



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 454**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06011535 .9**

96 Fecha de presentación : **24.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1721979**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

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

30 Prioridad: **27.11.1998 US 110283 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.01.2011**

73 Titular/es: **UCB PHARMA S.A.**  
**allée de la Recherche 60**  
**1070 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es: **Brunkow, Mary E;**  
**Kovacevich, Brian;**  
**Van Ness, Jeffrey;**  
**Mulligan, John T;**  
**Winkler, David G;**  
**Galas, David J y**  
**Paeper, Bryan, W.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 350 454 T3

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

## DESCRIPCION

## CAMPO TECNICO

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

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

La pérdida de contenido mineral del hueso puede

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

La frecuencia de osteoporosis en la población humana aumenta con la edad, y entre los Caucásicos es predominante en las mujeres (que comprenden el 80% de la reserva de pacientes con osteoporosis en los Estados Unidos). El aumento de fragilidad y susceptibilidad a la fractura del hueso esquelético en las personas de edad se agrava por el mayor riesgo de caídas accidentales en esta población. Se ha informado sobre más de 1,5 millones de

fracturas óseas relacionadas con la osteoporosis en los Estados Unidos cada año. Las caderas, muñecas, y vértebras fracturadas están entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de cadera en particular son extremadamente incómodas y costosas para el paciente, y para las mujeres se correlacionan con elevadas tasas de mortalidad y morbilidad.

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

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

Por ejemplo, ahora se están prescribiendo estrógenos para retardar la pérdida de hueso. No obstante, hay

cierta controversia sobre si existe un beneficio a largo plazo para los pacientes y si existe algún efecto en todos los pacientes de más de 75 años de edad. Por otra parte, se cree que el uso de estrógenos aumenta el riesgo de cáncer de mama o endometrio.

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

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

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

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una proteína codificada

por SEQ ID NO. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 con una  $K_a$  superior a o igual a  $10^7\text{-M}^{-1}$ .

La presente invención también proporciona:

5 una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de la invención;

un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención;

una célula que produce un anticuerpo o fragmento de la invención;

10 un anticuerpo o fragmento de la invención para uso en un método de aumentar la mineralización ósea en animales de sangre caliente;

una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y un  
15 vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;

Un estuche para la detección de una proteína de SEQ ID NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo o fragmento de la invención; y

20 uso de un anticuerpo o fragmento de la invención para la fabricación de un medicamento para aumentar la mineralización ósea en un mamífero de sangre caliente.

La presente invención adicionalmente proporciona un método de producir un hibridoma que produce un anticuerpo  
25 monoclonal o fragmento de la invención, comprendiendo el método:

- (i) inmunizar un roedor con una proteína de la secuencia SEQ ID No. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o una porción de la misma;
- 30 (ii) sacrificar el roedor y extraer el bazo y/o nódulos linfáticos del animal; y
- (iii) fusionar suspensiones celulares del bazo y/o nódulos linfáticos con células de mieloma para generar hibridomas

35 La presente invención proporciona adicionalmente un

método para producir un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de la invención que comprende aislar y purificar el anticuerpo o fragmento de un hibidroma de la invención o manipular y re-expresar las regiones variables codificantes de ADN.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para detectar una proteína de la secuencia de SEQ ID NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 que comprende incubar un anticuerpo o fragmento de la invención bajo condiciones y durante suficiente tiempo para permitir que dicho anticuerpo se una a dicha proteína y detectar dicha unión.

También se refiere a una clase o familia novedosa de proteínas de unión al TGF-beta, así como análisis para seleccionar compuestos que incrementan el contenido mineral del hueso y la densidad mineral del hueso, compuestos que incrementan el contenido mineral del hueso y la densidad mineral del hueso y métodos para utilizar de tales compuestos en la fabricación de medicamentos para el tratamiento o la prevención de una amplia variedad de condiciones.

También se refieren a moléculas de ácido nucleico aisladas donde se seleccionan dichas moléculas de ácidos nucleicos del grupo que comprende

- (a) una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la SEQ ID NO. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, o una secuencia complementaria de la misma;
- (b) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida específicamente con la molécula de ácido nucleico de (a) en condiciones altamente restrictivas y
- (c) un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión al TGF-beta según (a) y (b).

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

Se refieren también a moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen homología con los SEC de ID Núms. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15, a un nivel de homología del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o 98% utilizando un algoritmo de Wibur-Lipman. Entre los ejemplos representativos de tales moléculas de ácido nucleico aisladas se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína que comprende las Secuencias de ID Núms. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, o tienen homología con estas secuencias a un nivel del 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, o 98% de nivel de homología utilizando un algoritmo de Lipman-Pearson.



Las moléculas de ácido nucleico aisladas tienen típicamente un tamaño de menos de 100 kb, y en ciertas realizaciones, menos de 50 kb, 25 kb, 10 kb, o incluso 5 kb de tamaño. Adicionalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas, en otras realizaciones, no existen en una "genoteca" de otras moléculas de ácido nucleico no relacionado (v.g., un subclon BAC tal como se describe en el Núm. de Acceso de GenBank AC003098 y el Núm. EMB AQ171546). No obstante, las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser encontradas en genotecas de moléculas relacionadas (v.g., para transposición genética, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.837.458, 5.830.721; y 5.811.238). Finalmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas como se describen aquí no incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.780.263).

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

indicados antes (incluyendo por ejemplo, células huésped de origen humano, de mono, de perro, de rata, o de ratón).

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

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

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a la clase descrita antes de las proteínas de unión al TGF-beta (v.g., BEER humana). En varias realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, o un anticuerpo monoclonal (v.g., humano o de origen de ratón). En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo que conserva las características de unión de un anticuerpo completo (v.g., un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, o Fv, o incluso una CDR). Asimismo se proporcionan hibridomas y otras células que son capaces de producir o expresar los anticuerpos anteriormente mencionados.

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

También se refieren a oligonucleótidos aislados que hibridan con una molécula de ácido nucleico según los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, o 18 o su complemento, en condiciones muy restrictivas. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido puede ser encontrado en la secuencia que codifica los SEC ID Núms. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, o 16. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud de al menos 15, 20, 30, 50, o 100 nucleótidos. En realizaciones adicionales, el oligonucleótido está marcado con otra molécula (v.g.,

una enzima, molécula fluorescente, o radioisótopo). También se refiere a cebadores que son capaces de amplificar específicamente toda o una porción de las moléculas de ácido nucleico mencionadas antes que codifican proteínas de unión de TGF-beta. Según se utiliza aquí, se debe entender que el término "amplificar específicamente" hace referencia a cebadores que amplifican las proteínas de unión al TGF-betas mencionadas antes, y no otras proteínas de unión al TGF-beta tales como Dan, Cerberus, Gremlin, o SCGF (patente de los Estados Unidos Núm. 5.780.263).

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

También se refieren a ribozimas que son capaces de escindir ARN que codifica una de las proteínas de unión al TGF-beta (v.g. SEC ID Núms. 2, 6, 8, 10, 12, 14, o 16). Tales ribozimas pueden estar compuestas por ADN, ARN (incluyendo ácidos 2'-O-metilrribonucleicos), análogos de ácido nucleico (v.g., ácidos nucleicos que tienen enlaces fosforotioato) o mezclas de los mismos. Asimismo se proporcionan moléculas de ácido nucleico (v.g., ADN o ADNc) que codifican estas ribozimas, y vectores que son capaces de expresar o producir las ribozimas. Entre los ejemplos representativos de los vectores se incluyen plásmidos, retrotransposones, cósmidos, y vectores basados en virus (v.g., vectores virales generados al menos en parte a partir de un retrovirus, adenovirus, o virus adeno-asociado). También se refieren a células huésped (v.g., células humanas, de perro, de rata o de

ratón) que contienen estos vectores. En ciertas realizaciones, la célula huésped puede ser transformada establemente con el vector.

5 También se refieren a métodos para producir ribozimas o bien sintéticamente, o bien mediante transcripción *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones adicionales, las ribozimas así producidas pueden ser purificadas adicionalmente y/o formuladas en composiciones farmacéuticas (v.g., la ribozima o la  
10 molécula de ácido nucleico que codifica la ribozima junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable). De un modo similar, los oligonucleótidos antisentido y los anticuerpos u otras moléculas seleccionadas descritas aquí pueden ser formuladas en composiciones  
15 farmacéuticas.

También se refieren a oligonucleótidos antisentido que comprenden una molécula de ácido nucleico que hibrida con una molécula de ácido nucleico según los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o 15, o el complemento de esta, y  
20 donde dicho oligonucleótido inhibe la expresión de la proteína de unión al TGF-beta como se describe aquí (v.g., BEER humana). En diversas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50 nucleótidos. Preferiblemente, el oligonucleótido  
25 tiene menos de 100, 75 o 60 nucleótidos de longitud. Como debe resultar fácilmente evidente, el oligonucleótido puede constar de uno o más análogos de ácido nucleico, ácidos ribonucleicos, o ácidos desoxirribonucleicos. Adicionalmente, el oligonucleótido puede ser modificado  
30 por uno o más enlaces, incluyendo por ejemplo, enlaces covalentes tales como un enlace fosforotioato, un enlace fosfotriéster, un enlace metilfosfonato, un enlace metilen(imino), un enlace morfolino, un enlace amido, un enlace poliamido, un enlace interazúcar alquílico de  
35 cadena corta, un enlace interazúcar cicloalquílico, un

enlace interazúcar heteroatómico de cadena corta y un enlace interazúcar heterocíclico. Un ejemplo representativo de un oligonucleótido quimérico es proporcionado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.912.

Se refieren también a métodos para incrementar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente que comprende introducir una cantidad efectiva de ribozima anteriormente descrito en el animal. En aspectos relacionados, tales métodos comprenden la etapa de introducir en un paciente una cantidad efectiva de la molécula de ácido nucleico o vector descritos aquí que es capaz de producir la ribozima deseada, en condiciones que favorecen la transcripción de la molécula de ácido nucleico para producir la ribozima.

Se refieren también a animales no humanos, transgénicos. En una realización se proporciona un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al TGF-beta como se ha descrito antes que está conectada operablemente a un promotor efectivo para la expresión del gen, siendo introducido el gen en el animal, o ancestro del animal, en una fase embrionaria, con la condición de que dicho animal no sea humano. En otras realizaciones, se refieren a animales modificados genéticamente transgénicos, que comprenden un animal cuyas células germinales y células somáticas comprenden una desorganización de al menos un alelo de una molécula de ácido nucleico endógena que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al TGF-beta como se ha descrito aquí, donde la desorganización evita la transcripción del ARN mensajero a partir de dicho alelo en comparación con un animal sin la desorganización, con la condición de que el animal no sea un humano. En varias realizaciones, la

desorganización es una delección, sustitución o inserción en el ácido nucleico. En otras realizaciones el animal transgénico es un ratón, rata, oveja, cerdo o perro.

5 También se refieren a estuches proporcionados para la detección de la expresión de la proteína de unión al TGF-beta, que comprenden un recipiente que comprende una molécula de ácido nucleico, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo formado por (a) una  
10 molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de los SEC ID Núms. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; (b) una molécula de ácido nucleico que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a); (c) una molécula de ácido nucleico que es un fragmento de (a) o (b) de al menos 15, 20, 30, 50, 75, o 100 nucleótidos  
15 de longitud. Asimismo se proporcionan estuches para la detección de una proteína de unión al TGF-beta que comprenden un recipiente que comprende uno de los anticuerpos para la proteína de unión al TGF-beta descritos aquí.

20 Se refieren también a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una o más moléculas candidato con la proteína de unión al TGF-beta codificada por la molécula de ácido  
25 nucleico referido aquí y un miembro seleccionado de la familia de proteínas del TGF-beta (v.g., BMP 5 o 6), (b) determinar si la molécula candidato altera la señalización del miembro de la familia del TGF-beta, altera o unión de la proteína de unión al TGF-beta al  
30 miembro de la familia del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula altera la capacidad de TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima. En este aspecto de la presente invención, la molécula o las  
35 moléculas candidato pueden alterar la señalización o la

unión, por ejemplo, disminuyendo (v.g., inhibiendo), o incrementando (v.g., intensificando) la señalización o la unión.

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

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

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

En otros aspectos relacionados la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso en metodos para incrementar el contenido mineral del hueso en un animal de sangre caliente, comprendiendo los métodos la etapa de administrar a un animal de sangre



caliente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de identificada a partir de los análisis citados aquí. En otro aspecto, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención proporciona el uso de un método para aumentar el contenido de mineral ósea en un animal de sangre caliente que comprende la etapa de administrar a un animal de sangre caliente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento que inhibe la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la súper-familia de proteínas del TGF-beta, incluyendo las proteínas morfogénicas del hueso (BMP).

Los ejemplos representativos de anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos humanizados que reconocen específicamente y alteran la actividad de la proteína de unión al TGF-beta.

También se refieren a métodos para aumentar el contenido de mineral óseo en un animal de sangre caliente que comprende las etapas de (a) introducir en células que buscan un hueso un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta y proteínas morfogénicas del hueso (BMP) y (b) administrar las células que contienen vectores a animales de sangre caliente. Según se utiliza aquí, se debe entender que las "células buscan el hueso" si se localizan dentro de la matriz del hueso después de la administración periférica. En una realización, tales métodos comprenden adicionalmente, antes de la etapa de introducción, el aislamiento de células de la médula del hueso que buscan el hueso. En una realización adicional, las células que buscan el hueso se seleccionan del grupo formado por las células CD34+ y los osteoblastos.

En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan (preferiblemente aisladas) anticuerpos

humanizados que inhiben la unión de la proteína de unión al TGF-beta a la súper-familia de proteínas del TGF-beta.

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

Tales anticuerpos (v.g., anticuerpos humanizados) pueden ser utilizadas, dependiendo de su selección, para alterar, ejercer un efecto antagónico o ejercer un efecto agonístico de la señalización o la unión de un miembro de la familia de proteínas de unión al TGF-beta como se ha descrito aquí.

Con varias realizaciones de la invención, las moléculas y métodos descritos antes para el tratamiento o la prevención pueden ser utilizados en condiciones tales como osteoporosis, osteomalasia, enfermedad periodontal, escorbuto, Enfermedad de Cushing, fractura de huesos y condiciones debidas a la inmovilización de miembros y uso de esteroides.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Además, se muestran aquí diversas referencias que describen con más detalle ciertos procedimientos o composiciones (v.g., plásmidos, etc.)

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

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

La Figura 2 resume los resultados obtenidos partir de la inspección de una variedad de tejidos humanos para

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

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

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

La Figura 5 ilustra, mediante análisis de transferencia western, la selectividad de la proteína de unión al TGF-beta, Beer, para BMP-5 y BMP-6, pero no BMP-  
30 4 (descrito con más detalle en el EJEMPLO 5).

La Figura 6 demuestra que la interacción iónica entre la proteína de unión al TGF-beta, Beer, y BMP-5 tiene una constante de disociación en el intervalo de 15-  
35 30 nM.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

## DEFINICIONES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARN, o constar de al menos una parte de análogos de ácido nucleico.

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

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

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

Según se utiliza aquí, un "fragmento de anticuerpo" es una porción de un anticuerpo tal como  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $Fab'$ , y similar. Sin tener en cuenta la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un

fragmento de un anticuerpo monoclonal para la proteína de unión al TGF-beta se une con un epítipo de la proteína de unión al TGF-beta.

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

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

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

Abreviaturas: TGF-beta - "Factor de Crecimiento Transformante-beta"; TGF-bBP - "Proteína de unión al Factor de Crecimiento Transformante-beta" (una TGF-bBP representativa se denomina "H. Beer"); BMP - "proteína morfogénica del hueso"; PCR - "reacción en cadena de la

polimerasa"; RT-PCR - procedimiento de PCR en el cual el ARN es transcrito primero a ADN en la primera etapa utilizando la transcriptasa inversa (RT); ADNc - cualquier ADN elaborado copiando una secuencia de ARN en forma de ADN.

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

#### ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD CONOCIDA COMO ESCLEROSTEOSIS

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



sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos.

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

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

En la actualidad parece que no hay anomalía del eje  
de la pituitaria-hipotálamo en la Esclerosteosis. En  
particular, no parece haber sobre-producción de la  
hormona del crecimiento ni de la cortisona. Además, los  
30 niveles de hormonas sexuales son normales en los  
individuos afectados. No obstante, los marcadores de  
recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de  
osteoblastos, osteocalcina, péptido C' de procolágeno  
de tipo I (PICP), y fosfatasa alcalina total, (ver  
35 Comier, C., *Curr. Opin. In Rheu.* 7:243, 1995) indican que

existe actividad hiperosteoblástica asociada con la enfermedad pero que hay una actividad osteoclástica normal a débilmente disminuida medida mediante marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinaria, fosfatasa ácida resistente al ácido en plasma y galactosilhidroxilisina (ver Coomier, *supra*)).

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

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

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

#### SUPER-FAMILIA DEL TGF-BETA

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

ilustre los elementos bioquímicos clave del sub-grupo que la separa de los otros miembros de la familia más grande.

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

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

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

#### LAS PROTEINAS MORFOGENICAS DEL HUESO (BMP) SON PROTEINAS REGULADORAS CLAVES EN LA DETERMINACION DE LA DENSIDAD MINERAL DEL HUESO EN HUMANOS

Un avance principal en la comprensión de la formación de hueso fue la identificación de las proteínas

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

#### ANTAGONISMO DE BMP

Las sub-familias de las BMP y la Activina están sujetas a una regulación post-traducciona1 significativa. Existe un sistema de control extracelular intrincado, por

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

#### PROTEINAS DE UNION A TGF-BETA NOVEDOSAS

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

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

Un ejemplo representativo de la clase novedosa de proteínas de unión al TGF-beta se describe en las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 9, 11, 13, y 15. Se debe entender que los miembros representativos de esta clase de proteínas de unión incluyen variantes de la proteína

de unión al TGF-beta (v.g., las Secuencias de ID Núms. 5 y 7). Según se utiliza aquí, un "gen variante de la proteína de unión al TGF-beta" hace referencia a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de las Secuencias de ID Núms. 2, 10, 12, 14 o 16. Entre tales variantes se incluyen los polimorfismos de origen natural o las variantes alélicas de los genes de la proteína de unión al TGF-beta, así como genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de estas secuencias de aminoácidos. Las formas variantes adicionales de un gen de la proteína de unión al TGF-beta son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o deleciones de las secuencias de nucleótidos descritas aquí. Los genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta pueden ser identificados determinando si los genes hibridan con una molécula de ácido nucleico que tenga la secuencia de nucleótidos de las Secuencias de ID Núms. 1, 5, 7, 9, 11, 13, o 15 en condiciones restrictivas. Además, los genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta deben codificar una proteína que tenga un esqueleto de cisteína.

Como alternativa, se pueden identificar genes variantes de la proteína de unión al TGF-beta mediante comparación de la secuencia. Según se utiliza aquí, dos secuencias de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos aminoácido de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. De un modo similar, dos secuencias de nucleótidos tienen una "identidad de secuencia del 100%" si los restos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. Las comparaciones de la secuencia se pueden realizar utilizando programas de soporte lógico normalizados tales

como los incluidos en la Suite de computación bioinformática LASERGENE, que es producida por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos mediante la determinación del alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press. Inc. 1997), Wu y col, (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2ª Edición (Academic Press, Inc. 1998)).

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



Se refieren también a fragmentos funcionales de los genes de las proteínas de unión al TGF-beta. En el contexto de esta invención, un "fragmento funcional" de un gen de una proteína de unión al TGF-beta hace referencia a una molécula de ácido nucleico que codifica una porción de un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta que o bien posee (1) la actividad funcional indicada antes, o bien (2) se une específicamente con un anticuerpo de una proteína de unión al TGF-beta. Por ejemplo, un fragmento funcional de un gen de una proteína de unión al TGF-beta descrito aquí comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Núms: 1, 5, 9, 11, 13, o 15.

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

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

Por ejemplo, la primera etapa en la preparación de una genoteca deADNc es aislar el ARN utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, las técnicas de aislamiento de ARN deben proporcionar un método para romper las células, un medio para inhibir la degradación de ARN dirigida por la ARNasa, y un método para separar el ARN del ADN, la proteína y los polisacáridos contaminantes. Por ejemplo, se puede aislar el ARN total congelando el tejido en nitrógeno líquido, triturando el tejido congelado con un mortero y una mano de mortero para lisar las células, extrayendo el tejido triturado con una solución de fenol/cloroformo para separar las proteínas, y separando el ARN de las impurezas restantes mediante precipitación

selectiva con cloruro de litio (ver, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3<sup>a</sup> Edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41] (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"]).

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

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

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

El enfoque básico para obtener clones de ADNc de la proteína de unión al TGF-beta puede ser modificado construyendo una genoteca deADNc sustraída que esté enriquecido en moléculas de ADNc específicas de la proteína de unión al TGF. Los mecanismos para construir

genotecas sustraídas son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sargent, "Isolation of Differentially Expressed Genes" en *Meth. Enzymol.* 152:423, 1987, y Wu y col., (eds.) "Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries", en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 29-65 (CRC Press, Inc. 1997)).

