgacta ttgctcag gagagaagca accttgggca 1980
 gacctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa 2040
 gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccaccaaatc ctacggcgcc 2100
 acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga atttgtgcaa 2160
 gaaagtgcgc aagacgcgta ctctataag gaccgagatg attattcata acgaagctag 2220
 ttgctggatt cctttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgattgcaca aaatcatttt 2280
 aagaaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttgctg ttcaaaaaat 2340
 aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtcctcat caagtgcaat ctgtggcgcc 2400
 agtcacgtga cgccatttcc attcaggcca ttctccttt tcttttgtga tttaaagggt 2460
 tctgtagaa ataagtaggt attcgttggg tccatcacca cgttagagag tacaactaca 2520
 acagttggca catgtcatcc tacggaagtt aggaagccaa agctactgga ttatgtgaac 2580
 tgcatttatt tatttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga 2640
 catagtagaa ctggaaagat ggctagattg ggtactgacg ataatcattg tgtgtatata 2700
 atggagtggc tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg 2760
 aattattact aggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat ctccaaaag cttatcttgc 2820
 agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg 2880
 gaggagtatg ctccatgctc tcccattcac tacctgacag tatcaaacct tcacatttca 2940
 atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaataaaga 3000
 agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg 3060
 aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat 3120
 agcccttaaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttctctg 3180
 ataactagag actatatgga actcacacca caaagctata tataatatga aaagataaac 3240
 aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaatgt cccatttaag aggtatttgt 3300
 cttgagtata tagtacaag tatattaaaa ttatatctac atccctgtat atcttataca 3360
 tatccactca cacaacata acaaatactt ttcacacaga accaaaaaca agcatacacc 3420
 taatgttggg tttggggatt gcaatttcta ctttcataga gtcatagaat tttagatggg 3480

ES 2 276 964 T3

```

aaaaaaaaag gcattttgct cgtcatttct taatataatt aattcaacag gaactgcaac 3540
at ttgtgttac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gtgtgtaaac tatccccata 3600
ctgcttgtgg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcggag ctctttacaa 3660
5  tgttttgcgc tgataagaat gcacatccca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgttt 3720
acctgtctgt tttgggtatt tggctctgtt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggccctg 3780
ctactgogaa tataaaacgt gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga 3840
10 aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgaccat aacccttgct 3900
gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttgctgc gaagcaagtg ttaataaaaat 3960
gttctattta aaaaaaaaaa aa 3982

```

<210> 10

<211> 582

<212> PRT

<213> *Rattus Norvegicus*

<400> 10

```

Met Glu Ser Val Lys Gln Arg Ile Leu Ala Pro Gly Lys Glu Gly Ile
1 5 10 15

```

```

Lys Asn Phe Ala Gly Lys Ser Leu Gly Gln Ile Tyr Arg Val Leu Glu
20 25 30

```

```

Lys Lys Gln Asp Asn Arg Glu Thr Ile Glu Leu Thr Glu Asp Gly Lys
35 40 45

```

```

Pro Leu Glu Val Pro Glu Lys Lys Ala Pro Leu Cys Asp Cys Thr Cys
50 55 60

```

```

Phe Gly Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ile Met Ser Gly Leu Gly
65 70 75 80

```

```

Phe Cys Ile Ser Phe Gly Ile Arg Cys Asn Leu Gly Val Ala Ile Val
85 90 95

```

```

Asp Met Val Asn Asn Ser Thr Ile His Arg Gly Gly Lys Val Ile Lys
100 105 110

```

```

Glu Lys Ala Lys Phe Asn Trp Asp Pro Glu Thr Val Gly Met Ile His
115 120 125

```

```

Gly Ser Phe Phe Trp Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Ile Pro Gly Gly Tyr
130 135 140

```

```

Ile Ala Ser Arg Leu Ala Ala Asn Arg Val Phe Gly Ala Ala Ile Leu
145 150 155 160

```

```

Leu Thr Ser Thr Leu Asn Met Leu Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His

```

ES 2 276 964 T3

	165	170	175
5	Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly 180 185 190		
10	Val Thr Tyr Pro Ala Cys His Gly Ile Trp Ser Lys Trp Ala Pro Pro 195 200 205		
15	Leu Glu Arg Ser Arg Leu Ala Thr Thr Ser Phe Cys Gly Ser Tyr Ala 210 215 220		
20	Gly Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Ala Gly Ile Leu Val Gln Tyr Thr 225 230 235 240		
25	Gly Trp Ser Ser Val Phe Tyr Val Tyr Gly Ser Phe Gly Met Val Trp 245 250 255		
30	Tyr Met Phe Trp Leu Leu Val Ser Tyr Glu Ser Pro Ala Lys His Pro 260 265 270		
35	Thr Ile Thr Asp Glu Glu Arg Arg Tyr Ile Glu Glu Ser Ile Gly Glu 275 280 285		
40	Ser Ala Asn Leu Leu Gly Ala Met Glu Lys Phe Lys Thr Pro Trp Arg 290 295 300		
45	Lys Phe Phe Thr Ser Met Pro Val Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe 305 310 315 320		
50	Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu Leu Leu Ile Ser Gln Pro Ala Tyr 325 330 335		
55	Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu Ile Ser Lys Val Gly Met Leu Ser 340 345 350		
60	Ala Val Pro His Leu Val Met Thr Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln 355 360 365		
65	Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Lys Gln Ile Leu Ser Thr Thr Thr Val 370 375 380		
	Arg Lys Ile Met Asn Cys Gly Gly Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu 385 390 395 400		
	Leu Val Val Gly Tyr Ser His Thr Arg Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu 405 410 415		
	Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val		

ES 2 276 964 T3

	420	425	430
5	Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Ser Ile Leu Met Gly Ile 435	440	445
10	Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val 450	455	460
15	Gly Ala Met Thr Lys Asn Lys Ser Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe 465	470	475 480
20	Leu Ile Ala Ala Leu Val His Tyr Gly Gly Val Ile Phe Tyr Ala Leu 485	490	495
25	Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro Trp Ala Asp Pro Glu Glu Thr Ser 500	505	510
30	Glu Glu Lys Cys Gly Phe Ile His Glu Asp Glu Leu Asp Glu Glu Thr 515	520	525
35	Gly Asp Ile Thr Gln Asn Tyr Ile Asn Tyr Gly Thr Thr Lys Ser Tyr 530	535	540
40	Gly Ala Thr Ser Gln Glu Asn Gly Gly Trp Pro Asn Gly Trp Glu Lys 545	550	555 560
45	Lys Glu Glu Phe Val Gln Glu Ser Ala Gln Asp Ala Tyr Ser Tyr Lys 565	570	575
50	Asp Arg Asp Asp Tyr Ser 580		
55	<210> 11 <211> 2836 <212> DNA <213> <i>Mus musculus</i> <400> 11		
60	cggcgcgccg ggcgcgcggg cgggggggatt ggcagggggac ccgcgtgggc acagccacca 60 tggagttccg gcaggaggag tttcggaagc tggcggggcg cgccctgggg aggctgcacc 120 gggttactgga gaagcggcag gaaggcgcgg agacactgga gctgagtgcc gacgggcccgc 180 cagtgaccac gcacactcgg gaccgcgctg tgggtggactg cacctgcttt ggcctccctc 240 gtcgctacat catcgccatc atgagcgggc tgggtttctg tatcagcttt ggcacccgct 300 gcaacctggg cgtggccatc gtgtccatgg tcaacaacag cacaacccac cgtggggggc 360 acgtggtggg gcagaaagcc cagttcaact gggatccaga gactgtcggc ctcatatg 420 gctccttttt ctggggctac attgtcactc agattcctgg aggattttatc tgccaaaaat 480		