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

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

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

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

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

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

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

Chain Reaction to Clone Gene Family Members", in *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

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

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

15           Los anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta, producidos como se describe más abajo, también pueden ser utilizados para aislar secuencias de ADN que codifican los genes de la proteína de unión al TGF-beta de las genotecas de ADNc. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser utilizados para rastrear genotecas de expresión de 20           λgt11, o se pueden utilizar los anticuerpos para el inmunorrastreo después de la selección y la traducción de híbridos (ver, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-12 a 6-16; Margolis y col., "Screening λ expression libraries with antibody and protein probes", en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición*, Glover y col., 25           (eds.) páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

          La secuencia de un ADNc de una proteína de unión al TGF-beta o de un fragmento genómico de la proteína de unión al TGF-beta puede ser determinada utilizando 30           métodos normalizados. Por otra parte, la identificación de fragmentos genómicos que contienen un promotor o un elemento regulador de la proteína de unión al TGF-beta puede ser lograda utilizando mecanismos bien establecidos, tales como análisis de delección (ver, 35           generalmente, Ausubel (1995)).

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

### 3. Producción de genes de la proteína de unión al TGF-beta

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

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

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

Los cambios de aminoácidos conservativos en el gen de la proteína de unión al TGF-beta pueden ser introducidos sustituyendo nucleótidos por los nucleótidos citados en el SEC ID NO: 1. Tales "variantes de aminoácido conservativo" pueden ser obtenidas, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, y similar (ver Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22, y McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical

Approach (IRL Press 1991)). La capacidad funcional de tales variantes puede ser determinada utilizando un método normalizado, tal como el análisis descrito aquí. Alternativamente, un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta variante puede ser identificado mediante la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta.

Se pueden realizar análisis de delección rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener "fragmentos funcionales" de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la proteína de unión al TGF-beta. Como ilustración, se pueden digerir moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos del SEC ID NO: 1 con la nucleasa Bal31 para obtener una serie de delecciones encajadas. Después los fragmentos son insertados en vectores de expresión en un marco de lectura apropiado, y los polipéptidos expresados son aislados y sometidos a ensayo en cuanto a su actividad, o en cuanto a la capacidad de unirse a anticuerpos anti-proteína de unión al TGF-beta. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es la utilización de la mutagénesis dirigida al oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos concretos de un gen de la proteína del unión al TGF-beta utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Los mecanismos normalizados para el análisis funcional de las proteína son descritos, por ejemplo, por Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240:113, 1993; Content y col., "Expression and preliminar deletion analysis of the 42 kea 2-5A synthesise induced by human interferon", en *Biological Interferon Systems*, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", en



*Control of Animal Cell Proliferation, Vol. I*, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau y col., *J. Biol. Chem.* 270:29270, 1995; Fukunaga y col., *J. Biol. Chem.* 270:25291, 1995; Yamaguchi y col., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295, 1995; y Meisel y col., *Plant Molec. Biol.* 30:1, 1996.

También se refieren a fragmentos funcionales de un gen de la proteína de unión al TGF-beta que tienen cambios de aminoácidos conservativos.

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

típicamente en 0,5xSSC (1xSSC = cloruro de sodio 150 mM, citrato de sodio 15 mM) o en 0,5xSSPE a 55-60°C.

Con independencia de la secuencia de nucleótidos concreta de un gen de la proteína de unión al TGF-beta variante, el gen codifica un polipéptido que puede ser caracterizado por su actividad funcional, o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-proteína de unión al TGF-beta. Más específicamente, los genes de la proteína de unión al TGF-beta variantes codifican polipéptidos que muestran al menos un 50%, y preferiblemente, más del 60, 70, 80 o 90% de la actividad de los polipéptidos codificados por el gen de la proteína de unión al TGF-beta humano descrito aquí.

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

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

Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína foránea en células eucarióticas contienen típicamente (1) elementos de ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariótico que controlan el inicio de

la transcripción, tal como un promotor, y (3) elementos de ADN que controlan la maduración de los transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación.

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

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

Entre las secuencias reguladoras transcripcionales se incluyen una región promotora suficiente para dirigir  
30 el inicio de la síntesis de ARN. Entre los promotores eucarióticos adecuados se incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón [Hamer y col., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273,1982], el promotor TK del Herpes virus [McKnight, *Cell* 31:355, 1982], el promotor temprano de  
35 SV40 [Benoist y col., *Nature* 290:304,1981], el promotor

del virus del Sarcoma de Rous [Gorman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9:6777, 1982], el promotor de citomegalovirus [Foecking y col., *Gene* 45, 101, 1980], y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (ver, 5 generalmente, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativamente, se puede utilizar un promotor 10 procariótico, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3 para controlar la expresión del gen de la proteína de unión al TGF-beta en células de mamífero si el promotor procariótico está regulado por un promotor eucariótico (Zhou y col., *Mol. Cell. Biol.* 15 10:4529, 1990; Kaufman y col., *Nucl. Acids Res.* 19:4485, 1991).

Los genes de la proteína de unión al TGF-beta también pueden ser expresados en células bacterianas, de levadura, de insectos o de plantas. Los promotores 20 adecuados que pueden ser utilizados para expresar los polipéptidos de la proteína de unión al TGF-beta en un huésped procariótico son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P<sub>R</sub> y P<sub>I</sub> del bacteriófago lambda, los promotores trp, recA, del choque térmico, lacUV5, tac, lpp-lacSpr, phoA, y lacZ de 25 *E. coli*, los promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla de pBR322, y el promotor CAT del gen de la cloramfenicol acetil transferasa. Los promotores 30 procarióticos han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277, 1987, Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4<sup>a</sup> Ed. (Benjamin Cummins 1987), y por 35 Ausubel y col., (1995).

Entre los huéspedes procarióticos preferidos se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Entre las cepas adecuadas de *E. coli* se incluyen BL21(DE3), BL2(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4, DH5, DH51, DH51F', DH51MCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, y ER1647 (ver, por ejemplo, Brown (Ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Entre las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* se incluyen BR151, YB886, M1119, M1120, y B170 (ver, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods", en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (Ed.) (IRL Press 1985)).

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

El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz de introducir genes de la proteína de unión al TGF-beta clonada en células de insecto. Los vectores de expresión adecuados están basados en el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), y contienen promotores bien conocidos tales como el promotor 70 de la proteína del choque térmico de *Drosophila* (hsp), el promotor del gen temprano inmediato (ie-1) y el promotor 39K temprano retardado de *Autographa californica*, el promotor p10 de baculovirus, y el

promotor de la metalotioneína de *Drosophila*. Entre las células huésped e insecto adecuadas se incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, una línea celular de ovario de pulpa de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE, y Sf21 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*. Las técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus son proporcionadas por Bailey y col., "Manipulation of Baculovirus Vectors", en *Methods in Molecular Biology, Volumen 7: Gene Transfer and Expression Protocols*, Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), por Patel y col., "The baculovirus expression system", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover y col., (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), por Ausubel (1995) en las páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995), y por Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Entre los promotores para la expresión en levaduras se incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa), y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levaduras y son asequibles fácilmente. Entre estos vectores se incluyen vectores basados en YIp, tales como YIp5, vectores YRp, tales como YRp17, vectores YEp tales como YEp13 y vectores YCp, tales como YCp19. Un experto en la técnica apreciará que hay una amplia variedad de vectores adecuados para la expresión en células de levadura.

Los vectores de expresión también pueden ser introducidos en protoplastos de plantas, tejidos

vegetales intactos, o células vegetales aisladas. Los métodos generales para cultivar tejidos vegetales son proporcionados, por ejemplo, por Miki y col., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", en *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick y col. (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

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

Los métodos generales para expresar y recuperar la proteína foránea producida por un sistema celular de mamífero son proporcionados por ejemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col., (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Los mecanismos normalizados para recuperar la proteína producida por un sistema bacteriano son proporcionados, por ejemplo, por Grisshammer y col., "Purification of over-produced proteins from E. coli cells", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición,

Glover y col. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los métodos establecidos para el aislamiento de proteínas recombinante a partir de un sistema de baculovirus son descritos por Richardson (ed.),  
5 *Baculovirus Expression Protocols* (The Human Press, Inc., 1995).

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

## 20 5. Producción de Anticuerpos para las proteína de unión al TGF-beta

Los anticuerpos para la proteína de unión al TGF-beta pueden ser obtenidos, por ejemplo, utilizando el producto de una expresión como antígeno. Los anticuerpos  
25 anti-proteína de unión al TGF-beta particularmente útiles se "unen específicamente" con la proteína de unión al TGF-beta de los SEC ID Núms. 2, 6, 10, 12, 14, o 16, pero no a otras proteínas de unión al TGF-beta tales como Dan, Cerberus, SCGF, o Gremlin. Los anticuerpos de la presente  
30 invención (incluyendo los fragmentos y derivados de los mismos) pueden ser un anticuerpo policlonal o, especialmente, uno monoclonal. El anticuerpo puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina, y puede ser por ejemplo un anticuerpo IgG, por ejemplo IgG<sub>1</sub>,  
35 IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgE, IgM, o IgA. Puede ser de origen



animal, por ejemplo de mamífero, y puede ser por ejemplo un anticuerpo de ratón, de rata, humano o de otro primate. Cuando se desea el anticuerpo puede ser un anticuerpo internalizante.

5            Los anticuerpos policlonales para la proteína de unión al TGF-beta recombinante pueden ser preparados utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Green y col. "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* 10 (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992); Williams y col., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2<sup>a</sup> Edición, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford 15 University Press 1995)). Aunque los anticuerpos policlonales se originan típicamente en animales tales como ratas, ratones, conejos, cabras, u ovejas, un anticuerpo anti-proteína de unión al TGF de la presente invención también puede derivar de un anticuerpo de 20 primate sub-humano. Los mecanismos generales para originar anticuerpos útiles para el diagnóstico y la terapia en babuinos fueron encontrados, por ejemplo, en Goldenberg y col., publicación de patente internacional Núm. WO 91/11465 (1991), y en Losman y col., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. 25

          El anticuerpo debe comprender al menos un dominio de la región variable. El dominio de la región variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una 30 secuencia de aminoácidos hipervariable responsable de la unión al antígeno embebido en una secuencia marco. En términos generales el dominio de la región variable (V) puede ser cualquier ordenación adecuada de dominios variables de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y/o ligera (V<sub>L</sub>) de 35 inmunoglobulina. De este modo por ejemplo el dominio de

la región V puede ser monomérico y ser un dominio  $V_H$  o  $V_L$  donde estos sean capaces de unirse independientemente con una afinidad aceptable. Alternativamente el dominio de la región V puede ser dimérico y contener dímeros  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$ , o  $V_L$ - $V_L$  en los cuales las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  están asociadas no covalentemente (abreviado en adelante como  $F_V$ ). Cuando se desea, no obstante, las cadenas pueden estar acopladas covalentemente o bien directamente, por ejemplo por medio de un enlace disulfuro entre los dos dominios variables, o a través de un ligador, por ejemplo un ligador peptídico, para formar un dominio de cadena sencilla (abreviado en adelante como  $scF_V$ ).

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

El dominio de la región variable puede estar anclado covalentemente en un aminoácido C-terminal a al menos otro dominio del anticuerpo o un fragmento del mismo. De este modo, por ejemplo cuando un dominio  $V_H$  está presente en el dominio de la región variable este puede estar conectado a un dominio  $C_{H1}$  de la inmunoglobulina o un fragmento del mismo. De un modo similar un dominio  $V_L$  puede estar conectado a un dominio  $C_K$  o un fragmento del

mismo. De este modo por ejemplo el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión al antígeno contiene dominios  $V_H$  y  $V_L$  asociados conectados en sus extremos C a un dominio  $CH_1$  y  $C_K$  respectivamente. El dominio  $CH_1$  puede ser prolongado con aminoácidos adicionales, por ejemplo para proporcionar un dominio de la región bisagra como el encontrado en un fragmento Fab', o para proporcionar dominios adicionales, tales como los dominios  $CH_2$  y  $CH_3$  del anticuerpo.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden ser obtenidos construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes son preparados, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos (ver, por ejemplo, Larrick y col., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter y col. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995); y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y col. (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden ser en general monoclonales (preparados mediante inmunización convencional y procedimientos de fusión celular) o en el caso de los fragmentos, derivados de allí utilizando cualquier mecanismo químico normalizado adecuado v.g., reducción o escisión enzimática y/o digestión, por ejemplo mediante tratamiento con pepsina.

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

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

Además, un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta de la presente invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos son obtenidos a partir de ratones transgénicos que han sido diseñados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una sensibilización antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen desorganizaciones redireccionadas de los loci de la cadena pesada y de la

cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden ser utilizados para producir hibridomas de rastreo de anticuerpos humanos.

5 Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, Green y col., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg y col., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor y col., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

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

10

15

Para usos concretos, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-proteína de unión a TGF-beta. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado  $F(ab')_2$ . Este fragmento puede ser escindido adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes  $Fab'$  de 3,5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede ser realizada utilizando un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces

20

25

30

35

disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática en la que se utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos por ejemplo, por Goldenberg, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.331.647, Nisonoff y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959, Edelman y col., en *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967), y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10-2.10.4.

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

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

A partir de aquí, uno o más vectores de expresión replicables que contengan el ADN y pueden ser preparados y utilizados para transformar una línea celular apropiada, v.g. una línea celular de mieloma no

productora, tal como una línea NSO de ratón o una línea bacteriana, v.g. de E. coli, en la cual tendrá lugar la producción del anticuerpo. Con el fin de obtener una transcripción y una traducción eficaz, una secuencia de ADN de cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, concretamente un promotor y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia de dominio variable. Los métodos concretos para producir anticuerpos de esta manera son generalmente bien conocidos y utilizados rutinariamente. Por ejemplo, describen procedimientos de la biología molecular básicos Maniatis y col. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); la secuenciación del ADN se puede realizar como describen Sanger y col. (PNAS 74, 5463, (1977)) y el manual de secuenciación plc de Amersham International; y la mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo según el método de Kramer y col. (Nucl. Acids Res. 12, 9441, (1984)) y el manual Anglian Biotechnology Ltd. Adicionalmente, existen numerosas publicaciones, que detallan técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos mediante la manipulación del ADN, la creación de vectores de expresión y la transformación de células apropiadas, por ejemplo como revisan Mountain A y Adair, J R in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (ed. Tombs, M P, 10, Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, UK) y en la Memoria de la Patente Internacional Núm. WO 91/09967.

Cuando se desea, el anticuerpo según la invención puede tener una o más moléculas efectoras o informadoras ancladas a él y la invención se amplía a tales proteínas modificadas. Las moléculas efectoras o informadoras pueden estar ancladas al anticuerpo a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible, aminoácido amino terminal o, cuando esté presente un grupo funcional carbohidrato localizado en el anticuerpo, siempre que,

por supuesto, este no afecte adversamente a las propiedades de unión y a la utilidad eventual de la molécula. Entre los grupos funcionales concretos se incluyen, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo, carboxilo o aldehído libre. El anclaje del anticuerpo y la molécula o las moléculas efectoras y/o informadoras puede ser logrado vía tales grupos y un grupo funcional apropiado en las moléculas efectoras o informadoras. La conexión puede ser directa o indirecta, por medio de grupo espaciadores o formadores de puentes.

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

Entre los agentes antineoplásicos concretos se incluyen agentes citotóxicos y cistostáticos, por ejemplo, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (v.g., clorambucil, melfalan, mecloretamina, ciclofosfamida, o mostaza de uracilo) y los derivados de los mismos, trietilenfosforamida, busulfan, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético o ácido fluorocítrico, antibióticos,



tales como bleomicinas (v.g. sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorrubicina, mitomicinas (v.g. mitomicina C), actinomicinas (v.g. dactinomicinas), plicamicina, calicamicina y derivados de la misma, o  
 5 esperamicina y derivados de la misma, inhibidores mitóticos, tales como etoposido, vincristina o vinblastina y derivados de los mismos, alcaloides, tales como elipticina; polioles tales como taxicina-I o taxicina-II, hormonas tales como andrógenos (v.g.  
 10 dromostanolona o testolactona), progestinas (v.g. acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (v.g., difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (v.g. tamoxifeno); antraquinonas, tales  
 15 como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxiurea, hidrazinas, tales como procarbazona, o imidazoles, tales como dacarbazina.

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

Entre los metales quelados se incluyen quelatos de metales di- o tri-positivos que tienen un número de coordinación de 2 a 8 inclusive. Entre los ejemplos  
 25 concretos de tales metales se incluyen tecnecio (Tc), renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido.  
 30 Entre los radionúclidos concretos se incluyen  $Tc^{99m}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Co^{58}$ ,  $Co^{60}$ ,  $Cu^{67}$ ,  $Au^{195}$ ,  $Au^{199}$ ,  $Au^{110}$ ,  $Pb^{203}$ ,  $Bi^{206}$ ,  $Bi^{207}$ ,  $In^{111}$ ,  $Ga^{67}$ ,  $Ga^{68}$ ,  $Y^{88}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Tb^{160}$ ,  $Gd^{153}$  y  $Sc^{47}$ .

El metal quelado puede ser por ejemplo uno de los tipos de metal quelado anteriores con cualquier agente  
 35 quelante polidentado adecuado, por ejemplo poliaminas

acíclicas o cíclicas, poliéteres, (v.g. éteres corona y derivados de los mismos), poliamidas, porfirinas, y derivados carbocíclicos.

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

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

#### ANALISIS PARA SELECCIONAR MOLECULAS QUE INCREMENTAN LA DENSIDAD OSEA

Se refieren también a métodos para seleccionar y/o aislar compuestos que son capaces de incrementar la densidad ósea. Por ejemplo, métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprende las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de

unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada estimula la señalización por la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

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

Los elementos representativos de tales análisis son proporcionados más abajo en los Ejemplos 5 y 6. En resumen, un miembro de la familia de la súper-familia de TGF-beta o una proteína de unión de TGF-beta se une primero a una fase sólida, seguido de la adición de una

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

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

Por ejemplo, se proporcionan métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de incrementar el contenido mineral del hueso, que comprenden las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, (b) determinar si la molécula

seleccionada sobre-regula la señalización de la familia de proteínas del TGF-beta, o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas del TGF-beta. En ciertas realizaciones, la molécula intensifica la capacidad del TGF-beta para funcionar como regulador positivo de la diferenciación de las células del mesénquima.

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

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

Se debe observar que mientras los métodos citados aquí pueden hacer referencia al análisis de una molécula de ensayo individual, ellos no deben estar limitada a ellos. En particular, la molécula seleccionada puede estar contenida en una mezcla de compuestos. Por tanto, los métodos citados pueden comprender adicionalmente la etapa de aislar una molécula que inhiba la unión de la

proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

#### MOLECULAS CANDIDATO

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

##### 1. Moléculas Orgánicas

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

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

          Entre los ejemplos representativos de tales genotecas químicas combinatorias se incluyen los descritos por Agrafiotis y col., "System and method of  
35 automatically generating chemical compounds with desired

properties", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.463.564; Armstrong, R.W., "Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds through the use of multiple component combinatorial array syntheses", WO 95/02566; 5 Baldwin, J.J. y col., "Sulfonamide derivatives and their use", WO 95/24186; Baldwin, J.J. y col., "Combinatorial dihydrobenzopyran library", WO 95/30642; Brenner, S., "New kit for preparing combinatorial libraries", WO 95/16918; Chenera, B. y col., "Preparation of library of 10 resin-bound aromatic carbocyclic compounds", WO 95/16712; Ellman, J.A., "Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.288.514; Felder, E. y col., "Novel combinatorial compound libraries", WO 95/16209; 15 Lerner, R. y col., "Encoded combinatorial chemical libraries", WO 93/20242; Pavia, M.R. y col., "A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library", WO 95/04277; Summerton, J.E. y D.D. Weller, 20 "Morpholino-subunit combinatorial library and method", Patente de los Estados Unidos Núm. 5.506.337; Holmes, C., "Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazonones, and Derivatives thereof", WO 96/00148; Phillips, G.B. y G.P. Wei, "Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles", *Tet. Letters* 37:4887-90, 1996; Ruhland, B. y col., "Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse  $\beta$ -Lactams", *J. Amer. Chem. Soc.* 111:253-4, 1996; Look, G.C. y col., "The Identification of Cyclooxygenase-I 25 Inhibitors from 4-Thiazolidonone Combinatorial Libraries", *Bioorg. and Med. Chem. Letters* 6:707-12, 1996.

## 2. Proteínas y Péptidos

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

5

a. Genotecas Peptídicas Combinatorias

10

15

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

20

b. Anticuerpos

25

30

35

Los anticuerpos que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta puede ser fácilmente preparada dada la descripción proporcionada aquí. En el contexto de la presente invención, se entiende que los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-idiotípicos, fragmentos de anticuerpos (v.g., Fab, y F(ab')<sub>2</sub>, regiones variables F<sub>v</sub>, o regiones determinantes de la complementariedad). Como se ha estudiado antes, se entiende que los anticuerpos son específicos contra la proteína de unión a TGF-beta, o contra un miembro de la familia del TGF-beta específico, si se unen con una K<sub>a</sub> mayor o igual a 10<sup>7</sup> M, preferiblemente mayor o igual a 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>, y no se unen a



otras proteínas de unión a TGF-beta, o, se unen con una  $K_a$  menor o igual a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Además, los anticuerpos de la presente invención deben bloquear o inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de unión a TGF-beta.