ES 2 276 964 T3

5 **tgcgagccaa caggggtcttt ggctttgcc a ttgtggctac ctccacccta aacatgttga 540**
 tcccttcagc agcccgcggt cactatggct gtgtcatctt cgtgaggatc cttcagggat 600
 tggtggaggg ggtcacatac cctgcttgcc atggcatctg gagcaaatgg gccctccct 660
 tagaacggag tcggctggca acgacagcct tttgcgggtc ctatgctggg gcggtgggtg 720
 ccatgccctt ggctggggtc cttgtgcagt attcaggatg gagttctgtc ttctatgtct 780
 atggcagctt cgggatcttt tggtagctgt tctgggtgct tgtctcctat gagtcaccgg 840
 10 **cactgcaccc cagcatctct gaggaggagc gcaaatacat tgaggatgcc atcggggaga 900**
 gcgccaaagct catgaacctt gttacgaagt ttaacacacc ctggaggcgc ttctttacgt 960
 ccatgcccgt ctatgccatc atcgttgcga acttttgccg cagctggacc ttctacctgc 1020
 15 **tcctcatctc tcagcccgcc tactttgaag aagtgttcgg ctttgagatc agcaagggtg 1080**
 ggctgggtgc ggcgtgcct cacctgttca tgaccatcat cgtaccatt ggaggccaga 1140
 togctgactt tttgcgcagt cgtcacataa tgtccactac caacgtgcga aagctcatga 1200
 actgcggggg tttcgggatg gaagccacgc tgetgctggg ggtcggatac tcgcactcca 1260
 20 **agggcggtggc catctccttc ctggtcctgg ctgtgggctt cagtggcttt gccatctctg 1320**
 ggtttaacgt gaaccacttg gacatcgccc ctgctatgc cagcatcttg atgggcatct 1380
 ccaatggcgt gggcacactg tctgggatgg tgtgccccat catcgtgggt gcaatgacca 1440
 agcacaagac gcgggaggag tggcagtagc tgttctcat agcctccctg gtgcactacg 1500
 25 **gcggtgtcat cttctatggg gtctttgctt cgggagagaa gcagccgtgg gcagagccgg 1560**
 aggagatgag cgaggagaag tgtggctttg ttggccaoga ccagctggct ggcagtgaag 1620
 aaagtgaat ggaggacag gctgagcccc caggggcgc ccccgcgcc cctccgtcct 1680
 30 **acggggccac acacagcaca gtgcagctc cgaggccccc gcccctgtc cgggactact 1740**
 gaccacgggc ctcccactgt ggggcagttt ccaggacttc cactccatac acctctagcc 1800
 tgagcggcag tgtcgaggaa cccactcct cccctgcctc aggccttaaga tgcaagtcc 1860
 cccttgcttc cagtgtgtc cgaccagccc tctttccctc tcaactgct cctgcggggg 1920
 35 **gtgaagctgc aactagcag tttcaaggat acccagactc cctgaaagt cgttctccgc 1980**
 ttgtttctgc ctgtgtgggc tcaaatctcc cctttgaggg ctttatttgg agggacagtt 2040
 caacctcttc ctctottgtg gttttgaggt ttcacccctt cccccaagac ccagggatt 2100
 40 **ctcaggctac ccgagatta ttcagggtgg cccctactca gaagacttca tggctgtcct 2160**
 ctattagttt caaggctcgc ctaaccaatt ctacattttt ccaagctgg ttaacctaac 2220
 caccaatgcc gccgttccca ggactgatc tcaccagcgt ttctgaggga aaatggcgg 2280
 ttcaagtccc cccacccccc ttttcttccc tegtccctc accagcacac tttgccgggc 2340
 45 **cttgacctta gcttagtaca atcattgtcc agggaaatgg ccaaatggc tctgtcacc 2400**
 ccgtgtctt tttctgactc agttttcagg tctcagtagt ggctgccc aaatggtggt 2460
 tcagcggctc gaggccact cttcctcccc gtggtgggtt caggatcccc ctgcgtcccc 2520
 ccccccaaa tccttgcact ttattctcct ggggtgggtt aggcgcgcct cggtttctca 2580
 50 **gtggccattt gttgtgtgtc cctcaggggc taaatgattc caaatctggg gtgcttcccc 2640**
 tcatagacac cctctctca acgtagaaat ctgggtgggg gtgaggtgtg tgagagaagt 2700
 tacagaatcc caggaaaggg agcggggctg ggaggagagg gttgttctg gggcagggct 2760
 55 **gtgtcttggg gtctgtctct gtgacgtaaa tctgcctc cccacccca ctcccaataa 2820**
 acgctctggg gtacgg 2836

60 <210> 12
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

65

ES 2 276 964 T3

<400> 12

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

ES 2 276 964 T3

	Tyr	Glu	Ser	Pro	Ala	Leu	His	Pro	Ser	Ile	Ser	Glu	Glu	Glu	Arg	Lys	
				260					265						270		
5	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ala	Ile	Gly	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Val	
			275				280						285				
10	Thr	Lys	Phe	Asn	Thr	Pro	Trp	Arg	Arg	Phe	Phe	Thr	Ser	Met	Pro	Val	
			290				295						300				
15	Tyr	Ala	Ile	Ile	Val	Ala	Asn	Phe	Cys	Arg	Ser	Trp	Thr	Phe	Tyr	Leu	
	305					310					315					320	
20	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Pro	Ala	Tyr	Phe	Glu	Glu	Val	Phe	Gly	Phe	Glu	
					325					330					335		
25	Ile	Ser	Lys	Val	Gly	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Leu	Val	Met	Thr	
				340					345						350		
30	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gln	Ile	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Ser	Arg	
			355				360							365			
35	His	Ile	Met	Ser	Thr	Thr	Asn	Val	Arg	Lys	Leu	Met	Asn	Cys	Gly	Gly	
		370					375						380				
40	Phe	Gly	Met	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	
	385				390						395					400	
45	Lys	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Phe	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	
				405						410					415		
50	Phe	Ala	Ile	Ser	Gly	Phe	Asn	Val	Asn	His	Leu	Asp	Ile	Ala	Pro	Arg	
				420					425						430		
55	Tyr	Ala	Ser	Ile	Leu	Met	Gly	Ile	Ser	Asn	Gly	Val	Gly	Thr	Leu	Ser	
			435					440						445			
60	Gly	Met	Val	Cys	Pro	Ile	Ile	Val	Gly	Ala	Met	Thr	Lys	His	Lys	Thr	
		450					455						460				
65	Arg	Glu	Glu	Trp	Gln	Tyr	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Val	His	Tyr	
	465				470						475					480	
70	Gly	Gly	Val	Ile	Phe	Tyr	Gly	Val	Phe	Ala	Ser	Gly	Glu	Lys	Gln	Pro	
				485						490					495		
75	Trp	Ala	Glu	Pro	Glu	Glu	Met	Ser	Glu	Glu	Lys	Cys	Gly	Phe	Val	Gly	
				500					505						510		

ES 2 276 964 T3

His Asp Gln Leu Ala Gly Ser Asp Glu Ser Glu Met Glu Asp Glu Ala
515 520 525

Glu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Thr
530 535 540

His Ser Thr Val Gln Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Val Arg Asp Tyr
545 550 555 560