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

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

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados fácilmente utilizando mecanismo convencionales (ver las Patentes de los Estados Unidos Núms. RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993, ver también *Monoclonal*

*Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kenett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980, y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

5

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

10

15

20

Las células que se obtienen del animal inmunizado pueden ser inmortalizadas mediante infección con un virus tal como el virus de Epstein-Barr (EBV) (ver Glasky and Reading, *Hybridoma* 8(4):377-389, 1989). Alternativamente, en una realización preferida, las suspensiones del bazo y/o los nódulos linfáticos cosechados son fusionadas con una célula de mieloma adecuada con el fin de crear un "hibridoma" que secreta anticuerpo monoclonal. Entre las líneas de mieloma adecuadas se incluye, por ejemplo, NS-1 (ATCC Núm. TIB 18), y P3X63 - Ag 8.653 (ATCC Núm. CRL 1580).

25

30

Tras la fusión, las células son colocadas en placas para el cultivo de tejidos conteniendo un medio adecuado, tal como RPMI 1640, o DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), así como

35

ingredientes adicionales, tales como suero bovino fetal (FBS, es decir, de Hyclone, Logan, Utah, o JRH Biosciences). Adicionalmente, el medio debe contener un reactivo que permita selectivamente el crecimiento de células de bazo y mieloma fusionadas tales como HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Después de aproximadamente siete días, las células fusionadas resultantes o hibridomas pueden ser rastreados con el fin de determinar la presencia de anticuerpos que sean reactivos contra la proteína de unión a TGF-beta (dependiendo del antígeno utilizado), y que bloqueen o inhiban la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta.

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

Asimismo se pueden utilizar otras técnicas para construir anticuerpos monoclonales (ver William D. Huse y col., "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281, Diciembre de 1989; ver también L. Sastry y

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

De un modo similar, también se pueden construir porciones o fragmentos, tales como fragmentos Fab y Fv, de anticuerpos utilizando mecanismos de digestión enzimática o de recombinación de ADN convencionales para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo que se une específicamente. En una realización, los genes que codifican la región variable de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de interés son ampliados utilizando cebadores nucleotídicos para la región variable. Estos cebadores pueden ser sintetizados por un experto normal en la técnica, o pueden ser adquiridos de fuentes asequibles comercialmente. Stratagene (La Jolla) vende cebadores

para regiones variables de ratón y de humano incluyendo, entre otros, cebadores para las regiones  $V_{Ha}$ ,  $V_{Hb}$ ,  $V_{Hc}$ ,  $V_{Hd}$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  y  $C_L$ . Estos cebadores pueden ser utilizados para amplificar las regiones variables de la cadena pesada o ligera, que pueden ser insertadas después en vectores tales como ImmunoZAP<sup>®</sup> H o ImmunoZAP<sup>®</sup> L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores pueden ser introducidos después en E. coli, levaduras, o sistemas de expresión basados en mamíferos. Utilizando estos mecanismos, se pueden producir grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla conteniendo una fusión de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  (ver Bird y col., Science 242:423-426, 1988). Además, semejantes técnicas pueden ser utilizadas para cambiar un anticuerpo "de ratón" por un anticuerpo "humano", sin alterar la especificidad de unión del anticuerpo.

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

#### c. Proteínas de unión a TGF-beta mutantes

Como se describe aquí y más abajo en los Ejemplos (v.g., Ejemplos 8 y 9), las versiones alteradas de la proteína de unión a TGF-beta que compiten con la capacidad de la proteína de unión a TGF-beta nativa para bloquear la actividad de un miembro de la familia de 1 TGF-beta concreto deben conducir a un incremento de la densidad ósea. De este modo, los mutantes de la proteína

de unión a TGF-beta que se unen al miembro de la familia del TGF-beta pero no inhiben la función del miembro de la familia del TGF-beta satisfarían el criterio. Las versiones mutantes deben competir eficazmente con las funciones inhibitoras endógenas de la proteína de unión a TGF-beta.

d. Producción de proteínas

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

criterios expuestos aquí. En el contexto de la presente invención, unas condiciones altamente restrictivas representan condiciones de hibridación normalizadas (v.g., 5XSSPE, SDS al 0,5% a 65°C, o equivalente).

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

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

          Entre otros derivados de las proteínas descritas aquí se incluyen los productos conjugados de las proteínas junto con otras proteínas o polipéptidos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la síntesis de  
30           proteínas de fusión N-terminales o C-terminales que pueden ser añadidas para facilitar la purificación o identificación de proteínas (ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.851.341, ver también, Hopp y col., *Bio/Technology* 6:1204, 1988). Alternativamente, se pueden  
35           construir proteínas de fusión tales como Flag/proteína de

unión a TGF-beta con el fin de ayudar a la identificación, expresión y análisis de la proteína.

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

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

Las mutaciones que se realizan en las moléculas de ácido nucleico de la presente invención conservan



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

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

La presente invención también proporciona la manipulación y la expresión de los genes descritos antes cultivando células huésped que contienen un vector capaz de expresar los genes descritos antes. Entre tales vectores o constructos de vectores se incluyen moléculas de ácido nucleico derivadas de ADNc o sintéticas que

codifican la proteína deseada, que están conectadas operablemente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados. Los elementos reguladores adecuados pueden estar derivados de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero, de insecto, o vegetales. La selección de los elementos reguladores apropiados depende de una de las células huésped seleccionadas, y puede ser completada fácilmente por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos de los elementos reguladores se incluyen: un promotor y un intensificador transcripcionales o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, un terminador transcripcional, y una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción.

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

Entre las células huésped bacterianas adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, así como muchas otras especies bacterianas bien conocidas por un experto normal en la técnica. Entre los ejemplos representativos de las células huésped bacterianas se incluyen DH5 $\alpha$  (Stratagene, La Jolla, California).

Los vectores de expresión bacteriana comprenden preferiblemente un promotor que funcione en la célula huésped, uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, y un origen de replicación bacteriano. Entre los promotores representativos se incluye la  $\beta$ -lactamasa (penicilinas) y el sistema promotor de la lactosa (ver Chang y col., *Nature* 275:615, 1978), el promotor de la ARN polimerasa de T7 (Studier y col., *Meth. Enzymol.* 185:60-89, 1990) el promotor lambda (Elvin y col., *Gene* 87:123-126, 1990), el promotor trp (Nichols y Yanofsky, *Meth. In Enzymology* 101::155, 1983) y el promotor tac (Russell y col., *Gene* 20:231, 1982). Entre los marcadores seleccionables representativos se incluyen diversos marcadores de resistencia a antibióticos tales como los genes de resistencia a kanamicina o ampicilina. Muchos plásmidos adecuados para transformar células huésped son bien conocidos en la técnica, incluyendo entre otros, pBR322 (ver Bolivar y col., *Gene* 2:95, 1977), los plásmidos de pUC pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (ver Messing, *Meth. in Enzimology* 101:20-77, 1983 y Vieira y Messing, *Gene* 19:259-268, 1982), y pNH8A, pNH16a, pNH18a, y Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California).

Entre las células huésped de levaduras y hongos adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen, entre otros, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, los géneros *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas

especies del género *Aspergillus* (McKnight y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.349). Entre los vectores de expresión adecuados para las levaduras y hongos se incluyen, entre otros, YCp50 (ATCC Núm. 37419) para  
5 levaduras, y el vector de clonación de amdS pV3 (Turnbull, *Bio/Technology* 7:169, 1989), YRp7 (Struhl y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039, 1978), YEp13 (Broach y col., *Gene* 8:121-133, 1979), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) y derivados de  
10 los mismos.

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

Como con los vectores bacterianos, los vectores de levadura incluirán generalmente un marcador seleccionable, que puede ser uno de los numerosos genes  
30 que muestran un fenotipo dominante para el cual existe un análisis fenotípico para permitir la selección de los transformantes. Los marcadores seleccionables preferidos son aquellos que complementan la auxotrofia de la célula huésped, proporcionan resistencia a antibióticos o  
35 permiten a una célula utilizar fuentes de carbono

específicas, e incluyen *leu2* (Broach y col., *ibid.*), *ura3* (Botstein y col., *Gene* 8:17, 1979), o *his3* (Struhl y col., *ibid.*). Otro marcador seleccionable adecuado es el gen *cat*, que confiere resistencia al cloramfenicol a células de levadura.

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

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

Entre los vectores virales se incluyen aquellos que comprenden un promotor que dirige la expresión de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una proteína deseada como se ha descrito antes. Se puede utilizar una amplia variedad de promotores en el contexto de la presente invención, incluyendo por ejemplo, promotores tales como MoMLV LTR, RSV LTR, Friend MuLV LTR, promotores adenovirales (Ohno y col., *Science* 265:781-784, 1994), el promotor/intensificador de la

fosfotransferasa de neomicina, el promotor del parvovirus tardío (Koering y col., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), el promotor TK del Herpes, el promotor de SV40, el intensificador/promotor del gen IIa de la metalotioneína, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, y el promotor tardío inmediato de citomegalovirus. En las realizaciones particularmente preferidas de la invención, el promotor es un promotor específico del tejido (ver, v.g., WO 91/02805; EP 0.415.731; y WO 90/07936). Entre los ejemplos representativos de los promotores específicos de tejidos adecuados se incluyen el promotor de la enolasa específica neural, el promotor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas, el promotor de la proteína morfogénica del hueso, el promotor de la alfa1-quimerina humana, el promotor de la sinapsina I y el promotor de la sinapsina II. Además de los promotores indicados antes, se pueden utilizar otros promotores específicos de virus (v.g., promotores retrovirales, (incluyendo los indicados antes, así como otros tales como los promotores del HIV), promotores específicos de la hepatitis, el herpes (v.g., EBV), y bacterianos, fúngicos o parasíticos (v.g., malaria) con el fin de elegir como diana una célula o tejido específico que esté infectado con un virus, bacteria, hongo o parásito.

Entre las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención se incluyen, entre otros COS, CHO, SaOS, osteosarcomas, KS483, MG-63, osteoblastos primarios, y estroma de médula ósea de humano o mamífero. Entre los vectores de expresión en mamíferos para su uso en la realización de la presente invención se incluirán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o un ADNc. Entre los promotores preferidos se incluyen promotores virales y promotores celulares. Entre los promotores específicos del hueso se incluyen la sialo-proteína ósea y el promotor de la osteocalcina.

Entre los promotores virales se incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (Boshart y col., *Cell* 41:521-530, 1985), el promotor tardío inmediato de citomegalovirus, el promotor de SV40 (Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981), MMTV LTR, RSV LTR, metalotioneína-1, adenovirus Ela. Entre los promotores celulares se incluyen el promotor de la metalotioneína-1 de ratón (Palmiter y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.579.821), un promotor  $V_K$  de ratón (Bergman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983; Grant y col., *Nucl. Acids Res.* 15:5496, 1987) y un promotor  $V_H$  de ratón (Loh y col., *Cell* 33:85-93, 1983). La elección del promotor dependerá, al menos en parte, del nivel de expresión deseado o de la línea celular receptora que vaya a ser transfectada.

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

de SV40. Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias que codifican los ARN Va de adenovirus. Los vectores de expresión adecuados pueden ser obtenidos a partir de fuentes comerciales (v.g., Stragene, La Jolla, California).

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

Las células de mamífero que contienen un vector adecuado se dejan crecer durante un período de tiempo, típicamente 1-2 días, para empezar a expresar la secuencia o las secuencias de ADN de interés. La selección del fármaco es aplicada después para seleccionar el crecimiento de las células que están expresando el marcador seleccionable de una manera



estable. Para las células que han sido transfectadas con un marcador amplificable, seleccionable se puede incrementar la concentración de fármaco por etapas para seleccionar el número de copias de las secuencias aumentado de las secuencias clonadas, incrementando de ese modo los niveles de expresión. Las células que expresan las secuencias introducidas son seleccionadas y rastreadas en cuanto a la producción de la proteína de interés en la forma deseada o al nivel deseado. Las células que satisfacen estos criterios pueden ser clonadas después y aumentadas a escala para la producción.

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

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

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

En aspectos relacionados de la presente invención, las proteínas de la presente invención pueden ser expresadas en un animal transgénico cuyas células germinales y células somáticas contienen un gen que  
5 codifica la proteína deseada y que están conectadas operablemente a un promotor eficaz para la expresión del gen. Alternativamente, de una manera similar se puede preparar animales transgénicos que carezcan del gen deseado (v.g., ratones con un gen desactivado).  
10 Semejantes transgénicos pueden ser preparados en una variedad de animales no humanos, incluyendo ratones, ratas, conejos, ovejas, perros, cabras y cerdos (ver Hammer y col., *Nature* 315:680-683, 1985, Palmiter y col., *Science* 222:809-814, 1983, Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442, 1985, Palmiter y Brinster,  
15 *Cell* 41:343-345, 1985, y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.175.383, 5.087.751, 4.736.866, 5.387.742, 5.347.075, 5.221.778, y 5.175.384). Brevemente, un vector de expresión, incluyendo una molécula de ácido nucleico que va a ser expresada junto con secuencias para el control de la expresión situadas adecuadamente, es introducido en pronúcleos de huevos fertilizados, por ejemplo, mediante microinyección. La integración del ADN  
20 inyectado es detectada mediante análisis de transferencia de ADN desde las muestras de tejido. Se prefiere que el ADN introducido sea incorporado a la línea germinal del animal de manera que pase a la progenie del animal. La expresión específica de tejidos puede ser lograda por medio del uso de un promotor específico de tejidos, o por  
25 medio del uso de un promotor inducible, tal como el gen promotor de la metalotioneína (Palmiter y col., 1983, *ibid.*), que permita la expresión regulada del transgen.

Las proteínas pueden ser aisladas, entre otros métodos, cultivando sistemas huésped y vectores adecuados  
35 para producir los productos de traducción recombinantes

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

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

### 3. Moléculas de Acido Nucleico

En otros aspectos de la invención, se refiere a moléculas de ácido nucleico que son capaces de inhibir la  
unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de  
35 la familia del TGF-beta. Por ejemplo, en una realización

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

En otras realizaciones, se proporcionan ribozimas que son capaces de inhibir la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta. Según se utiliza aquí, se pretende que "ribozimas" incluya moléculas de ARN que contengan secuencias antisentido para el reconocimiento específico, y una actividad enzimática de escisión del ARN. La hebra catalítica escinde un sitio específico en un ARN diana a una concentración mayor de la estequiométrica. Se pueden utilizar una amplia variedad de ribozimas, incluyendo por ejemplo, la ribozima cabeza de martillo (por ejemplo, como describen Forster y Symons, Cell 48:211-220, 1987; Haseloff y Gerlach, Nature 328:596-600, 1988; Walbot y Bruening, Nature 334:196, 1988; Haseloff y Gerlach, Nature 334:585, 1988); la ribozima en horquilla (por ejemplo, como describen Haseloff y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.254.678, expedida el 19 de Octubre

de 1993, y Hempel y col., Solicitud de Patente Europea Núm. 0.360.257, publicada el 26 de Marzo de 1990); y ribozimas basadas en el ARN ribosomal de *Tetrahymena* (ver Cech y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.987.071). Las ribozimas de la presente invención constan típicamente de ARN, pero también pueden estar compuestas por ADN, análogos de ácido nucleico (v.g., fosforotioatos), o quiméricos de los mismos (v.g., ADN/ARN/ARN).

#### 4. Marcas

El producto génico o cualquiera de las moléculas candidato descritas antes y más abajo, pueden estar marcadas con una variedad de compuestos, incluyendo por ejemplo, moléculas fluorescentes, toxinas, y radionúclidos. Entre los ejemplos representativos de moléculas fluorescentes se incluyen fluoresceína, proteínas *Phycobili*, tales como ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y luciferasa. Entre los ejemplos representativos de las toxinas se incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria, toxina del cólera, gelonina, proteína antiviral de *Phytolacca americana* ("pokeweed"), tritina, toxina de *Sigella*, y exotoxina A de *Pseudomonas*. Entre los ejemplos representativos de los radionúclidos se incluyen Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Ph-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212. Además, los anticuerpos descritos antes también pueden ser marcados o conjugados con un pareja de un par de unión al ligando. Entre los ejemplos representativos se incluyen avidina-biotina, y riboflavina-proteína de unión a riboflavina.

Los métodos para conjugar o marcar las moléculas descritas aquí con las marcas representativas mostradas antes pueden ser fácilmente completados por un experto

normal en la técnica (ver Trichothecene Antibody Conjugate, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.744.981; Antibody Conjugate, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.106.951; Fluorogenic Materials and Labeling Techniques, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.018.884; Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.897.255; y Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.988.496; ver también Inman, *Methods In Enzymology*, Vol. 34, *Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B*, Jackoby y Wilchek (eds.), Academic Press, Nueva York, pág. 30, 1974; ver también Wilchek y Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988).

#### COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

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

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

#### METODOS DE TRATAMIENTO

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

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

Otras condiciones que pueden ser tratadas o evitadas incluyen una amplia variedad de causas de osteopenia (es decir, una condición que ocasiona una desviación estándar mayor de uno de contenido mineral o densidad del hueso por debajo del contenido mineral esquelético pico en la juventud). Entre los ejemplos representativos de tales condiciones se incluyen los estados anémicos, las condiciones causadas por esteroides, las condiciones causadas por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia en calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia y osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes melitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática



refleja, osteoporosis regional transitoria y osteomalacia.

En un aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo o fragmento de la invención,  
5 para uso en un método para aumentar el contenido de mineral óseo o densidad, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un animal de sangre caliente de dicho anticuerpo o fragmento que inhibe la proteína de unión de proteína TGF-beta a un  
10 miembro de la familia del TGF-beta. Ejemplos de los animales de sangre caliente que se pueden tratar se incluyen tanto vertebrados como mamíferos, incluyendo por ejemplo, caballos, vacas, cerdos, ovejas, perros, gatos, ratas y ratones. Entre los ejemplos representativos de  
15 las moléculas terapéuticas se incluyen anticuerpos humanos.

Se refieren también a métodos de aumentar la densidad ósea que comprende la etapa de introducir en las células que buscan el hueso un vector que dirige la  
20 expresión de una molécula que inhibe la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta, y administrar el vector que contiene células en un animal de sangre caliente. Brevemente, las células que buscan el hueso pueden ser obtenidas directamente a partir del  
25 hueso de pacientes (v.g., células obtenidas a partir de médula ósea tales como CD34+, osteoblastos, osteocitos, y similares), a partir de sangre periférica, o a partir de cultivos.

Un vector que dirige la expresión de una molécula  
30 que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta es introducido en las células. Entre los ejemplos representativos de los vectores adecuados se incluyen vectores virales tales como vectores virales del herpes (v.g., Patente de los  
35 Estados Unidos Núm. 5.288.641), vectores adenovirales

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

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una molécula que inhibe la unión de una proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia del TGF-beta por sí mismas pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, la administración a asialomucoide (ASOR) conjugado con complejos de poli-L-lisina ADN (Cistano y col., *PNAS* 92122-92126, 1993), ADN unido a adenovirus muerto (Curiel y col., *Hum. Gene Ther.* 3(2):147-154, 1992), introducción mediada por citofectina (DMRIE-DOPE, Vical, California), inyección de ADN directa

(Acsadi y col., *Nature* 352:815-818, 1991); ligandos de ADN (Wu y col., *J. of Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989); lipofección (Felgner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989); liposomas (Pickering y col., *Circ.* 89(1):13-21, 1994; y Wang y col., *PNAS* 84:7851-7855, 1987); bombardeo con microproyectiles (Williams y col., *PNAS* 88:2726-2730, 1991); y liberación directa de ácido nucleicos que codifican la propia proteína ya sea sola (Vile y Hart, *Cancer Res.* 53:3860-3864, 1993) o utilizando complejos de PEG-ácido nucleico.

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

La determinación del contenido mineral del hueso incrementado puede ser resuelta directamente por medio del uso de los rayos x (v.g., Dual Energy X-ray Absorptometry o "DEXA"), o mediante inferencia a través de marcadores de recambio óseo (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, procolágeno de tipo 1, propéptido C' (PICP), y fosfatasa alcalina total; ver Comier, C., *Curr. Opin. In Rheu.* 7:243, 1995), o marcadores de resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinaria, fosfatasas ácidas tartrato-resistentes del plasma y galactosilhidroxilisina; ver Comier, supra). La cantidad de masa ósea puede ser calculada a partir de los pesos corporales, o utilizando otros métodos (ver Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. And Rel. Res.* 5:177-181, 1984).

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la cantidad y la frecuencia de la administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación que esté siendo

tratada, de la respuesta deseada, de la condición del paciente, etcétera. Típicamente, las composiciones pueden ser administradas mediante una variedad de técnicas, como se ha indicado antes.

5 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

#### EJEMPLOS

##### EJEMPLO 1

#### 10 MAPAS DE ESCLEREOSTIOSIS PARA EL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 17 HUMANO

El cartografiado genético del defecto responsable de la esclerosteosis en humanos localizó el gen responsable de este trastorno en la región del cromosoma 17 humano que codifica un miembro novedoso de la familia de la proteína de unión al TGF-beta. En la esclerosteosis, el

15 hueso esquelético presenta un incremento sustancial en la densidad mineral en relación con la de los individuos no afectados. El hueso de la cabeza también presenta un sobrecrecimiento. Los pacientes con esclerosteosis son

20 generalmente sanos aunque pueden mostrar grados variables de sindactilia al nacer y grados variables de compresión craneal y compresión nerviosa en el craneo.

El análisis de conexión del defecto del gen asociado con la esclerosteosis fue realizado aplicando el método

25 del cartografiado por homocigosidad a muestras de ADN recogidas de 24 familias de Afrikaner de Suráfrica en las cuales se producía la enfermedad. (Sheffield y col., 1994, Human Molecular Genetics 3:1331-1335. "Identification of a Badet-Biedl syndrome locus on

30 chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). La población Afrikaner de Suráfrica es generalmente homogénea; la población descende de un pequeño número de fundadores que colonizaron el área hace varios siglos, y ha estado

35 aislada por barreras geográficas y sociales desde su

fundación. La esclerosteosis es rara en todo el mundo fuera de la comunidad Afrikaaner, lo que sugiere que se encontraba presente una mutación en el gen en la población fundadora y ha aumentado de número junto con el crecimiento de la población. El uso del cartografiado de homocigosidad se basa en la suposición de que es probable que los marcadores del cartografiado del ADN adyacentes a una mutación recesiva sean homocigotos en los individuos afectados de familias consanguíneas y en poblaciones aisladas.

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

Las 24 familias con esclerosteosis fueron tipificadas con un total de 19 marcadores en la región D17S1299 (en 17q12-q21).

Los individuos afectados de cada familia demostraron ser homocigotos en esta región, y 25 de los 29 individuos eran homocigotos para un haplotipo central; cada uno tenía los mismos alelos entre D17S1787 y D17S930. Los

otros cuatro individuos tenían un cromosoma que se  
 emparejaba con este haplotipo y un segundo que no. En  
 suma, los datos sugerían de modo convincente que esta  
 región de 3 megabases contenía la mutación de la  
 5 esclerosteosis. El análisis de la secuencia de la mayor  
 parte de los exones de esta región de 3 megabases  
 identificaba una mutación terminadora en la secuencia  
 codificadora de la proteína de unión a TGF novedosa  
 (mutación C>T en la posición 117 del SEQ ID NO. 1 da como  
 10 resultado un codón de terminación). Se demostró que esta  
 mutación era única para los pacientes con esclerosteosis  
 y los portadores de los descendientes de Afrikaaner. La  
 identidad del gen fue confirmada adicionalmente  
 identificando una mutación en su intrón (mutación A>T en  
 15 la posición +3 del intrón) que da como resultado una  
 maduración del ARNm inapropiada en un paciente no  
 emparentado, individual con esclerosteosis diagnosticada.

#### EJEMPLO 2

20 ESPECIFICIDAD DE TEJIDOS DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA  
 PROTEINA DE UNION A TGF-BETA

A. Expresión del Gen Beer Humano mediante RT-PCR

Se preparó un ADNc de primera hebra a partir de las  
 siguientes muestras de ARN total utilizando un estuche  
 25 asequible comercialmente ("Superscript Preamplification  
 System for First Strand cDNA Synthesis", Life  
 Technologies, Rockville, MD): cerebro humano, hígado  
 humano, bazo humano, timo humano, placenta humana,  
 músculo esquelético humano, tiroides humano, pituitaria  
 30 humana, osteoblastos humanos (NH0st de Clonetics Corp.,  
 San Diego, CA), línea celular de osteosarcoma humano  
 (Saos-2, ATCC# HTB-85), hueso humano, médula ósea humana,  
 cartílago humano, hueso de mono Vervet, Saccharomyces  
 cerevisiae y monocitos de sangre periférica humana. Todas  
 35 las muestras de ARN fueron adquiridas de una fuente

comercial (Clontech, Palo Alto, CA), excepto las siguientes que fueron preparadas por la empresa: osteoblasto humano, línea celular de osteosarcoma humano, hueso humano, cartílago humano y hueso de mono Vervet. Estas muestras de ARN preparadas en la empresa fueron preparadas utilizando un estuche asequible comercialmente ("TRI Reagent", Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

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

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

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

El ADNc Beer de ratón completo (Secuencia de ID Núm: 11) fue clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en las direcciones antisentido y efectora utilizando el protocolo del fabricante. Los transcritos

efector y antisentido de ARNc marcado con S<sup>35</sup>-alfa-GTP fueron sintetizados utilizando reactivos de transcripción in vitro suministrados por Ambion, Inc. (Austin, TX). La hibridación in situ fue realizada según los protocolos de Lyons y col. (*J. Cell Biol.* 111:2427-2436, 1990).

La sonda de ARNc Beer de ratón detectaba un mensaje específico expresado en el tubo neural, los blastemas, los vasos sanguíneos y los cartílagos de osificación de los embriones de ratón en desarrollo. El Panel A de la Figura 3 muestra expresión en la cresta ectodérmica apical (aer en sus siglas en inglés) del blastema (l en sus siglas en inglés), los vasos sanguíneos (bv en sus siglas en inglés) y el tubo neural (nt en sus siglas en inglés). El panel B muestra la expresión en el 4° ventrículo del cerebro (4). El Panel C muestra la expresión en la mandíbula (ma), en las vértebras cervicales (cv), el hueso occipital (oc), el paladar (pa) y los vasos sanguíneos (bv). El panel D muestra la expresión en las costillas (r) y en la válvula del corazón (va). El panel A es una sección transversal de embrión de 10,5 dpc. El panel B es una sección sagital de embrión de 12,5 dpc y los paneles C y D son secciones sagitales de embriones de 15,5 dpc.

Ba= arco branquial, h=corazón, te=telencéfalo (prosencefalo), b=cerebro, f=masa frontal, g=intestino, j=mandíbula, li=hígado, lu=pulmón, ot=vesícula ótica, ao=, sc=médula espinal, skm=músculo esquelético, na=seno nasal, th=timo, to=lengua, fl=miembro anterior, di=diafragma.

### EJEMPLO 3

#### EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINA BEER RECOMBINANTE

##### A. Expresión en células COS-1:

La secuencia de ADN que codifica la proteína Beer humana completa fue amplificada utilizando los siguientes



cebadores oligonucleotídicos para PCR. El cebador oligonucleotídico 5' tenía la secuencia 5'-**AAGCTT**GGTACCATGCAGCTCCAC-3' (SEC ID NO: 23) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de 19 nucleótidos del gen *Beer* empezando 6 pares de bases antes del presunto codón de iniciación amino terminal (ATG). El cebador oligonucleotídico 3' tenía la secuencia 5'-**AAGCTT**CTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-3' (SEC ID NO: 24) y contenía un sitio para la enzima de restricción HindIII (en negrita) seguido de un codón de terminación complementario inverso (CTA) seguido del complemento inverso del epítipo FALG (subrayado, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) flanqueado por el complemento inverso de nucleótidos que codifican los 5 aminoácidos carboxi terminales de Beer. El producto de la PCR fue clonado con TA ("Original TA Cloning Kit", Invitrogen, Carlsbad, CA) y los clones individuales fueron rastreados mediante secuenciación del ADN. Un clon de secuencia verificada fue digerido después por HindIII y purificado sobre gel de agarosa al 1,5% utilizando reactivos asequibles comercialmente ("Qiaquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Valencia, CA). Este fragmento fue ligado después al plásmido pcDNA3.1 tratado con fosfatasa, digerido con HindIII y cultivado en placa sobre placas LB con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias que portaban el recombinante deseado en la orientación apropiada fueron identificados mediante rastreo basado en PCR, utilizando un cebador 5' correspondiente al sitio promotor/cebador de T7 en pcDNA3.1 y un cebador 3' con la secuencia 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 25) que corresponde al complemento inverso de la secuencia BEER interna. La secuencia del fragmento clonado fue confirmada mediante secuenciación del ADN.

Se utilizaron células COS-1 (ATCC #CRL-1650) para la transfección. Se transfectaron 50 µg del plásmido de

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

#### B. Expresión en células de insecto SF9

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

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

Cebador antisentido: 5'-GTCGTCAAGCTTCTACTTGTTCATCGTCCTTGT-AGTCTAGGCGTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEC ID NO: 27)

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

Los baculovirus recombinantes que expresaban la proteína Beer fueron elaborados utilizando el estuche de

transfección Ba-N-blue (Invitrogen) y purificados según las instrucciones de los fabricantes.

Las células SF9 (Invitrogen) fueron mantenidas en medio TNM\_FH (Invitrogen) conteniendo suero de ternera fetal al 10%/0. Para la expresión de la proteína, los cultivos de SF9 en matraces con extensor de centrifugación ("Spinner") a una MOI de más de 10. Las muestras de los medios y de las células fueron tomadas diariamente durante cinco días, y la expresión de Beer fue controlada mediante transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma) o antisuero policlonal de conejo anti-Beer.

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

#### EJEMPLO 4

PREPARACION Y ENSAYO DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA  
BEER, GREMLIN, Y DAN

## A. Preparación de antígeno

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

5

Beer H

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

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

10

Gremlin H.

Efector: 5'-GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEC ID NO: 30)

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

15

Dan H.

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

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

20

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

25

30

Sepharose) fueron realizadas como describen los fabricantes (Qiagen, The QIAexpressionist).

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

#### B. Producción y ensayo de anticuerpos policlonales

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

El antisuero de conejo y la fracción IgY de huevo de pollo fueron rastreados en cuanto a la actividad vía transferencia Western. Cada uno de los tres antígenos fue separado mediante PAGE y transferido a nitrocelulosa de 0,45 µm (Novex, San Diego, CA). La membrana fue cortada en tiras conteniendo cada tira aproximadamente 75 ng de antígeno. Las tiras fueron bloqueadas en Blottig Grade Block al 3% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y lavadas 3 veces en 1X solución salina tamponada con Tris (TBS)/tampón Tween al 0,02%. El anticuerpo primario (tomas de sangre pre-inmunización, antisuero de conejo o IgY de huevo de pollo en diluciones que oscilaban de 1:100 a 1:10.000 en tampón de bloqueo) fue incubado con las tiras durante una hora con un balanceo suave. Una

segunda serie de tres lavados 1X TBS/TWEEN al 0,02% estuvo seguida de una incubación de una hora con el anticuerpo secundario (anti-conejo de burro conjugado con peroxidasa, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; o anti-polli de burro conjugado con peroxidasa, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se realizó un ciclo final de 3X lavados de 1X TBS/TWEEN al 0,02% y las tiras fueron desarrolladas con Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

C. Ensayo de reactividad cruzada con anticuerpo:

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

EJEMPLO 5

INTERACCION DE BEER CON PROTEINAS DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA

La interacción de Beer con las proteínas de diferentes ramas filogenéticas de la súper-familia del TGF- $\beta$  fue estudiada utilizando métodos de inmunoprecipitación. Se obtuvieron TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2, TGF $\beta$ -

3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y GDNF a partir de fuentes comerciales (R & D systems; Minneapolis, MN). Un protocolo representativo es el siguiente. Se sometió a diálisis Beer parcialmente purificada en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 25 mM 7,5, NaCl 150 mM). Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas en 300  $\mu$ l de tampón IP (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,4 mM, triton X-100 al 0,5%, y glicerol al 10%). Se aplicaron 30 ng de proteína BMP-5 humana recombinante (R & D systems) a 15  $\mu$ l de matriz de afinidad FLAG (Sigma, St. Louis MO)) en presencia y ausencia de 500 ng de Beer marcada con el epítipo FLAG. Las proteínas fueron incubadas durante 4 horas @ 4°C y después las proteínas asociadas con la matriz de afinidad fueron lavadas cinco veces en tampón IP (1 ml por lavado). Las proteínas unidas se hicieron eluir de la matriz de afinidad en 60 microlitros de 1X tampón de muestra SDS PAGE. La proteínas fueron resueltas mediante SDS PAGE y la Beer asociada con BMP-5 fue detectada mediante transferencia Western utilizando antisuero anti-BMP-5 (Research Diagnostics, Inc.) (ver la Figura 5).

#### Análisis de Unión al Ligando BEER

La proteína FLAG-Beer (20 ng) es añadida a 100  $\mu$ l de PBS/BSA al 0,2% y adsorbida en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma; St Louis MO) y bloqueada con BSA en PBS al 10%. Esto se realiza a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Esta solución de proteína se separa y los pocillos se lavan para separar la proteína no unida. Se añade BMP-5 a cada pocillo a concentraciones que oscilan de 10 pM a 500 nM en PBS/BSA al 0,2% y se incuba durante 2 horas a la temperatura ambiente. La solución de unión se separa y la placa se lava tres veces con volúmenes de 200  $\mu$ l de PBS/BSA al

0,2%. Los niveles e BMP-5 son detectados utilizando anti-suero BMP-5 vía ELISA (F.M. Ausubel y col. (1998) Current Protocols in Mol. Biol. Vol. 2 11.2.1-11.2.22). La unión específica se calcula sustrayendo la unión no específica de la unión total y se analiza mediante el programa LIGAND (Munson y Podbard, Anal. Biochem., 107, pág. 220-239, (1980)).

En una variación de este método, se diseña Beer y se expresa como una proteína de fusión con Fc human. Del mismo modo el BMP ligando se diseña y se expresa como una fusión con Fc de ratón. Estas proteínas son incubadas juntas y el análisis es realizado como describe Mellor y col. utilizando la detección de fluorescencia de resolución con el tiempo (G.W. Mellor y col., *J. of Biomol Screening*, 3(2) 91-99, 1998).

#### EJEMPLO 6

ANALISIS DE RASTREO PARA LA INHIBICION DE LA UNION DE LA PROTEINA DE UNION A TGF-BETA A MIEMBROS DE LA FAMILIA DEL TGF-BETA

El análisis descrito antes se repite con dos excepciones. Primero, la concentración de BMP se mantiene fija a la Kd determinada previamente. Segundo, se añade una colección de candidatos antagonistas a una concentración fijada (20  $\mu\text{M}$  en el caso de las colecciones de moléculas orgánicas pequeñas y 1  $\mu\text{M}$  en estudios con anticuerpo). Entre estas moléculas candidato (antagonistas) de la unión a la proteína de unión de TGF-beta se incluyen compuestos orgánicos derivados de colecciones comerciales o internas que representan diversas estructuras químicas. Estos compuestos son preparados en forma de soluciones de partida en DMSO y son añadidas a pocillos de análisis a  $\leq 1\%$  del volumen final en condiciones de análisis normalizadas. Estas son incubadas durante 2 horas a la temperatura ambiente con



BMP y Beer, la solución es separada y el BMP unido es cuantificado como se ha descrito. Los agentes que inhiben el 40% de la unión a BMP observada en ausencia de compuesto o anticuerpo son considerados antagonistas de esta interacción. Estos son evaluados adicionalmente como inhibidores potenciales basándose en estudios de titulación para determinar sus constantes d inhibición y su influencia sobre la afinidad de unión de la proteína de unión a TGF-beta. Asimismo se pueden llevar a cabo análisis de control de la especificidad comparables para establecer el perfil de selectividad para el antagonista identificado a través de estudios en los que se utilizan análisis dependientes de la acción del ligando BMP (v.g., estudio de competición BMP/receptor de BMP).

#### EJEMPLO 7

##### INHIBICION DE LA LOCALIZACION DE LA PROTEINA DE UNION A TGF-BETA A LA MATRIZ DEL HUESO

La evaluación de la inhibición de la localización en la matriz del hueso (hidroxiapatita) se realiza utilizando modificaciones del método de Nicolas (Nicolas, V. Calcif Tissue Int. 57:206, 1995). Brevemente, la proteína de unión a TGF-beta marcada con I<sup>125</sup> es preparada como describe Nicolas (supra). La hidroxiapatita es añadida a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos equipada con una membrana de filtración de polipropileno (Polyfiltronic, Weymouth MA). La proteína de unión a TGF-beta es añadida a albúmina al 0,2% en tampón PBS. Los pocillos que contienen la matriz son lavados 3 veces con este tampón. La proteína de unión a TGF-beta adsorbida se hace eluir utilizando NaOH 0,3M y se cuantifica.

La identificación del inhibidor se lleva a cabo por medio de la incubación de la proteína de unión a TGF-beta con moléculas de ensayo y aplicando la mezcla a la matriz

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

#### EJEMPLO 8

##### CONSTRUCCION DE MUTANTES DE LA PROTEINA DE UNION A TGF-BETA

###### A. Mutagénesis

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

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

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

#### EJEMPLO 9

##### MODELOS ANIMALES-I

#### 10 GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS QUE SOBREENPRESAN EL GEN *BEER*

El clon BAC de ~200 kilobases (kb) 15G5, aislado de la genoteca de ADN genómico de ratón CTIB (distribuido por Research Genetics, Huntsville, AL) fue utilizado para determinar la secuencia completa del gen Beer de ratón y sus regiones limítrofes 5' y 3'. Un fragmento SalI de 41 kb, conteniendo el cuerpo del gen completo, más ~17 kb de la secuencia limítrofe 5' y ~20 kb de la secuencia limítrofe 3' fue subclonado en el sitio BamHI del vector cosmídico SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, CA) y propagado en la cepa DH101B de *E. coli*. De este constructo cosmídico, un fragmento de restricción MluI-AvIII de 35 kb (Secuencia Núm. 6), incluyendo el gen Beer de ratón completo, así como la secuencia limítrofe de 17 kb y de 14 kb 5' y 3', respectivamente, fue purificado después en gel, utilizando medios convencionales, y utilizado para la microinyección en cigotos de ratón (DNX Transgenics; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.191). Los animales fundadores en los que el fragmento de ADN clonado había sido integrado al azar en el genoma fueron obtenidos a una frecuencia del 5-30% de las crías que nacen vivas. La presencia del transgen fue determinada realizando el análisis de transferencia Southern del ADN genómico extraído de una pequeña cantidad de tejido de ratón, tal como la punta de una

cola. El ADN fue extraído utilizando el siguiente protocolo: el tejido fue digerido durante la noche a 55°C en tampón de lisis conteniendo NaCl 200 mM, Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS al 0,2% y 0,5 mg/ml de Proteinasa K. Al día siguiente, el ADN fue extraído una vez con fenol/cloroformo (50:50), una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y precipitado con etanol. Tras la re-suspensión en TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1,5 mM), 8-10 µg de cada muestra de ADN fueron digeridos con una endonucleasa de restricción, tal como EcoRI, sometidos a electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nailon cargada, tal como HybondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL). El filtro resultante fue hibridado después con un fragmento marcado radiactivamente de ADN derivado del locus del gen *Beer* de ratón, y susceptible de reconocer tanto un fragmento del locus del gen endógeno como un fragmento de un tamaño diferente derivado del transgen. Los animales fundadores fueron criados hasta ratones no transgénicos normales para generar un número suficiente de progenie transgénica y no transgénica en la cual determinar los efectos de la sobre-expresión del gen *Beer*. Para estos estudios, animales de diversas edades (por ejemplo, 1, día, 3 semanas, 6 semanas, 4 meses) son sometidos a numerosos análisis diferentes diseñados para averiguar la formación esquelética grosera, la densidad mineral del hueso, el contenido mineral del hueso, la actividad de osteoclastos y osteoblastos, el grado de osificación endocondral, la formación de cartílago, etc. La actividad transcripcional del transgen puede ser determinada extrayendo el ARN de diversos tejidos, y utilizando un análisis de RT-PCR que obtenga ventaja de los polimorfismos de nucleótidos individuales entre la cepa de ratón de la cual deriva el transgen (129Sv/J) y la cepa de ratones utilizada para la microinyección de ADN [(C57BL5/J x SJL/J)F2].

MODELOS ANIMALES II

## DESORGANIZACION DEL GEN BEER DE RATON MEDIANTE

## RECOMBINACION HOMOLOGA

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

El vector redireccionado fue construido clonando primero la casete del gen *resistente a la neomicina* (*neo*) dirigido por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) seleccionable por fármaco de pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) en el vector de clonación pSP72 (Promega, Madison, WI). Se utilizó la PCR para flanquear la casete PGKneo con sitios P1 loxP de bacteriófago, que son los sitios de reconocimiento para la recombinasa P1 Cre (Hoess y col., PNAS USA, 79:3398,1982). Esto permite la posterior eliminación del marcador de resistencia a neo en las células ES redireccionadas en animales derivados con células ES (Patente de los Estados Unidos 4.959.317). Los cebadores de la PCR estaban comprendidos por una secuencia de 34 nucleótidos (ntd) loxP, 15-25 ntd complementarios a los extremos 5' y 3' de la casete PGKneo, así como sitios para el reconocimiento por la enzima de restricción (BamHI en el cebador efector y EcoRI en el cebador anti-sentido) para la clonación en pSP72. La secuencia del cebador efector era

5'-AATCTGGATCCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGA  
TTCGAGGGGGCCCCT-3' (SEC ID NO: 34); la secuencia del  
cebador anti-sentido era 5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAAA  
TAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAG TCAGCTTCTGA-  
3' (SEC ID NO: 35).

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

El "brazo largo" del locus del gen Beer fue generado  
amplificando un fragmento de 6,1 kb del clon BAC 15G5 con  
cebadores que también introducían los sitios para las

enzimas de restricción de corte poco común ("rare-cutting") SgrAI, FseI, AscI y PacI. Específicamente, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACCACCGGTGACACCC GCTTCCTGACAG-3' (SEC ID NO: 38); la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACTTAATTAAACATGGCGCGCCATATGGCC GGGCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEC ID NO: 39). El producto de la PCR resultante fue clonado en el vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) como una etapa intermedia.