<210> 13

<211> 2528

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 13

```

ggcacgagggc tcagtottaa ttccactctg ccactctgcc gcagagcaca attacgccgg 60
cgcgatggga ggagaccatg ttaaggcagg aagctaacag cagccgctca cctgaggcct 120
aggaagctcc caagggttct gagagctatg agctctgac agcnaagtea ccatttttaga 180
cagtagggtt cttttgcttt ttctcttaca caagggttcg atgacgtttc tgggtcaatct 240
gattaaaaga cagcggattt gattgcgata agacttcaaa accgggaatt tacgttggtt 300
ttcgggtgag tgacttccag aacagggact catcagcacc cgcccaaata ccacggcact 360
gcgcgcgccc tgggccaccg gatcctcccc ttccaatgag actttgtgac tgtgtgtacc 420
aattctccta ttaggaaacc cgtgggctgc atgcagctat tctgtgttac tctctttctc 480
gccctocctc ccctctccaa ctcacagcct tgctggaaag ctacactctg ctgagaagaa 540
aaagctctac cttaaccaac taagactatg cgcagaatcc gtctttcata gccacaacaa 600
tttaaatctg gtaaggctgg acaccagtct ttacaagaat ggagtcggta aaacaaagga 660
ttttggcccc ggggaaagag gggataaaga attttgctgg aaaatccctc ggacagatct 720
acagggtgct ggagaagaag caggacaacc gagagaccat cgagctgaca gaggacggta 780
agccctgga ggtgcctgag aagaaggctc cgctatgcga ctgcacgtgc ttcggcctgc 840
cgcgccgcta catcatagcc atcatgagcg gcctcggtt ctgcatatcc ttcggcatcc 900
gctgtaacct gggcggtggc atcgtggaca tggteaacaa cagcactatc caccgcgag 960
gcaaagtatt caaggagaaa gccaaattta actgggacce cgagaccgtg gggatgatcc 1020
acggatcgtt cttctggggc tatatcatca cccagattcc aggaggatat atcgcatcgc 1080
ggctggctgc taacggggtc tttggggctg cgatactgct cacctctacc ctcaatatgc 1140
tgatcccatc tgcagccaga gtgcattatg gatgtgtcat ctttgttagg atattgcaag 1200
gacttgaggga ggggtgtacc taccagcct gtcattggat atggagcaag tgggccccctc 1260
ccttgagag gagtaggtt gctacaacct ccttttggtg ttctatgct ggagcagtca 1320
ttgcaatgcc cttagctggt atccttgctc agtacactgg atggtcgtca gtattttatg 1380
tgtatggaag ctttggtcat gtcgtgtaca tgttctggct tctggtgtct tatgagagcc 1440
ctgcaaagca tcctaccatt acagatgaag aacgtaggta catagaggag agcattggag 1500
agagcgcaa tctgctaggt gcaatggaaa aatttaagac cccatggagg aagtttttca 1560
catccatgcc cgtctacgcg ataattgttg ccaacttctg caggagctgg actttttatt 1620
tactgctcat cagtcagcca gcttattttg aggaggtttt tggatttgaa atcagcaagg 1680

```

ES 2 276 964 T3

ttggcatgtt gtctgcagtc cctcaccttg tcatgacaat cattgtgcct atcgggggggc 1740
 aaattgcaga ttctctaagg agcaagcaaa ttctctcaac aactacagtg agaaagatca 1800
 5 tgaattgttg ggggttttggc atggaagcca cgotgcttct ggttgttggc tactctcata 1860
 ctagaggggt ggccatctcc ttcttgggtgc ttgcagtagg attcagtga tttgctatct 1920
 ctgggttcaa tgttaatcac ttggatattg ctccaagata tgccagtatc ttaatgggca 1980
 ttccaaatgg cggttggcacg ctgtcgggga tgggtttgcc tatcattgtt ggtgcaatga 2040
 10 caaagaataa gtcccgtaga gaatggcagt atgtcttctt cattgctgca ctgctccact 2100
 atggtggagt catattttat gcactatttg cctcaggaga gaaacaacct tgggcagacc 2160
 ctgaggaaac aagcgaagaa aaatgtggct tcatcacga agatgaactg gatgaagaaa 2220
 cgggggacat cactcagaat tacataaatt acgggtaccac caaatcttac ggtgctacct 2280
 15 cacaggagaa tggaggctgg cctaacggct gggagaaaaa ggaagaattt gtgcaagaag 2340
 gtgcgcaaga cgcgtacacc tataaggacc gagatgatta ttcataacga tgctagtgtc 2400
 tggattcatt tgtagtgtt gtgaatcaat taattgtgat tgcacaaaaa taattttaaa 2460
 20 aatgtggtgt gaacatgtaa acatatcaac caagcaagtc ttgctgttca aaaaaaaaaa 2520
 aaaaaaaaaa 2528