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

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

EJEMPLO 10

## INACTIVACION DE BEER MEDIADA POR ANTISENTIDO

Se preparan oligonucleótidos antisentido de 17 nucleótidos en un formato solapante, de tal manera que el extremo 5' del primer oligonucleótido se solape con el AUG de inicio de la traducción del transcrito Beer, y los extremos 5' de los sucesivos oligonucleótidos se produzcan en incrementos de 5 nucleótidos moviéndose en dirección 5' (hasta 50 nucleótidos más allá), en relación con el AUG de Beer. Se diseñan los correspondientes oligonucleótidos de control y se preparan utilizando composiciones de bases equivalentes pero redistribuidas en la secuencia para inhibir cualquier hibridación significativa para el ARNm codificador. La liberación del reactivo para el sistema de ensayo celular se lleva a cabo a través de un reparto de lípidos catiónicos (P.L. Felgner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987). Se añaden 2 µg de oligonucleótido antisentido a 100 µl de medio con el suero reducido (medio con suero reducido Opti-MEM 1; Life Technologies Gaithersburg MD) y este se mezcla con reactivo Lipofectin (6 µl) (Life Technologies, Gaithersburg MD) en los 100 µl de medio con suero reducido. Estos se mezclan, se permite que formen complejos durante 30 minutos a la temperatura ambiente y la mezcla se añade a células MC3T3E21 o KS483 sembradas previamente. Estas células se cultivan y el ARNm se recupera. El ARNm de Beer se controla utilizando RT-PCR junto con cebadores específicos de Beer. Además, se recogen los pocillos experimentales separados y los niveles de proteína se caracterizan por medio de métodos de transferencia western descritos en el Ejemplo 4. Las células son cosechadas, resuspendidas en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS al 1%) y la proteína soluble se recoge. Este material se aplica a SDS PAGE en un gradiente desnaturalizante al 10=20). Las



5 proteínas separadas son transferidas a nitrocelulosa y la  
transferencia western es realizada como antes utilizando  
los reactivos anticuerpo descritos. Paralelamente, se  
añaden los oligonucleótidos de control a cultivos  
10 idénticos y se repiten las condiciones experimentales. El  
descenso en los niveles de ARNm o proteína Beer se  
considera significativo si el tratamiento con el  
oligonucleótido antisentido da como resultado un cambio  
del 50% en cualquier caso comparado con el  
15 oligonucleótido con las mismas bases orientadas de manera  
azarosa ("scrambled") de control. Esta metodología  
permite la inactivación selectiva del gen y la posterior  
caracterización del fenotipo de los nódulos mineralizados  
en el modelo de cultivo de tejidos.

## SECUENCIAS

SEQ ID NO. 1: ADNc de BEER Humano (región codificadora completa más UTR 5' y 3')

5

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTUCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCC  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCAGCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCCGAGCTGCATTCAACCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCCGTGGCGCAGCGCCAGCCGGTCAACGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGCGCCCGGCGCGCCTGCTGCCAACGC  
 CATGGGCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGCGACTTCCGCTGCATCCCGAGCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCGGTGGTGGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGTTGGCCTGCTGCAAGTGCAAGCGCTCACC  
 CGCTTCCACAAACAGTCCGAGCTCAAGGACTTCCGGACCGAGGCGCGCTCGGCGCGCAAGGGCGGGAAGCGCGCGCGCG  
 CGCGCGGAGCGGCAAGCCAACCAAGCGGAGCTGGAGAACGCTACTAGAGCGCGCGCGCGCGCTCCCCACCGCGGGC  
 GCGCGGCGCGCTGACCG  
 AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCGCTGAGGAATCCCGGGCGCGCGCAAGGCGCGCGCTCAGCGCGCGAGCTG  
 AGGGGTCCACCGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCAACAGACACTGAGCCACGCGCGCGCGCGCTCTGGGGCGCGCTACCT  
 TTGCTGGTCCCCTTCCAGAGGAGCGAATGGAAGCATTTTACCAGCGCTGGGTTTTAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGCTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACTCGCTGCCCATCAGAAAGCTGAGGCGTGC  
 CCAGAGCACAAGACTGGGGGCACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAAGTGTGTGTAACTTGAAC  
 TACACAATTCTCCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGCTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCGAGGTTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGATGAATG  
 CAGTTGCATTGATTCAAGTCCAAAGTCACTTCCAGAATTGAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA  
 CAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAGCTATGCTG  
 CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCAAGTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTTTAAGTCACTTCCGAAGAGAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCGAGCCCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCACTCACGGACACATTTCTGCCT  
 AGAAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTGAAGAAATCATTTCCAGACACCTC  
 TTAATTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAAAGTTTTTAACAGAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTGTTTTTTTGGCAATTCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAGTAGTGGTTTTTAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTGTAGAGAAAGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA  
 CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAAATGAATCATGACCGAAAG

**SEQ ID NO. 2: Proteína BEER Humana (secuencia completa)**

MQLELALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEIIFELGEYEEFELENKMTMNAENGGRIFHHFFETKDVSEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAPVTELVCSSQCGFARLLFNAIGRGKWWRESGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGEAEFRAREVR  
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

**SEQ ID NO. 3: Proteína BEER Humana conteniendo mutación  
terminadora de Esclerosteosis**

5

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGGTACCAATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTCTSC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTSTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCC  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAAACACAAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCAACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTACCCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCGTGTCCGCGAGCGCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGCGCCGGCGCGCCTGTGCCCCAACGC  
 CATCGGCCGGCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGAAGCGCCGCGCGCGCAAGGTGGCGCTGGTGGCCTGCTGCAAGTGCAAGCGCCTCACC  
 CGCTTCCACAAACAGTGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGCGCTCGGCCGAGAAAGGGCCGGAAGCCGGCGCCCG  
 CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAAACAGSCCGAGCTGGAGAACGCTACTAGAGCCCGCCCGGSCCCCTCCCCACCGSCGGGC  
 GCCCGGCCCTGAACCGCGCGCCCAATTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAATGCCTGC  
 AACCAGGGCGAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCAGCTG  
 AGGGTCCACGCGGCGAGGGGAGGGAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACGAGCCCGCCTCTGGGGCGCGCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTTTAAGGAGCGGTGTGGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC  
 CCAGAGCACAAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAATTGCTGTGTAACTTTGAAC  
 TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATG  
 CAGTTGCATTGATTGAGTGCCAAAGGTCACTTCCAGAATTGAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAATA  
 CAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCACAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACCTTCCGAAGAGAAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTTCTGCCCACTCAGGACACATTTCTGCCT  
 AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTGAAGAAATCATTTCCAGACAACCTC

TTACTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAAAAAAGTTTTTAAACAGGAGCAGATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
GGTCGTTTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA  
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACATGPAATCATGACCGAALG

**SEQ ID NO. 4: Proteína BEER Humana Truncada de Esclerosteosis**

5 MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEG\*

**SEQ ID NO. 5: ADNc de BEER Humano que codifica la Variante de la Proteína (V10I)**

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGSGTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCATCTGC  
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCG  
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACAACAAGACCATGAACCGGGGGGAGAACGGAGGGCGGC  
CTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCATTCACCCGCTACGTGACCGAT  
GGGCCGTGCCGAGCGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGCGCAGTGGCGCCCGGGCGCGCTGCTGCCCAAGGC  
CATCGGCCCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGCACTTCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGCGTGC  
AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGAAGCGCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACC  
CGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGCTCGGCCGAGAAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCGG  
CGCCCGGAGCGCCAAGGCCAACAGGCGGAGCTGGAGAACGCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCAACCGCGCGGC  
GCCCCGGCCCTGAACCCGCGGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGCTGTG  
AACCCAGGSCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCAGCTG  
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTACAGACACTGAGCCACGCAAGCCCGCCTCTGGGGCGCCCTACCT  
TTGCTGGTCCCACCTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG  
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC  
CCAGAGCACAAASACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAAGTTGCTGTGTAACTTGAAC  
TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG  
CAGTTGCATTGATTAGTGGCAAGGTCACTTCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA  
CAAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTG  
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCATTTGGGGTAGA  
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCCG  
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACCTTCCGAAGAGAAGTGAAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCGAGGGAGC

AGCCATCACAACTCAGAGCCAGCACATCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCCACTCAGGGACACATTTGTGCCT  
 AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAATCTTTTGGAAATCATTTCAGACACCTC  
 TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAABAAAAAAGTTTTAAACAGAAACACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GSTCGTTTTTTTGGCAATTCTTCCAGTGGGACTTGTCACAGAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAGTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA  
 CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAGACAATGAATCATGACCGAAG  
 MQFLALCLICLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETI IRELGEYFEFELENNKTMNRAENGGRFPHFETKDVSEYSC  
 RELHTRYVTDGECRAKEVTELVCSGQCGEARLLENAIGRGKWWRESGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGEAFRARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARFQKGRKFRERARSANQAELENAY

5 **SEQ ID NO. 7: ADNc Beer Humano que codifica la Proteína Variante (P38R)**

AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC  
 CTGCTGGTACACACAGCCTTCCTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTACCCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCCGTGCCCGAGCGCCAGCCGGTCAACGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGGGCCGGCGCGCTGCTGCCCCACGC  
 CATCGGCCGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCCGTGGTGAGGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCCCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACC  
 CGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGCGCTCGGCCGAGAAAGGCCGGAAGCCGCGCCCCG  
 CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAACCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGCCCGCGCCCTCCCCACCGCGGGC  
 GCCCCGGCCCTGAACCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGATTGTTTATATTTTCATTGTAAATGCCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG  
 AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCCTCTGGGGCCGCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTACCAGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC  
 CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTTGCTGTGTAACTTGAAC  
 TACACAATTCTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG

- 118 -

CAGTTGCATTGATTTCAGTGCCAAAGTCACTTCCAGGATTTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA  
 CAAACAGAAAAAAGTAAAGTCTATTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCTGGAGAAGCTATGCTG  
 CTTCACAGCCTGGCTTCCCGGATSTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA  
 AAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG  
 ACCCTAGCCATSTTTTAAAGTCACTTCCGAAGAGAAGTGAAAGGTTCAAGSACACTGGCCTTGAGGGCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAAATCACAGACCAGCAGATCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCACTCAGGGACACATTTCTGCCT  
 AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAACTGCCAGCATAATAGCTGCCACCCAAATCTTTTGAATATCATTTCCAGACACCTC  
 TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTSTTAAAAAAGSTTTTAAACAGAGGCACATGACATATGAAGCCTGCAGGACT  
 GGTGTTTTTTGGCAATTCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAGAATGAAGTAGTGGTTTTTAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTTGTAGAGATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAATTAA  
 CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

#### SEQ ID NO. 8: Variante de la Proteína BEER Humana (P38R)

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEIIRELGEYEEFFFELENNKTMNRAENGGRFEHHEFETHDVSEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAKEVTELVCSGQCGEARLLFNAIGRKKWWRESGFEDRCIFDRYRAQRVQLLCFEGGEAERARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEPARFQKGRKERFRARSANQAELENAY

5

#### SEQ ID NO. 9: ADNc de BEER de Vervet (región codificadora completa)

ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGCCTGCTGGTACACGCAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCA  
 GGCTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACAACA  
 AGACCATGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC  
 CGAGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGATGGGCCGTGCCGACGCGCAAGCCAGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGG  
 CCAGTGGCGCCCGGCACGCCTGCTGCCCAACGCCATCGGCCGCGGCAAGTGGTGGCGCCGAGTGGGCCCCGACTTCCGCT  
 GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAAGCGTGTGCAGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGGCGCGCGCGCGCGCAAGGTGGCG  
 CTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCAGGGCCG  
 TCGGCCGCAAGAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCGCGCCCGGGGGGCCAAAGCCAATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACT  
 AG

10

#### SEQ ID NO. 10: Proteína BEER de Vervet (secuencia codificadora completa)

MQLFLALCLVCLLVHAAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIIEELGEYFEFFEELENNKTMNRAENGGRFEHHFETKDVSEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAPFVTELVSGQCGFARLLFNAIGRGKWWRFSGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAFRARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGEAAREFQKGRKPRERARGAKANQAELENAY

**SEQ ID NO. 11: ADNc de BEER de Ratón (región codificadora completa)**

5

ATGCAGCCCTCACTAGCCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACGCTGCCTTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGGTGSCA  
 AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCATCCAGGGCTTGGAGAGTAACCCGAGCCTCCTCCTGAGAACACACAGACCA  
 TGAACCGGGCGGAGATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAGGTGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAG  
 CTGCACTACACCCGCTTCCTGACGAGCGGCCATGCCGACGSCCAAGCGGTACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTG  
 CGGCCCGCGCGGCTGCTGCCAAGCCATCGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAAGGACCGGATTTCCGCTGCATCC  
 CGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGCGCGCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTG  
 GCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGAGACCGCGCGGC  
 GCAGAAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGGCGCCCGGGAGCCAAAGCCAAACAGGCGGAGCTGGAGAAGCCCTACTAGAG

**SEQ ID NO. 12: Proteína BEER de Ratón (secuencia completa)**

10

MQESLAECILICLLVHAFAFAVEGQGWQAFRNDATETIIEGLGEYFEFFEEFNQTMNRAENGGRFEHHEYDAKDVSEYSCRE  
 LHYTRFLTLDGFCRSAPFVTELVCSGQCGFARLLFNAIGRVKWWRFNGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAFRSRKVRV  
 ASCKCKRLTRFHNQSELKDFGEFETAREFQKGRKPRERARGAKANQAELENAY

**SEQ ID NO. 13: ADNc de BEER de Rata (región codificadora completa más UTR 5')**

15

GAGGACCGAGTGCCCTTCTCCTTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCCCTTGCCTTGCCTGCCTGCTTGTACATGCA  
 GCCTTCGTTGCTGTGGAGAGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAAGAATGATGCCACAGAAATCATCCCGGGACTCAGAGAGTA  
 CCCAGAGCCTCCTCAGGAAGTACAGAGAACACACAGACCATGACCGGGCGGAGAACGGAGGCAGACCCCCCACCATCCTT  
 ATGACACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCGTGACCGACGCGCCGCTGCCGCAGT  
 GCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCGGGCCAGTGCGGCCCGCGCGGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCGTGA  
 GTGGTGGCGCCCGAAGGACCCGACTTCCGCTGCATCCCGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCG  
 GCGGCGCGGCGCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAAG

TCGGAGCTCAAGGACTTCGGACCTGAGACCGCGCGCGCAGAGGGTCGCAAGCCGCGGCCCGCGCCCGGGGAAGCA  
AGCCAACCAGGCGGAGCTGGAGAAGCGCTACTAG

#### SEQ ID NO. 14: Proteína BEER de Rata (secuencia completa)

MQLSLAFCLACLLVHAAPVAVESQGWQAFKNDATETIEGLREYEEFFQELNNQTMIRAEENGGRFFHHEYDTKDYSEYFV  
RELHYTRFVTDGECKSAKEVTELVCSGQCGEARKLLFNAIGRVKWWRENGEDERCIEDRYRAQRVQLLCFGGAERERVA  
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGEETARFQGRKFRERARGAKAIQAELENAY

5

#### SEQ ID NO. 15: ADNc de BEER Bovina (región codificadora parcial)

AGATGATAGCAGACAAATCATCCCCGAGCTGGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAACAGACCATGAAC  
CGAGTACATAAGGACGAGAGACCTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAGACGCCTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCA  
CTTCAACCCCTACGTGACCGATGGGCGGTGCCGACGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGCGGCC  
CGAGTACCCCTGCTGCCCCAAGCCATCGGCGCGCGCAAGTGGTGGCGCCCCAAGCGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCGAC  
CTCTACCGCGGCGAGCGGGTGCAGCTGTTGTCTCTGGCGGCGCGCGCGCGCGCGCAAGGTSCGCTGGTGGCTC  
GTWTAAGTCTAAGCCCTCACTCGCTTCCACACCCAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCCCGAGGCCCGCGCGGCCCAA  
CGGCGCGGAAAGCTCGGGCCCCCGCGCCCGGGGCACCAAGCCAGCGGGGCCA

10

#### SEQ ID NO. 16: Proteína BEER Bovina (secuencia parcial -- secuencia señal perdida y últimos 6 restos)

NDATETIEFELSEYEEFELNNKTMNRAENGGRFFHHFFETKDASEYSCRELHFTRYVTDGECKSAKEVTELVCSGQCGE  
ARKLLFNAIGRVKWWRENGEDERCIEDRYRAQRVQLLCFGGAERARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPEARFQT  
GRKLREERARGTKASKA

15

#### SEQ ID NO. 17: Fragmento de Restricción MliI-AvIII utilizado para elaborar transgen de Beer de ratón

CGCGTTTTGGTGAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTTGGCGTTGAGATTGATACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC

20



GACCGAGCTGGACCGCGCATTCGTGACACCGTCTCCTTGGAACTTATTGGCAATGGAGTGTCAATCATCAAGGACNGCC  
TGATCGCAAATGGTGTATCCACGCAGCGGCATCGAAAACCCCTCAGCCGCTGACCAATATCTACAAATCAGCCCTTGGT  
ATCCTGCSTGATGAGCCAGCGCAGAACAGGTAACCGTCAGTGGCGATAAGTTCAAAGTTAACCCTGGTGTGTATACCAA  
CATTGAAACGTTGATCGAAAACGCGCTGAAAACGCTGCTGAATGTGGCGCGCTGGATGTCAAAAGCAATGGCAGCAG  
ACAAGAAAGCGATGGATGAACTGGCTTCTATGTCCGCACGGCCATCATGATGGAATGTTTCCCGGTGGTGTATCTGG  
CAGCAGTGGCGTCGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCATTTGGGGGTCTTTCCGGGTGATCCGCTTGTACGGGGC  
GGCGACCTCGCGGGTTTTTCGCTATTTATGAAAATTTTCCGGTTTAAGGCTTTCCGTTCTTCTTCTGCATACTTAATGT  
TTTTATTAAATACCCCTCTGAAAAGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTGGCCCTCTGTCTTCTCTTC  
TCTGTTTTTGTCCGTGGATGAAATGGAAGTCAACAAAPAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTCAACATGAGAAT  
TCGCGGGCGCATAATACGACTCACTATAGGGATCGAGCCCTACTCCCGCGCATGAAGGGGAGGAGCTGGACTCCGCATG  
CCGAGAGACGCCCCCAACCCCCAAGTGCCTGACCTCAGCCTCTACCGCTCTGGCTTGGGCTTGGGCGGGGTCAAGGC  
TACCACGTTCTCTTAACAGGTGGCTGGGCTGTCTCTTGGCGCGCGTCTATGTGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTC  
ACCGTGGATGTCTGCCTTCGTTGCCATGGCAACGGGATGACGTTACATATGGGTGTGGAGCTTTTCTGTCCGTGTCA  
GGAAATCCAAATACCCATAAATACCCTAGAAGAGGAAGTAGCTGAGCCAAAGCTTTCTGGCTTCTCCAGATAAAGTTTG  
ACTTAGATGGAAAAAACAAPATGATAAAGACCCGAGCCCTCTGAAAATTCCTCCTAATTGCACCACTAGGAATGTGTA  
TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTTATTTTAAAAAGAAAACCTTTAGTCATGTTATTAATAAGAAATTTCTCAGCAGTGGGA  
GAGAACCATATTAAACCAAGATAAAAGTTGGCATGATCCACATTGCAGGAAGATCCACGTTGGGTTTTCTGAATGTG  
AAGACCCCATTTATTAAAGTCTTAAGCTCTGTTTTTGCACACTAGGAAGCGATGGCCGGGATGGCTGAGGGGCTGAAGG  
ATCTTTCAATGTCTTACATGTGTGTTTCTGTCTGCACCTAGGACCTGCTGCTAGCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT  
TCACATGATTAGTCTCAGACACTTGGGGGCAGGTTGCATGTAAGTGCATCGCTTATTTCCATACGGAGCACCTACTATGTG  
TCAAACACCATATGTTGTTCACTCTTCAGAACGGTGGTGGTGCATGTTGTCATTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA  
GAGCTGAGATATATGGACGCACTCTTCAGCATTCGTGCAACGTTGGCTGTGCATTCTGCTCCTGAGCAAGTGGCTAAACA  
GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTAGGGAACCTCTCCAGTCTCCCTACCTCACTATCCA  
AGAAGCCAGGGGGCTTGGCGGTCTCAGGAGCCTGCTTGTGGGGGACAGGTTGTTGAGTTTTATCTGCAGTAGGTTGCCT  
AGGCATAGTGTGAGGACTGATGGCTGCCTTGGAGAACACATCCTTTGCCCTCTATGCAAATCTGACCTTGACATGGGGC  
GCTGCTCAGCTGGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAAGCTTAAAGCTTCTTGTCCACCTGAAACTCTGGACCAAG  
GGGCTTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGTGAGCTGCATTTCCAATCTCAGGGCGTGAGAGGCAGA  
GGGAGTGGGGGAGAGCCTTGACGCTCTTCCCTCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCCATATGAGCACAGGC  
ACATCCCCACCCACCCCACTTTCTCTGTCTGCAATTTAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGTCC  
TATCTCTCTTAGGTAGACAGGACTCTGCAGSAGACACTGCTTTGTAAGATACTGCAGTTTAAATTTGGATGTTGTGAGG  
GGAAAGCGAAGGGCCTCTTTGACCATTCACTCAAGGTACCTTCTAACTCCCATCGTATTGGGGGGCTACTCTAGTGCTAG  
ACATTGCAGAGAGCCTCAGAACTGTAGTTACCAGTGTGGTGGGATTGATCCTTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA  
TTCTTCACCCAGTCACCGAACATTTATTCAGTACCTACCCCGTAACAGGCACCGTAGCAGGTACTGAGGGACGGACCACT  
CAAAGAACTGACAGACCGAAGCCTTGGAAATATAACACCAAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTTAACACTCA  
GGCCCTTTAACACTCAGGACCCCCACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTTACAGAGAGGAAAACTA  
GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGCTTAAGCTTGTCTGCATGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTCCA

ACTCTAGGGTCTATTTTCTTTTTCTCGTTGTTTGAATCTGGGTCTTACTGGGTAACTCAGGGCTAGCCTCAGACTCAT  
ATCCTTCTCCCATGGCTTACGAGTGCTAGGATTCCAGGTGTGTGCTAGCATGTCTGACTCCCTGTAGCTTGTCTATACCA  
TCCTCACAACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACACCGGAGAGGCTGGGGAATCCACAGAGGGCTCCGCAGGATG  
ACAGGGCAATGCCTACACAGAGGTGGGAAGGGAAGCAGAGGGAACAGCATGGGCGTGGGACCACAAGTCTATTTGGGG  
AAGCTGCCGTAAACGTATATGGCTGGGGTGAGGGGAGAGGTGATGAGATGAGGCAGGAAGAGCCACAGCAGGCAGCGGG  
TAGGGCTCCTTATTGCCAAGAGGCTCGGATCTTCCTCCTCTTCCTCCTCCGGGGCTGCCTGTTTATTTCCACCACTG  
CCTCCCATCCAGGTCTGTGGCTCAGGACATCACCAGCTGCAGAACTGGGCATCACCCAGTCTGAACTGCTGCCAGG  
GCAGGTCTTTCATGCAGCTCAACACCAGTCTAGCTTCTACGAGGATTCTGGCATCACCTACTTGGGCATCAAGGCCAAT  
GATAGCCAGGAGTTCAACCTCAGTGCTTACTTTGAAGGGGCCACAGATTTGATTGACAGGCGCTGGCCCATAAAAATGG  
TAAGGAACGTACATTCCGGCACCCATGGAGCGTAAGCCCTCTGGGACCTGCTTCCTCCAAAGAGGGCCCCACTTGAAGAA  
GTTTCCAGAAAGATCCCAAAATATGCCACCACTAGGGATTAAAGTGCTCTACATGTGAAGCCGATGGGGGCCACTGCATAT  
AGTCTGTGCCATAGACATGCAATGGATAATAATTTTCAGACAGAGAGCAGGAGTTAGGTAGCTGTGCTCCTTTCCCTT  
TAATTGAGTGTGCCATTTTTTTATTCATGTATGTGTATACATGTGTGTGCACACATGCCATAGGTTGATACTGAACACC  
GTCTTCAATGTTTCCCCACCCAGCTTATTTTTGAGGCAGGGTCTCTTCCTGATCCTGGGGCTCATTGTTTTATCTAG  
GCTGCTGCCAGTGAGCTCTGGATTCTGCTTTTCTCTACCTCCCTAGCCCTGGGACTGCAGGGGCATGTGCTGGGCCAG  
GCTTTTATGTGGGTTGGGGATCTGAACCTTAGGTCCCTAGGCCTGAGCACCGTAAGACTCTGCCACATCCCAGCCTGT  
TTGAGCAAGTGAACATTCCCCAGATTTCCCCAGTGGGGCTTTCCTACCTTTTATTGGGTAGGCATTGATGAGTGGTC  
ACCTCGCCAGAGGAATGAGTGGCCACGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGATACTGGGTAAAGTCTTCTGCCGCTC  
GCTCCCTGCAGCCGCAGACAGAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAGTGGTCAGACAGGACAGAAAGGCTGAGAGGGTC  
ACAGGGCAGATGTACAGAGAGCAGACAGGTTCTCCCTCTGTGGGGGAGGGGTGGCCCACTGCAGGTGTAATTGGCCTTCT  
TTGTGCTCCATAGAGGCTTCTGGGTACACAGCAGCTTCCCTGTCTGGTGATTCCCAAGAGAACTCCCTACCACTGGA  
CTTACAGAACTTCTATTGACTGGTGTAACGGTTCAACAGCTTTGGCTCTTGGTGGAGGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC  
AAGAGCTCATTACGAATGAACACACACACACACACACACACACACACACACAAAGCTAATTTGATATGCCCTTAATA  
GCTGAGTGAAGTGGCATTTCTGAACATCCCTGAAGTTAGCAGACATTTCCCTCTGGTGTTCTGGCTTAACACCTTCTAA  
ATCTATATTTTATCTTGTGCTGCTGTACCTTCTGAGAAGCCCTAGGGCCACTTCCCTTCGCACCTACATTGCTGGAT  
GGTTTCTCTCCTGCAGCTCTTAATCTGATCCCTCTGCCTCTGAGCCATGGGAACAGCCCAATAACTGAGTTAGACATAA  
AAACGTCTCTAGCCAAACTTCAGCTAAATTTAGACAATAAATCTTACTGGTTGTGGAATCCTTAAGATTCTTCATGACC  
TCCTTCACATGGCAGGATATGAAGCTTTATTACAATTGTTTATTGATCAAACTAACTCATAAAAGCCAGTTGTCTTTC  
ACCTGCTCAAGGAAGGAACAAAATTCATCCTTAAGTGTGTGACCTTGCACAATCCATACGAATATCTTAAGAGTAC  
TAAGATTTTGGTTGTGAGAGTCACATGTTACAGAATGTACAGCTTTGACAAGGTGCATCCTTGGGATGCCGAAGTGACCT  
GCTGTTCCAGCCCCCTACCTTCTGAGGCTGTTTTGGAAGCAATGCTCTGGAAGCAACTTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAC  
AGCGGGTCACTTCAGCATCCCGATGACGAATCCCGTCAAAGCTGTACATTCTGTAACAGACTGGGAAGCTGCAGACTTT  
AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAATCCCTGTACACCCAACCCGAGCCCTTCTCCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC  
ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGAGGCTTACCCTTCTCAGATGGCAGTGGTTGGTCAT  
CCTCATTCAGGGAACTCTGGGGCATTTCTGCCCTTACTTCTCTTTTGGACTACAGGAATATATGCTGACTTGTTTTGA  
CCTTGTGTATGGGGAGACTGGATCTTTGGTCTGGAATGTTTCTGTAGTTTTTCCCATCCTTTGGCAAACCTATCTA



GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGCTGTGGGTGCTGGGAACCAACTTGAATCTAAGCAAGCACTTTTAACTGCTGAGGCAGG  
TCTCAGTACCCCTTCTTCATTTCTCCGCTGGGTTCATTGTATGGACACATGTAGCTAGAAATATCTTGCTTATCTAATTA  
TGACATTGTTTTGTGCTAAGAGAGAGTAAATGCTCTATAGCCTGAGCTGGCCTCAACCTTGCCATCCTCCTGCCTCAGGC  
TCCTCCTCCTGAGTGCTAGGATGACAGGGGAGTGGTAACCTACATGGTTTCATGTTTTGTTCAAGACTGAAGGATAACAT  
TCATACAGAGAAGGTCTGGGTACAGAAAGTGTGCAGTTCACTGAATGGCAACACCCGTGATCAAGAAACAAAACCTCAGGGG  
CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGAGTTCAATTCACAGCAACACATGGTGGCTCAGAGCCATCTA  
TAACGAGATCTGACGCCCTCTCTGGTGTGTCTGAAGACAGCTACAGTGTACTCACAATAAATAAATAAATCTTTAAAGC  
ACACACACACACCAATTACCAACCCAGAAAGCCCACTCCATGTTCCCTCCCAAGTCTCTGCCTACAGTACTCCAGGTT  
AOCCTCTTCAGGCTTCTAACAACCTGGTTTACTTGGGCTCTTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTTGTGTGCCTCAT  
ACAGCTTCTTTCTAGTAAGTTGCATATTACTCTGGCTTTTACATGTATTTATTTATTGTAGTTGTGTGTGCGTGTGGGC  
CCATGCTAGGCACAGTGTGTGGGATGTCAGAGTATTGTGAACAGGGGACAGTTCTTTTCTTCAATCATGTGGGTTCCAG  
AGGTTGAACCTCAGGTCATCATGTGTGGCAGCAATGCTTTACCCACTGAGACATCTCCATATTCTTTTTTTTTCCCTG  
AGGTGGGGCTTGTTCATAGCCCAACTGGCTTTGCACTTGCACTCAAGTGACTCCCTGTCTCCACCTCTTAGAGTA  
TTGGAATTACGATGTGTACTACCACACCTGACTGGATCATTAAATTTTATGGGGGGGGGAAGGCGCATGCTGCAGG  
TGAAGGATGACTGGACTGGACATGAGCGTGAAGCCAGAGAACAGCTTCAGTCTAATGCTCTCCCACTGAGCTATTTC  
GGTTTGCCAGAGAACAACTTACAGAAAGTCTCAGTGCCATGTGGATTGGGGTTGGAGTTCAACTCATCAGCTTGACAT  
TGGCTCCTCTACCCACTGAGCCTTCTCACTACTCTCTACCTAGATCAATTAATCTTTTTTAAAGGACTTATTAGGGGGC  
TGGAGAGATGGCTCAGCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTTCAGAGGTCCCTGACTTCATTCACAGCATGCCATTGCTGG  
GCAGTAGGGGGCGCAGGTGTTCAACGTGAGTAGCTGTTGCCAGTTTTCCGCGGTGGAGAACCTCTTGACACCCCTGCTGT  
CCTGGTCATTCTGGGTGGGTGCATGGTGATATGCTTGTGTATGGAAGACTTTGACTGTTACAGTGAAGTTGGGCTTCCA  
CAGTTACCAGTCTCCCTGTTTCTTGACAGCCGGGTGCTTGTCCATTGCCGCGAGGGCTACAGCCGCTCCCCAACGTA  
GTTATCGCTACCTCATGATGCGGCAGAGATGGACGTCAAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAGAACTGTGAGATCGG  
CCCCAACGATGGCTTCTGGCCCACTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAAGGAGGGCAAGGTGAAACTCTAGGGTG  
CCCACAGCCTCTTTTGAGAGGTCTGACTGGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTTAGGAACACAGTATACCCACTCCCTGC  
ACCACAGACACGTGCCACATCTGTCCCACTCTGGTCTCGGGGGCACTCCACCTTAGGGAGCACATGAAGAAGCTC  
CCTAAGAAGTTCTGCTCCTTAGCCATCCTTTCTGTAAATTTATGTCTCTCCCTGAGGTGAGGTTGAGGTTATGTCCCTG  
TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGACCCAGGTGGGAGGGCTATCAGGCTGCATGGCCCGGACACGGGCACTCTTCAT  
GACCCCTCCCCCACTGGGTTCTTCTGTGTGGTCCAGAACCACGAGCCTGGTAAAGGAATATGCAAACACAGGCCCTG  
ACCTCCCCATGTCTGTTCTGTCTCTCAGCCCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGAATGACATTAAAGTTCTGAAGCAG  
AGTGGAGATAGATTAGTGACTAGATTTCCAAAAAGGAGAAAAAAGGCTGCATTTTAAATTTATTTCTTAGAATTAA  
AGATACTACATAGGGGCCCTTGGGTAAGCAATCCATTTTCCAGAGGCTATCTTGATTCTTTGGAATGTTAAAGTGT  
GCCTTGCCAGAGAGCTTACGATCTATATCTGCTGCTTCAGAGCCTTCCCTGAGGATGGCTCTGTTCTTTGCTTGTTAGA  
AGAGCGATGCCTTGGGCAGGGTTTCCCCCTTTTCAAGATACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAAACAA  
CAAACAAACAAAGGACCTCCATTTGGAGAATTGCAAGGATTTTATCCTGAATTATAGTGTGGTGAGTTCAAGTCATCAC  
GCCAAGTGCTTGCCATCCTGGTTGCTATTCTAAGAATAATTAGGAGGAGGAACCTAGCCAATTGCAGCTCATGTCCGTGG  
GTGTGTGCAGGGTGCATATGTTGGAAGGGGTGCTGTCCCTTGGGGACAGAAGGAAATGAAAGGCCCTCTGCTCAC

CCTGGCCATTTACGGGAGGCTCTGCTGGTTCCACGGTGTCTGTGAGGATCCTGAACTGACTCGCTGGACAGAAACGAG  
 ACTTGGCGGCACCATGAGAATGGAGAGAGAGAGCAAAAGAAAGAAACAGCCTTTAAAAGAACTTTCTAAGGGTGGTTTT  
 TGAACCTCGCTGGACCTTGTATGTGTGCACATTTGCCAGAGATTGAACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT  
 TTGTATGTCTCCGGGTCACGCAGAGCCGTCAGCCACCACCCAGCACCCGGCACATAGGCGTCTCATAAAAGCCCATTT  
 TATGAGAACCGAGAGCTGTTTGTAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTGCTGGGGCAGCCGGATCCAGCAGCCTGGT  
 TGCCTGCCTGTAGGATGTCTTACAGGAGTTTGCAGAGAAACCTTCCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTTGTGGA  
 ATATTTCAAATTCAGCTTTAAGTGTAAAGACTCAGCAGTGTTCATGGTTAAGGTAAAGGAACATGCCTTTTCCAGAGCTGT  
 GCAAGAGGCAGGAGAGAGACCTGTCTTAGGATGTCACTCCAGGGTAAGACCTCTGATCAGCAGAGAGGAGAGCTG  
 TGCAGCCTGGATGGTCAATTGTCCCTATTCTGTGTGACCACAGCAACCTGGTCACATAGGGCTGGTCATCCTTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGAAATGAAGTGACCATAGCCAASTTGTGTACCTCAGTCTTTAGTTTCCAGCGGCT  
 CTCTTGCTCAATACAAATGTGCATTTCAAATAAAGCTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTCATGTGTTATGAGAGAGGAAAB  
 GAGAGGAAAGAAACAAABCAAAACAAACACCCACAAACCCAAACATCTGGGCTAGCCAGGCATGATTGCAATGTCTACAG  
 GCCCAGTTCTATGAGAGGCAGAGACAGGAAGACCGCCGAAAGGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGCCA  
 GGGCTACGGTCCCAAGATCCTAGSTTTTGGATTTTGGGCTTTGGTTTTTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTG  
 TCCTGGAACCTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACCTTAGAGATCTGCTGACTCTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT  
 GCCACCCTGCCCCAACTAAGATTCCATTAAAAAAAAGTTCAAGATAATTAAGAGTTGCCAGCTGGTTAAGCTAA  
 GTAGAAGCAGTCTCAGGCCTGCTGCTTGGGCTGTTCTTGGCTTGGACCTGAATCTGCCCCAACAGTGTCCAAAGTGCA  
 CATGACTTTGAGCCATCTCCAGAGAAGGAAGTAAAAATGTGGCTCCCGAGTCGATTGGGACACAGTCTCTCTTTGTCTA  
 GGTAACACATGGTGACACATAGCATTGAACTCTCCACTCTGAGGGTGGGTTTCCCTCCCCCTGCCTCTTCTGGGTGGTC  
 ACCCCATAGGACAGGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAAACCTCTTTGTGGGAACATGAAGAAAGAGCCTTTGGG  
 AGATTCTGGCTTTCCATTAGGGCTGAAGGTACAACSGTTCTTGGTTGGCTTTGCCTCGTGTATATAAACTAGCTACTA  
 TTCTTACGGTAAATACCGATGTTGTGGAAAGGCCAACCCCGTGGCTGCCCGTAGTAGGGGGTGGGTTGGGAATCCTG  
 GATAGTGTCTATCCATGGAAAGTGGTGGAAATAGGAATTAAGGGTGTCCCCCCCCCCCCAACCTCTTCTCAGACCCAG  
 CCACCTTTCTATGACTTATAACATCCAGGTAAAAATTACAACATAAAAATGGTTTCTCTTCTCAATCTTCTAAGTCTG  
 CCTGCCTTTTCCAGGGGTAGGTCTGTTTCTTGTCTGTTCTATTGTCTTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAATGAGGG  
 AACTCTTGGCCCATACTAAGGCTCTTCTGGGCTCCAGCACTCTTAAGTTATTTTAAGAAATCTCACTTGGCCTTTAGCAC  
 ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGTGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGGCACTGTTGAGGCGGGTGCCTTTCCACCTTAAG  
 TTGCTTATAGTATTTAAGATGCTAAATGTTTTAATCAAGAGAAGCACTGATCTTATAATACGAGGATAAGAGATTTTCTC  
 ACAGGAATTTGTCTTTTTTCATAATTCTTTACAGGCTTTGTCTGATCGTAGCATAGAGAGAATAGCTGGATATTTAAT  
 TGTATTCCATTTTCTCTGCCAGCGTTAGGTTAACTCCGTAAAGAGTATTCAAGTGGACCAAGAGGCTCAGAGGGCAGG  
 GGATGGTGGGTGAGGCAGAGCACTGTCACTGCCAGGCATGGGAGGTCTGCCATCCGGGAGGAAAAGGAAAAGTTTAGC  
 CTCTAGTCTACCACAGTGTAAACGCACTCTAAAGTTGTAAACCAAAATAAATGTCTTACATTACAAAGACGTCTGTTTTG  
 TGTTCCTTTTGTGTGTTTGGGCTTTTTATGTGTGCTTTATAACTGCTGTGGTGGTGTGTTGTAGTTTTGAGGTAGGA  
 TCTCAGGCTGGCCTTGAACCTCTGATCGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGTCCCTGCCTCCAAGTGCTAGGACT  
 AAAAGCACATGCCACCACACAGTACAGCATTTTCTAACATTTTAAATAATCACCTAGGGGTGGAGAGAGGGTTCCA  
 GCTAAGAGTGCACACTGCTCTTGGGTAGGACCTGAGTTTACTTCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

[illegible]

ATGAGGGAAATGATTTTTTGGCTAAGAAATGAAATTCCTGTGTGGCGGCAAGAAAGCCTGGGCAAGGAAGAACTGCCTTTG  
 GCACACCAGCCTATAAGTCACCATGAGTTCCTGGCTAAGATCAGATGTAATGGAGCCAGGTCCCTCTTGCCTGGTGG  
 TTGCCTCTCCCACTGGTTTTGAAGAGAAATTCAGAGAGATCTCCTTGGTCAGAAATGTAGGTGCTGAGCAATGTGGAGC  
 TGGGGTCAATGGGATTCCTTTAAGGCATCCTTCCCAAGGCTGGGTCTACTTCAATAGTAGGGTGCTTGCACAGCAAGC  
 GTGAGACCCCTAGGTTAGAGTCCCCAGAACTGTCCCCCAACCCCCCAAAAGGCATCCTTCTGCCTCTGGGTGGGTGGGG  
 GAGCAACACCTTTAACTAAGACCATTAGCTGGCAGGGGTAAACAATGACCTTGGCTAGAGGAATTTGGTCAAGCTGGAT  
 TCCGCTTCTCTAGAGAGCCCACTTTSTTTCTTTGTTAAGCTGGCCACAGTTTSTTTTGAGAAATGCTTGAGGGGCCAG  
 GAGGCAGAGCAATTAAGAGCCAGCTCATTGATATCTGAAAGCCACAGCCTGACTGCCTTCCCGTGGGAGGTACTGG  
 GAGAGCTGCTGTGTCTCTGCTCAGCAACGCCGCCGCCGCCCAACACACACTCTCTCGGGTCACTGGGAGGTGCCAGCAG  
 CAATTTGGAATTTTACTGAGCTTGAGAACTCTGGGAGGGCTGACGCTAAGCACACCCCTTCTCCACCCCCCCCCACCCC  
 ACCCCCGTGGAGAGGAGGGTGGAGAAACATGGGACCAGCCCTGCTCCAGCCCGTCTTATTGGCTGGCATGAGGCAGAGG  
 GGGCTTTAAGAGGCAACCGTATCTAGGCTGGGACTGGAGCCTGTGCTACCGAGTGCCTCTCTCACTGGCAGCATGC  
 AGCCTTACTAGCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCAGCTGCCTTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGTGGCAAGCC  
 TTGAGGAATGATGCCACAGAGGTCACTCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCTCTGAGAAACACAGACCATGAA  
 CCGGGGAGAGATGGAGGCGAGCCTCCCCACCATCCTATGACGCCAAAGGTACGGGATGAGGAAGCACATTAGTGGGGG  
 GATGATCTCTGAGAGTGACTGGGGTGGTTTTAGCATCTTCTCTCAGAGGTTGTGTGGGTGGCTAGCCTCTGCTACATCA  
 GCTGAGAGAGCAATTTGCTGGAAGAATACTAGCACAGCATTAGAACCTGGAGGGCAGCATTGGGGGGTGGTAGAGAGC  
 AGCAAGGCAAGGTGGAGGGTGGAGTCAAGCGAAGCTGGCATTAAACAGGGCATGGGCTTGTATGATGGTCCAGAGAATC  
 TCTCTCTAAGATGAGGACACAGGTGAGATCTAGCTGCTGACCAGTGGGGAGTGATATGGTGGGCTGGATGCCAGATG  
 GCATCATGCTCTACTATATCCACATGACCACCACTGAGGTAAAGAGGCCCCAGCTTGAGATGGAGAAACCGAGA  
 GCTCTCTGAGATTAAGTCACCTGGGAGTAAGAAGAGCTGAGACTGGAAGCTGGTTTGATCCAGATGCAAGGCAACCTAG  
 ATTGGCTTTGATGGGAACCTGAAGCCAGGAGGAATCCCTTTAGTTCCCCCTTGCCAGGGTCTGCTCAATGAGCCAGA  
 GGTTAGCACTTAAAGAACAGGGTTTTGTAGGTGGCATGTGACATGAGGGGCAGCTGAGTGAAATGTCCCTGTATGAGCA  
 CAGCTGCACTTACTTCCCTGAGCTTGACCCCTGACCCCAAGCTTTGCTCTATTCTGAGGACAGCAAGAACTGTGGAGGC  
 AGACCCAGCAGAGAGATGCCTGGGGTGGGGTGGGGTATCACGCACGGAACTAGCAGCAATGAATGGGGTGGGGTGG  
 CAGCTGGGAGGACACTCCAGAGAAATGACCTTGCTGGTCACCATTTGTGTGGGAGGAGAGCTCATTTTCCAGCTTGCCAC  
 CACATGCTCTCTCTCTCTCTCTAGCCAGTAAGGGATGTGGAGGAAGGGCCAGCCCAAGGAGCATGCAATGCAGTCA  
 CGTTTTTTCAGAGGAGTGCTTGACCTAAGGGCACTATTCTTGGAAGCCCCAAACTAGTCTTCCCTGGGCAACAGG  
 CCTCCCCACATACCACCTCTGCAGGGGTGAGTAAATTAAGCCAGCCACAGAAGGGTGGCAAGGCCTACACCTCCCCCT  
 GTTGTGCCCCCCCCCCCCCGTGAAGGTGCATCCTGGCCTCTGCCCTCTGGCTTTGGTACTGGGATTTTTTTTCTT  
 TTATGTCATATTGATCCTGACACCATGGAACCTTTTGGAGGTAGACAGGACCCACACATGGATTAGTTAAAGCCTCCCAT  
 CCATCTAAGCTCATGGTAGGAGATAGAGCATGTCCAAGAGAGGAGGGCAGGCATCAGACCTAGAAGATATGGCTGGGCAT  
 CCAACCCCATCTCTTCCCCGGAGAACAGACTCTAAGTCAGATCCAGCCACCCCTTGAGTAACAGCTCAAGGTACACAGA  
 ACAGAGAGTCTGGTATACAGCAGGTGCTAACAATGCTTGTGGTAGCAAAAGCTATAGGTTTTGGGTCPGAACTCCGA  
 CCAAGTCCGGAGTGAAGAGCGAAGGCCCTCTACTCGCCACCGCCCCCGCCCCACCTGGGGTCTATAACAGATCACTT  
 TCACCCTTGGGGAGCCAGAGAGCCCTGGCATCCTAGGTAGCCCCCCCCCGCCCCCCCCCGCAAGCAGCCAGCCCTGCC

TTTGGGGCAAGTTCTTTTCTCAGCCTGGACCTGTGATATGAGGGGGTTGGACGGCGCCGCTTTGGTCGCTTTCAAGTCT  
 AATGAATTCTTATCCCTACCACCTGCCCTTCTACCCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACUTTCATTATAC  
 CTCCTACTCCTTTCTCCATCTCCTGGGATACCGCCCTGTCCAGTGGCTGGTAAGGAGCTTAGGPAAGGACCCAGAGCCAG  
 GTGTGGCTAGAGGCTACCAGGCAGGCTGGGGATGAGGAGCTAACTGGAGAGTGTGTTGGTTAGTAGGCACAAAGCCTT  
 GGGTGGGATCCCTASTACCGGAGAGTGGAGATGGGCGCTGAGAACTTCAAGACCATCCATCCTTAAGTACACAGCCAGT  
 TTGAGGCCAGCCTGGGCTACATAAABACCAATCTCAABAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTGGCCGATGTA  
 ATATGGATGAAGTGGTTGAATCCTGGGGCAACCTATTTTACAGATGTGGGGAAGGCACTTTAAGTACCTGCCCCA  
 GATCAAAAGAAATAGTGAAGAGCTCCAGTGTTCATCCTGGCTTCAAGGACAGGGAGAGAGAGCCAGGGTGGG  
 ATCTCACTGCTCCCGGTGGCTCCTTCCTATAATCCATACAGATTGGAAGGCGCAGGGCAGGTTTGGAAAGAGAGAGAG  
 GTTGGAGAGGAGCAGACCACTTGGGCTAGGCTGCAGCCCTCAGGCATCCCTCTCTCGCAGATGTGTCCGAGTACAGCT  
 GCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGACAGACGGCCCATGCCGAGCGCCAGCCGGTCAACGAGTTGGTGTGCTCC  
 GGGCAGTGGGCCCCGGCGCTGTGCCCAAGCCATCGGGCGGTGAAGTGGTGGCGCCGAACGGACCGGATTTCCG  
 CTGCATCCCGGATGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGGGGGCGCGCTCGCGCAAGGTGC  
 GTCTGGTGGCTCTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGAGAGCC  
 GCGCGCGCGCAGAAAGGTCCCAAGCGCGCGCGCGCGCGCGGGGAGCCAAAGCCACACCGCGGAGCTGGAGAACGCTA  
 CTAGAGCGAGCCCGGCTATGCAGCCCCCGCGGATCCGATTCGTTTTCACTGTAAAGCCTGCAGCCAGGCCAGGGGT  
 GCCAACTTTCCAGACCGTGTGGAGTTCCAGCCCACTAGAGACCGCAGGTCTTCTGCCCGCTGCCGGGGATGGGGAGG  
 GGTGGGGTTCCCGCGGGCCAGGAGAGGAGCTTGAGTCCAGACTCTGCCTAGCCCCGGGTGGGATGGGGTCTTTCTA  
 CCTCGCGGACCTATACAGGACAGGCAGTGTTCACCTTAAGGGAAGGGAGTGTGGAACGAAAGACCTGGGACTGG  
 TTATGGAGCTACAGTAAGATCTACTCCTTCCACCCAAATGTAAAGCCTGCGTGGGCTAGATAGGGTTTCTGACCTGACC  
 TGGCCACTGAGTGTGATGTTGGGCTACGTGGTCTCTTTTGGTACGGTCTTCTTTGTAAATAGGGACCGGAACCTCTGCT  
 GAGATTTCCAAAGGATTGGGGTACCCCGTGTAGACTGGTGAGAGAGAGGAGAACAGGGGAGGGGTAGGGGAGAGATTGTGG  
 TGGGCAACCGCTAGAAAGAGCTGTTTGTGGCTCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTTGGCTTCCCCACTCCTTCTCTC  
 TCAATCTGCCCTTCAATCCATATCTGGGATAGGGAAGGCCAGGGTCCGAGAGATGGTGGAAGGGCCAGAAATCACACTC  
 CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCCGCCCCAACTGCCTTGTATATTGTAAAGGGATTTTCTACACAACAGTTTAAAGGT  
 CTTTGGAGGAACTGGGCTTGCCAGTCACTCCCATCCTTGTCCCTTGCCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCACGG  
 ACACATTTCTGTCTAGAAACAGAGCGTCGTGCTGTCTCTGAGACAGCATATCTTACATTAAAAAGAAATATACGGG  
 GGGGGGGGGGGAGGGGCGAAGTGTATACATATGCTGAGAAAGCTGTGAGGCGCCACAGCACCCACCAATCTTTTGT  
 AATCATTTTCCAGACACCTCTTACTTTCTGTGTAGATTTTAAATTGTTAAAGGGGAGGAGAGAGCGTTTGTAAACAGAA  
 GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGTTGGGGCTGGTGAGTTTGGCGAACTTTCCATGTGAGACTCATCCACAAGACTGA  
 AAGCCGCGTTTTTTTTTAAAGAGTTCAGTGACATATTTATTTTCTCATTTAAGTTATTTATGCCAACATTTTTTTCTTG  
 TAGAGAAAGGCAGTGTAAATATCGCTTTGTGAAGCACAAGTGTGTGGTTTTTGTTTTTTGTTTTTTCCCCGACCAGA  
 GGCATTGTTAATAAAGACAATGAATCTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTTGTGTTTGTCAACCACACACAATGTCTCGCCACT  
 GTCATCTCACTCCCTTCCCTTGGTCACAAGACCCAAACCTTGACAACACCTCGACTGCTCTCTGGTAGCCCTTGTGGCA  
 ATACGTGTTTCTTTGAAAGTCACATTCATCTTTCTTTGCAAACCTGGCTCTCATTCGCCAGCTGGGTATCGTCAT  
 ACCCTCACCCAGCCTCCCTTTAGCTGACCACTCTCCACACTGTCTTCCAAAGTGACGTTTACCGAGCCAGTTCCCT



GGTCCAGTTCATCCCATTTGCTCCTCCTTGGTCCAGACCCCTTCTCCACAAAGATGTTTCATCTCCCACTCCATCAAGCCCC  
AGTGGCCCTGCGGCTATCCCTGTCTCTTCAGTTAGCTGAATCTACTTGGTGACACCACATGAATTCCTTCCCCTGTCTTA  
AGGTTTCATGGAACTCTTGCTGCCCTGAACCTTCCAGGACTGTCCAGGGTCTGATGTGTCTCTCTTGTAAAGCCC  
CAGCCCACTATTTGATTCCCAATTCCTAGATCTTCCCTTGTTCATTCTTCCAGGGATAGTGTCTCATCTGGCCAGTCTCT  
GCTTGATATTGGGATAAATGCAAGCCCAAGTACAATTGAGGACCAGTTTCATCATTGGGCCAAGCTTTTTCAAAATGTGA  
TTTTACACCTATAGAGTGTAAAGCCCTTCCAAAGCAGAGGCAATGCCTGGCTCTTCCCTCAACATCAGGGCTCCTGCTT  
TATGGGTCTGGTGGGTAGTACATTCATAAACCACACTAGGGGTGTGAAGCAAGATGATTGGGAGTTCGAGGCCAAT  
CTTGGCTATGAGGCCCTGTCTCAACCTCTCCTCCCTCCCTCCAGGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTG  
CAACACTTTAATCCAGTCAAGTGCATCTTTGGGTGAGGGGACTCTATCCCTAATATAGCTTCCATCTTGATTGTGT  
ATGTGCACACTGGGGGTTGAACCTGGGCCCTTGTACCTGCCGGGCAAGCTCTCTACTGCTCTAACCACAGCCCTCACTGG  
CTTTCTGTTTTCACTCCCAATGAATCCCCAATGAATTATCATATCATGTCTTTGAAAAATACCATTGAGTGTCTGT  
GGTGTCCCTGTGGTTCCAGATTCAGGAAGGACTTTTCAGGGAATCCAGGCATCCTGAGAAATGTCTTAGAGCAGGAGGC  
CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCACAAAGGCAGTGTGGTGCAGAGGGTGAGGATGGAGGCCAGGCTTGCAATTGAAGCTGAGA  
CAGGGTACTCAGGATTAAAGGCTTCCCCCAAAACATTCAGATCAGTTCTGGTACTTGACCTGTTTCACTATGCA  
GAGCCCACTGGGCATAGGTGAAGACACCGGTTGTACTGTCTACTAATGTGCTTCAGAGCCGGCAGAGACAAATAAT  
GTTATGTTGACCCAGGGGACAGTGATTCCAGAAGGAACACAGAAGAGAGTGTCTGCTAGAGGCTGCTGAGGAGAGGG  
GTCCCACTCTCTAAGCAAGACTCCACTCACATAAAGACACAGGCTGAGCAGAGCTGGCCGTGGATGCAGGGAGCCCA  
TCCACCATCCTTTAGCATGCCCTTGTATTCCCATCACATGCCAGGGATGAGGGGCATCAGAGAGTCCAGTGATGCCAA  
ACCCAAACACACCTAGGACTTGCTTTCTGGGACAGACAGATGCAGGAGAGACTAGGTTGGGCTGTGATCCATTACCACA  
AAGAGGGGAAAAACAAAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAAC  
GGTCAGGTTAGAGTTTATTTATGGAAAGTTATATTCTACCTCCATGGGGTCTACAAGGCTGGCGCCCATCAGAAAGAACA  
AAACAACAGGCTGATCTGGGAGGGGTGGTACTCTATGGCAGGGGACAGTGTGCTTGGGGTACAGCCAGACACGGGGCTTG  
TATTAACTACAGGGCTTGATTAAATAGGCTGAGAGTCAAGCAGACAGAGAGACAGAGGAAACACACACACACACACACA  
CACACACACACACACACACATGCACACACCACTCACTTCTCACTCGAAGAGCCCTACTTACATTCTAAGAACAAACC  
ATTCTCTCTCATAAAGGAGACAAAGTTGCAGAAACCCAAAGAGCCACAGGGTCCCCACTCTCTTTGAAATGACTTGGAC  
TTGTTGCAGGAAGACAGAGGGGTCTGCAGAGGCTTCTGGGTGACCCAGAGCCACAGACACTGAAATCTGGTGTGAGA  
CCTGTATAAACCTCTTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGCCACATTCCTCAACCTGTCTCTGACCACTGAGGATGAGA  
GCACCTGGGCCCTTCCCATTTCTTGGAGTGACCCCTGGTTTCCCATCTGAGGGCACATGAGGTCTCAGGTCTTGGGAAAG  
TTCCACAAGTATTGAAGTGTCTTGTTTGTTTGTGATTTAATTTAGGTGTATGAGTGCTTTTGCTTGAATATATGCCT  
GTGTAGCATTTACAAGCCTGGTGCCTGAGGAGATCAGAAAGATGGCATCAGATACCTGGAACCTGGACTTGACAGAGTTA  
TGAGCCACTGTGTGGGTGCTAGGAACAGAACCTGGATCCTCCGGAAAGACAGACAGCCAGCGCTCTTAGCCACTAAGCCA  
TCACTGAGGTTCTTCTGTGGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTTCTTTTGTCAATAGGACCATGAATGTTCTCT  
CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGATCCCCAGTGACCCGATGGCCCTGTGTAGTTATTAGCAGCTCTAGTCTTATTC  
CTTAATAAGTCCAGTTTGGGGCAGGAGATATGTATTCCCTGCTTTGAAGTGGCTGAGGTCCAGTTATCTACTTCCAAGT  
ACTTGTCTCTTTCTGGAGTTGGGGAAGCTCCCTGCCTGCCTGTAAATGTGTCCATTTCTCAACCTTAGACAAGATCAC  
TTTCCCTGAGCAGTCAGGCCAGTCCAAAGCCCTTCAATTTAGCTTTCTAAGGAACACCCCTTTTGTGGGTGGAGGTAG



[illegible]

[illegible]

CTGTAGCAGCCCTCCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGGCGCCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG  
 GAGTCACCTCGGGTACCATTGTTTAGGGAGGTGGGGATTGTGGTGTGGAGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTTCAACA  
 ATGGTTGATGAGTTGGAACATAAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGGCTTGCCAGCTTCCACATCTGCC  
 CCCCACCCCTGTCTGGCACCAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC  
 ACCTCTTCTGGACCATCAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCCTAGGCTCCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC  
 AGCTATCTCTGAGCTGGAACTATTTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCCGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC  
 TTGGGTAAAGCAAGTGCTGTTGATTTATCTAATAACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGACAAGTATGTATGCATCTGT  
 TTGATGTATCTGAAGAGCGACACACCATTTTTACATCATGGCATCTTCTTAACCCCATTTCTTTTTGTTTTGTTTT  
 TTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGTCTGGCTGTCTGGAAGTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAAGCTCAGAAATC  
 CTGGGATTAAAGGTGTGTGCCACCACGCCCGGCCCTAACCCCATTTCTTAATGGTGATCCAGTGGTGAATTTCCGGCC  
 ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGCTGTCTTCTGAGCTACCTGGTACAATCTTTATCCCTGGGGCTGGGCTCCTG  
 ATCCCTGACTCGGGCCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGCGGATCAAGTCCAGTTCTGGGCGCGAACAAGTCCAGTCCCT  
 AGCTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGCTGTTCTTACTTACACTCTTCCCTTGCTCTGGACTTGTGCTTTCTTTA  
 CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAAGCCACCTCTGTAAGACAACATAAGATAATACTTCCCTCAAGCACGGAAAGTCCCTG  
 AGTCACCACACCCCTCTGGAGGTGTGTGGACACATGTTTCATGCGTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

**SEQ ID NO. 18: Secuencia Genómica de BEER Humana (Este gen tiene dos exones, en las posiciones 161-427 7 3186-5219)**

5

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

aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg 540  
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600  
5 gccttcaaatt tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtagagac ccagggcagg 660  
gaggacgctg gggtagtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720  
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaatatag gagccacgtc cagctgctgg 780  
10 taccactggg aaggaacaa ggtaaggagg cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840  
caccggacac tctatgctgg tggtagctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900  
15 cccaggaggt gaacccccag ctgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960  
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctggtg 1020  
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080  
20 cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccaggagct ggcacttgaa ggaatgggag 1140  
ttttcggcac agtttttagc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200  
25 agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccccc cagtcccaac 1260  
cttgccctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaaccct .gggttcctgg tcaggcctgc 1320  
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380  
30 atgggggcgt ctgaaatgac acttcagact agagcttcc ctgtctctg gccattatcc 1440  
aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggaccca gccctcccc cctcacaacc 1500  
35 tggtgggact atggggtgct aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggaccctccg 1560

tcttcaaaat ggaggacaag ggcgctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620  
tgggctccag cgactgcctg aagggtgta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc 1680  
tgactccca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgctcaaac aaagtcatga 1740  
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggcg ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800  
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860  
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtgggccaca tctcccctgc 1920  
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980  
tcttaagact atttttcatt ctttcttgtc acattggaac tatccccatg aaacctttgg 2040  
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccaccc atctaagtcc 2100  
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160  
tctgcctgcc caggagtat caccatgagg cgccattca gataacacag aacaagaaat 2220  
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag 2280  
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agtcccatcc 2340  
cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400  
ggtgctggga ccccaggga gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460  
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac acactgcctt 2520  
tgattccttt caagtctaät gaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tcctctgcct 2580  
ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactcctttc tccatcccc 2640

gtccaccctt cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700  
tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaata 2760  
ataagaagac cccagaagag aatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820  
atatgtgcca aatggatatt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880  
ggcgggccat tttgcagaca ggaagaagag agagggttaag gaacttqccc aaqatqacac 2940  
ctgcagtgag cgatggagcc ctgggtgttg aacccagca gtcatttggc tccgagggga 3000  
caggggtgcgc aggagagctt tccaccagct ctgagcctc tgggaccttc ctgcaataga 3060  
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120  
gacgggcccg tccagggcag ggggtggccag gcgggcccgc accctcacgc gcgcctctct 3180  
ccacagacgt gtccgagtag agctgccgcg agctgcactt caccgctac gtgaccgatg 3240  
ggcgtgcccg cagcgccaag ccggtcaccg agctgggtgtg ctccggccag tgcggcccgg 3300  
cgcgcctgct gccaacgcc atcgccgcg gcaagtgggtg gcgacctagt gggcccgaact 3360  
tccgctgcat cccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccggtgggtg 3420  
aggcgcgcg cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgcaag cgcctcacc 3480  
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg 3540  
gcccgaagcc ggggcccgc gccggygcy ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600  
cctactagag cccgcccgc cccctccca ccggcgggcg ccccgccct gaaccgcgc 3660  
cccacatttc tgctctctgc gcgtgggttg attgtttata tttcattgta aatgcctgca 3720



acccagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgggcgc cggcaaggcc 3780  
 ccctcagcc cgccagctga ggggtccac ggggcagggg agggaattga gagtcacaga 3840  
 cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacctt tgctgggtccc acttcagagg 3900  
 aggcagaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggttttaa gggagcgggtg tgggagtggg 3960  
 aaagtccagg gactgggtta gaaagtgtga taagattccc ccttgcacct cgctgcccatt 4020  
 cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcacia gactgggggc aactgtagat gtgggtttcta 4080  
 gtcttggttc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct ccttcggggc 4140  
 ctcaatttcc actttgtaaa atgagggtgg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt 4200  
 ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260  
 gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320  
 gagttgtgat gctctcttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380  
 agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440  
 5 tccccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500  
 catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgaggggtg gtgggagggg tagaaatcac 4560  
 atccgccccca acttcccaaa gagcagcatc cctccccga cccatagcca tgttttaaag 4620  
 0 tcaccttccg aagagaagtg aaagggtcaa ggacactggc cttgcaggcc cgaggagca 4680  
 gccatcacia actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gccaccact 4740  
 5 cacggacaca tttctgcta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860  
 tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcattttcca gacaacctct 4920  
 5 tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980  
 tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttttt tggcaattct tccacgtggg acttgccac 5040  
 aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100  
 atttatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgtta atattgcttt atgaattaac 5160  
 agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220  
 ; gatgtggtct cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280  
 tcttggtcac tagagctcca accttggaac cacctttgac tgctctctgg tggcccttgt 5340  
 ggcaattatg tcttccttg aaaagtcag tttatccctt cctttccaaa cccagaccgc 5400  
 atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tccttttagc agcctccct 5460  
 ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc cctgctcaa aagccttcca 5520  
 tagctcccc ttgccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580  
 gcttgactcc cacctccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640  
 cctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccceca ataactaatc ctctttcttt 5700  
 aggatccaca ttactgtca tcttttccc laacctcca gagatgttcc aatctcccat 5760  
 gatccctctc tctctgagg ttcagcccc tttgtctac accactactt tggttcctaa 5820  
 ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940  
tcttcgaagt gtggatttga tgcctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtggggc 6000  
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccagggt gtcttaatag tgctggatgc 6060  
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120  
ggtagggatgg tcaactggaa agctttaaat taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180  
cccacaaaga aagctgaggt cctcctgat gacttgtcag tttaactacc aataaccac 6240  
ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccgggtcc 6300  
cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagttagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360  
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420  
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgtt 6480  
tgtttgtttg ttttgagaca gagtctcgct ctattgccca ggctggagtg cagtgtcaca 6540  
atctcggctt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600  
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tatttttgat 6660  
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720  
gcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccca 6780  
ggttggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaattgtt tgcccacagc 6840  
catacttggg ctgagttcct tgcctaccc ctacttgag ctgcttagaa cctggtgggc 6900  
acatgggcaa taaccaggtc aactgtttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960