<210> 14
 25 <211> 582
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 14

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

ES 2 276 964 T3

	130	135	140
5	Ile Ala Ser Arg Leu Ala Ala Asn Arg Val Phe Gly Ala Ala Ile Leu 145	150	155 160
10	Leu Thr Ser Thr Leu Asn Met Leu Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His 165	170	175
15	Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly 180	185	190
20	Val Thr Tyr Pro Ala Cys His Gly Ile Trp Ser Lys Trp Ala Pro Pro 195	200	205
25	Leu Glu Arg Ser Arg Leu Ala Thr Thr Ser Phe Cys Gly Ser Tyr Ala 210	215	220
30	Gly Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Ala Gly Ile Leu Val Gln Tyr Thr 225	230	235 240
35	Gly Trp Ser Ser Val Phe Tyr Val Tyr Gly Ser Phe Gly Met Val Trp 245	250	255
40	Tyr Met Phe Trp Leu Leu Val Ser Tyr Glu Ser Pro Ala Lys His Pro 260	265	270
45	Thr Ile Thr Asp Glu Glu Arg Arg Tyr Ile Glu Glu Ser Ile Gly Glu 275	280	285
50	Ser Ala Asn Leu Leu Gly Ala Met Glu Lys Phe Lys Thr Pro Trp Arg 290	295	300
55	Lys Phe Phe Thr Ser Met Pro Val Tyr Ala Ile Ile Val Ala Asn Phe 305	310	315 320
60	Cys Arg Ser Trp Thr Phe Tyr Leu Leu Leu Ile Ser Gln Pro Ala Tyr 325	330	335
65	Phe Glu Glu Val Phe Gly Phe Glu Ile Ser Lys Val Gly Met Leu Ser 340	345	350
	Ala Val Pro His Leu Val Met Thr Ile Ile Val Pro Ile Gly Gly Gln 355	360	365
	Ile Ala Asp Phe Leu Arg Ser Lys Gln Ile Leu Ser Thr Thr Thr Val 370	375	380
	Arg Lys Ile Met Asn Cys Gly Gly Phe Gly Met Glu Ala Thr Leu Leu		

ES 2 276 964 T3

	385		390		395		400									
5	Leu	Val	Val	Gly	Tyr	Ser	His	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Phe	Leu
				405					410					415		
10	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Phe	Ala	Ile	Ser	Gly	Phe	Asn	Val
				420					425					430		
15	Asn	His	Leu	Asp	Ile	Ala	Pro	Arg	Tyr	Ala	Ser	Ile	Leu	Met	Gly	Ile
			435					440					445			
20	Ser	Asn	Gly	Val	Gly	Thr	Leu	Ser	Gly	Met	Val	Cys	Pro	Ile	Ile	Val
	450						455					460				
25	Gly	Ala	Met	Thr	Lys	Asn	Lys	Ser	Arg	Glu	Glu	Trp	Gln	Tyr	Val	Phe
	465					470					475				480	
30	Leu	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	His	Tyr	Gly	Gly	Val	Ile	Phe	Tyr	Ala	Leu
				485						490					495	
35	Phe	Ala	Ser	Gly	Glu	Lys	Gln	Pro	Trp	Ala	Asp	Pro	Glu	Glu	Thr	Ser
				500					505					510		
40	Glu	Glu	Lys	Cys	Gly	Phe	Ile	His	Glu	Asp	Glu	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr
			515					520					525			
45	Gly	Asp	Ile	Thr	Gln	Asn	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Gly	Thr	Thr	Lys	Ser	Tyr
	530						535					540				
50	Gly	Ala	Thr	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Gly	Trp	Pro	Asn	Gly	Trp	Glu	Lys
	545					550					555				560	
55	Lys	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Glu	Gly	Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Lys
				565					570					575		
60	Asp	Arg	Asp	Asp	Tyr	Ser										
65				580												