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

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

ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180

ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctggtg 9240

agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300

c 9301

LISTADO DE SECUENCIAS

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

gctccggcca	gtgcgggccc	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catcgggccg	ggcaagtgg	420
ggcgacctag	tggggcccgac	ttccgctgca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgctg	480
agctgctgtg	tcccgggtgt	gaggcgccgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgcaa	gcgcctcacc	cgcttcacac	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
aggccgctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcgggcccc	cgcccgagc	gccaaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcgccg	gcccctcccc	accggcgggc	720
gccccggccc	tgaaccgcg	ccccacattt	ctgtcctctg	cgcgtggttt	gattgtttat	780
atttcattgt	aaatgcctgc	aaccagggc	agggggctga	gaccttcag	gccctgagga	840
atccccggcg	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gaggggaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctgggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaagcatt	ttaccgccc	tggggtttta	1020
agggagcgg	gtgggagtg	gaaagtccag	ggactggta	agaaagtgg	ataagattcc	1080
cccttgacc	tcgctgccc	tcagaaagcc	tgaggcgtgc	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtggtttct	agtcctggct	ctgccactaa	cttgctgtgt	aaccttgaa	1200
tacacaattc	tccttcggga	cctcaatttc	cactttgtaa	aatgagggtg	gagggtggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggtcact	tccagaattc	agagtgtgta	tgctctcttc	tgacagccaa	agatgaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggctga	catatttacg	gctgacaaac	1500
tcctggaaga	agctatgctg	cttcccagcc	tggcttcccc	ggatgtttgg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgaggg	1620
gggtgggagg	atagaaatca	catccgcccc	aacttcccaa	agagcagcat	ccctcccccg	1680
acccatagcc	atgttttaaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgaggc	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atttctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttacctaa	aagaatatta	ttgggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tctttttgaa	1980
aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgtagttttt	aattgttaaa	aaaaaaaagt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcgttttt	ttggcaattc	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
attttatttc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagtttttc	ttgtagagaa	tgacaatgtt	2220
aatattgctt	tatgaattaa	cagtctgttc	ttccagagtc	cagagacatt	gttaataaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

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



- 145 -

&lt;400&gt; 2

```

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

```

5 <210> 2  
 <211> 2301  
 <212> ADN

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 3

```

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctccac      60
tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggctagg      120
ggtaggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccgcc      180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggaggagAAC ggagggcggc      240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact      300
tcaccgccta cgtgaccgat gggcgcgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt      360
gctccggcca gtgcggcccc gcgcgcctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtgg      420
ggcgacctag tggggcccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgctgc      480
agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgcgcg gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt      540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttcacaa accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg      600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc gcgcggcccc cgcccggagc gccaaagcca      660
accaggccga gctggagAAC gcctactaga gcccgcgcgc gccctcccc accggcgggc      720
gccccggccc tgaaccgcgc cccacatctt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat      780
atcttcattg aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttcag gccctgagga      840
atcccgggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg      900
gaggggaattg agagtcacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct      960
ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaagcatt ttcaccgcc tgggggtttta     1020
agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggtta agaaagtTgg ataagattcc     1080
cccttgacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg     1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgAAC     1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa     1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg     1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc     1380
caaggtcact tccagaattc agagtTgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa     1440
caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac     1500
tcctggaaga agctatgctg ctccccagcc tggtctcccc ggatgtttgg ctacctccac     1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt     1620
ggtagggagg atagaaatca catccgcccc aactttccaa agagcagcat cccctccccg     1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg     1740
ccttgaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga     1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc     1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt     1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc caccacaaaa tctttttgaa     1980

```

- 147 -

```

aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgtttaa aaaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atttattttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatgtt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

```

<210>      4
<211>      23
5 <212>      PRT
   <213>      Homo sapien

```

```

<400>      4

```

```

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

```

```

10              20

```

```

<210>      5
<211>      2301
<212>      ADN
15 <213>      Homo sapien

```

```

<400>      5

```

```

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tggtagcatg cagctccac 60
tggccctgtg tctcatctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120
ggtaggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccg cgagctcgga gagtaccacc 180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggaggagaac gagggcgagg 240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgcccgagta cagctgccgc gagctgcact 300
tcaccgccta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctgggtgt 360
gctccggcca gtgcgggccc ggcgcgctgc tgcccaacgc catcggccgc ggcaagtggg 420
ggcgacctag tggggccgac ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgctg 480
agctgctgtg tcccggtggg gaggcgcccgc gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgcttccaca accagtcgga gctcaaggac ttcgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccc cgcccggagc gccaaagcca 660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgcgccg gccctcccc accggcgggc 720

```

- 148 -

```

gccccggccc tgaacccgcg cccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat 780
atctcattgt aaatgcctgc aaccacgggc agggggctga gaccttccag gccctgagga 840
atccccggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg 900
gaggggaattg agagtacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960
ttgctgggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaagcatt ttcaccgccc tgggggtttta 1020
agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactgggta agaaagtggg ataagattcc 1080
cccttgccacc tcgctgcccc tcagaaagcc tgaggcgctg ccagagcaca agactggggg 1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aacctgaac 1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgagggtg gaggtgggaa 1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga tccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaataatg cagttgcatt gattcagtgc 1380
caaggctcact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa 1440
caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
tcctggaaga agctatgctg ctccccagcc tggcttcccc ggatgttttg ctacctccac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggg 1620
gggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctcccccg 1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
ccttgccaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ctttttgaga 1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa 1980
aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaaa aaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtagttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttggtcc caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atctattttc tactttaagt tatttatgca aaagttttcc ttgtagagaa tgacaatggt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

```

<210>      6
<211>      213
5  <212>      PRT
    <213>      Homo sapien

```

```

<400>      6

```

```

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

```

10

1

5

10

15

- 149 -

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

<210> 7  
 <211> 2301  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapien  
  
 <400> 7

agagcctgtg	ctactggaag	gtggcgtgcc	ctcctctggc	tggtagcatg	cagctcccac	60
tggccctgtg	tctcgtctgc	ctgctggtac	acacagcctt	ccgtgtagtg	gagggccagg	120
ggtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccg	cgagctcggg	gagtaccccg	180
agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	cccctttgag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcacccgcta	cgtgaccgat	gggcccgtgc	gcagcgccaa	gccggtcacc	gagctggtgt	360
gctccggcca	gtgcggcccg	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catcggccgc	ggcaagtggg	420
ggcgacctag	tggggccgac	ttccgctgca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgcgtgc	480
agctgctgtg	tcccgggtgg	gagggcgcgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgcaa	gcgcctcacc	cgcttcacac	accagtcgga	gctcaaggac	ttcgggaccg	600
agggcgctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcggccccc	cgcccgagac	gccaaagcca	660
accaggccga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcgcgc	gcccctcccc	accggcgggg	720
gccccggccc	tgaaccgcgc	ccccacattt	ctgtcctctg	cgcgtgggtt	gattgtttat	780
atttcattgt	aaatgcctgc	aaccaggggc	agggggctga	gaccttccag	gccctgagga	840
atcccgggcg	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gaggggaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctgggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaaagcatt	ttaccgccc	tggggtttta	1020
agggagcggg	gtgggagtgg	gaaagtccag	ggactgggtt	agaaagtggg	ataagattcc	1080
cccttgacc	tcgctgcccc	tcagaaagcc	tgaggcgtgc	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtgggtttct	agtcctggct	ctgccactaa	cttgctgtgt	aaccttgaa	1200
tacacaattc	tccttcggga	cctcaatttc	cactttgtta	aatgaggggtg	gaggtgggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggtcact	tccagaattc	agagtgtgta	tgctctcttc	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaagta	aagagtctat	ttatggctga	catatttacg	gctgacaaac	1500
tcctggaaga	agctatgctg	cttcccagcc	tggcttcccc	ggatgtttgg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgagggg	1620
ggtagggagg	atagaaatca	catccgcccc	aacttcccaa	agagcagcat	ccctcccccg	1680
acccatagcc	atgtttttaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgacagg	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atctctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttacctaa	aagaatatta	ttgggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tctttttgaa	1980
aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgtaggtttt	aattgtttaa	aaaaaaaggt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcgttttt	ttggcaattc	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
atctattttc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagtttttc	ttgtagagaa	tgacaatgtt	2220
aatattgctt	tatgaattaa	cagtctgttc	ttccagagtc	cagagacatt	gttaataaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

- 151 -

<210> 8  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

5

<400> 8

```

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

```

- 152 -

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

5

<400> 9  
 atgcagctcc cactggccct gtgtcttgct tgctgctgg tacacgcagc ctcccggtga 60  
 gtggaggggcc aggggtggca ggccttcaag aatgatgcca cggaaatcat ccccgagctc 120  
 ggagagtacc ccgagcctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa ccgggcggag 180  
~~aatggagggc ggcctcccca ccaccccttt gagaccaaag acgtgtccga gtacagctgc 240~~  
 cgagagctgc acttcacccg ctacgtgacc gatgggcccgt gccgcagcgc caagccagtc 300  
 accgagttgg tgtgctccgg ccagtgcggc ccggcacgcc tgctgccccaa cgccatcggc 360  
 cgcggaagt ggtggcgccc gagtgggccc gacttcgct gcatccccga ccgctaccgc 420  
 gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccgtt ggtgccgcgc cgcgcgcgcg caaggtgcgc 480  
 ctggtggcct cgtgcaagtg caagcgctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag 540  
 gacttcggtc ccgagggcgc tcggccgcag aagggccgga agccgcggcc ccgcgcccgg 600  
 ggggccaaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag 642

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

10

<400> 10

15

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



- 153 -

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

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

<400> 11

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgct 60  
 gtggaggggc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagagggtcat ccaggggctt 120  
 ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga 180  
 ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgcc aaaggtgtgt ccgagtacag ctgccgcgag 240  
 ctgcactaca cccgcttcct gacagacggc ccattgccga gcgccaagcc ggtcaccgag 300  
 ttggtgtgct cgggccagtg cggccccgcg cggtgtgtgc ccaacgccat cgggcgctg 360  
 aagtgggtggc gcccgaacgg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta ccgcgcgcag 420  
 cgggtgcagc tgctgtgccc cgggggcgcg gcgcgcgcgt cgcgcaaggt gcgtctggtg 480  
 gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgcg ttccacaacc agtcggagct caaggacttc 540  
 gggccggaga ccgcgcggcc gcagaagggt cgcaagccgc ggcccggcgc ccggggagcc 600  
 aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactagag 638

<210> 12

- 154 -

<211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 12

```

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

```

<210> 13  
 <211> 674

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 13

```

gaggaccgag tgccttcct ccttctggca ccatgcagct ctactagcc ccttgcttg      60
cctgcctgct tgtacatgca gccttcgttg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca    120
agaatgatgc cacagaaatc atcccgggac tcagagagta cccagagcct cctcaggaac    180
tagagaacaa ccagaccatg aaccggggcg agaacggagg cagaccccc caccatcctt    240
atgacaccaa agacgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc cgcttcgtga    300
ccgacggccc gtgccgcagt gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg    360
gccccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc ccgaacggac    420
ccgacttcctg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg    480
gcggcgcgcc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctggtggc ctctgcaag tgcaagcgcc    540
tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggccgc    600
agaagggctg caagccgcgg ccccgcgccc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg    660
agaacgcta ctag                                     674

```

5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 213

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 5

```

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

```

- 156 -

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

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

<400> 5  
  
 agaatgatgc cacagaaatc atccccgagc tgggagagta ccccgagcct ctgccagagc 60  
 tgaacaacaa gaccatgaac cgggagggaga acggagggag acctccccac caccctttg 120  
 agaccaaaga cgctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcaccgc tacgtgaccg 180  
 atgggccgtg cgcagcgcc aagccgggtca ccgagctgggt gtgctcgggc cagtgcggcc 240  
 cggcgcgctt gctgccaac gccatcggcc gcggaagtgt gtggcgccca agcggggccc 300  
 acttcgctg catccccgac cgctaccgcg cgcagcgggt gcagctgttg tgtcctggcg 360  
 gcgcggcgcc gcgcgcgcgc aaggtgcgcc tgggtggcctc gtgcaagtgc aagcgctca 420  
 ctgccttcca caaccagtc gagctcaagg acttcgggcc cgaggccgcg cggccgcaaa 480  
 cgggcccqaa actgcggccc cggcggggg gaccaaagc cggcggggcc ga 540

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

- 157 -

&lt;400&gt; 16

```

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

```

&lt;210&gt; 17

5 &lt;211&gt; 35828

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; rasgos\_misc

&lt;222&gt; (1)...(35828)

&lt;223&gt; n=A,T,C o G

&lt;400&gt; 17

15

cgcgtttttg	tgagcagcaa	tattgcgctt	cgatgagcct	tggcgttgag	attgatacct	60
ctgctgcaca	aaaggcaatc	gaccgagctg	gaccagcgca	ttcgtgacac	cgtctccttc	120
gaacttattc	gcaatggagt	gtcattcatc	aaggacngcc	tgatcgcaaa	tgggtgctatc	180
cacgcagcgg	caatcgaaaa	ccctcagccg	gtgaccaata	tctacaacat	cagccttggt	240
atcctgcggtg	atgagccagc	gcagaacaag	gtaaccgtca	gtgccgataa	gttcaaagtt	300
aaacctgggtg	ttgataccaa	cattgaaacg	ttgatcgaaa	acgcgctgaa	aaacgctgct	360
gaatgtgcgg	cgctggatgt	cacaaagcaa	atggcagcag	acaagaaagc	gatggatgaa	420
ctggcttctt	atgtccgcac	ggccatcatg	atggaatgtt	tccccgggtg	tgttatctgg	480
cagcagtgcc	gtcगतatgta	tgcaattgat	aattattatc	atttgcgggg	cctttccggc	540
gateegcett	gttaecgggg	ggcgacctcg	cgggttttctg	ctatfttatga	aaatfttccg	600
gtttaaggcg	tttccgttct	tcttcgtcat	aacttaaatgt	ttttatttaa	aataccctct	660
gaaaagaaag	gaaacgacag	gtgctgaaag	cgagcttttt	ggcctctgtc	gtttcctttc	720
tctgtttttg	tccgtggaat	gaacaatgga	agtcaacaaa	aagcagagct	tatcgatgat	780
aagcgggtcaa	acatgagaat	tcgcggccgc	ataatacgac	tactatagg	gatcgacgcc	840
tactccccgc	gcatgaagcg	gaggagctgg	actccgcatg	cccagagacg	ccccccaacc	900
cccaaagtgc	ctgacctcag	cctctaccag	ctctggcttg	ggcttgggcg	gggtcaaggc	960
taccacgttc	tcttaacagg	tggctgggct	gtctcttggc	cgcgcgatcat	gtgacagctg	1020
cctagtctctg	cagtgaggct	accgtggaat	gtctgccttc	gttgccatgg	caacgggatg	1080
acgttacaat	ctgggtgtgg	agcttttctt	gtccgtgtca	ggaaatccaa	ataccctaaa	1140
ataccctaga	agaggaagta	gctgagccaa	ggctttcctg	gcttctccag	ataaagtgtg	1200
acttagatgg	aaaaaaacaa	aatgataaag	acccgagcca	tctgaaaatt	cctcctaatt	1260
gcaccactag	gaaatgtgta	tattattgag	ctcgtatgtg	ttcttatttt	aaaaagaaaa	1320
cttttagtcat	gttattaata	agaatttctc	agcagtggga	gagaaccaat	attaacacca	1380
agataaaaagt	tggcatgac	cacattgcag	gaagatccac	gttgggtttt	catgaatgtg	1440
aagaccccat	ttattaaagt	cctaagctct	gtttttgcac	actaggaagc	gatggccggg	1500
atggctgagg	ggctgtaagg	atctttcaat	gtcttacatg	tgtgtttcct	gtcctgcacc	1560
taggacctgc	tgccatagct	gcagcagagc	cagagggggt	tcacatgatt	agtctcagac	1620
acttgggggc	aggttgcatg	tactgcatcg	cttattttcca	tacggagcac	ctactatgtg	1680
tcaaacacca	tatggtgttc	actcttcaga	acggtgggtg	tcacatgggt	gcatttgctg	1740
acggttggat	tgggtgtaga	gagctgagat	atatggacgc	actcttcagc	attctgtcaa	1800
cgtggctqtq	cattcttgct	cctgagcaag	rggrraaca	gactcacagg	gtcagcctcc	1860
agctcagtcg	ctgcatagtc	ttaggggaacc	tctcccagtc	ctccctacct	caactatcca	1920
agaagccagg	gggcttggcg	gtctcaggag	cctgcttgct	gggggacagg	ttgttgagtt	1980
ttatctgcag	taggttgctt	aggcatagtg	tcaggactga	tggctgcctt	ggagaacaca	2040
tcttttggcc	tctatgcaaa	tctgaccttg	acatgggggc	gctgctcagc	tgggaggatc	2100
aactgcatac	ctaaagccaa	gcctaaagct	tcttcgtcca	cctgaaactc	ctggaccaag	2160

gggcttccgg	cacatcctct	caggccagt	agggagtctg	tgtgagctgc	actttccaat	2220
ctcagggcgt	gagagggcaga	gggaggtggg	ggcagagcct	tgcagctctt	tcctccccatc	2280
tggacagcgc	tctggctcag	cagcccatat	gagcacaggc	acatccccac	cccacccccca	2340
cctttcctgt	cctgcagaat	ttaggctctg	ttcacggggg	gggggggggg	ggggcagtc	2400
tatcctctct	taggtagaca	ggactctgca	ggagacactg	ctttgtaaga	tactgcagtt	2460
taaatttgga	tgttgtagg	ggaaagcgaa	gggcctcttt	gaccattcag	tcaagggtacc	2520
ttctaactcc	catcgattg	gggggctact	ctagtgtcag	acattgcaga	gagcctcaga	2580
actgtagtta	ccagtgtggt	aggattgatc	cttcaggagg	cctgacatgt	gacagttcca	2640
ttcttcaccc	agtcaccgaa	catttattca	gtacctaccc	cgtaacaggc	accgtagcag	2700
gtactgaggg	acggaccact	caaagaactg	acagaccgaa	gccttggaat	ataaacacca	2760
aagcatcagg	ctctgccaac	agaacactct	ttaacactca	ggccctttaa	cactcaggac	2820
ccccaccccc	acccaagca	gttggcactg	ctatccacat	tttacagaga	ggaaaaacta	2880
ggcacaggac	gatataagt	gcttgcttaa	gcttgctctg	atggtaaagt	gcagggtcgg	2940
attgagaccc	agacattcca	actctagggt	ctatttttct	tttttctcgt	tgttcgaatc	3000
tgggtcttac	tgggtaaact	caggctagcc	tcacactcat	atccttctcc	catggcttac	3060
gagtgttagg	attccagggt	tgtgttacca	tgtctgactc	cctgtagctt	gtctatacca	3120
tcctcacaac	ataggaattg	tgatagcagc	acacacaccg	gaaggagctg	gggaaatccc	3180
acagagggct	ccgcaggatg	acaggcgaa	gcctacacag	aagggtggga	agggaagcag	3240
agggaacagc	atgggcgtgg	gaccacaagt	ctatttgagg	aagctgccgg	taaccgtata	3300
tggctgggg	gaggggagag	gtcatgagat	gaggcaggaa	gagccacagc	aggcagcggg	3360
tacgggctcc	ttattgccaa	gaggctcgga	tcttctctct	cttctctctt	ccggggctgc	3420
ctgttcattt	tccaccactg	cctcccatcc	aggctctgtg	ctcaggacat	caccagctg	3480
cagaaactgg	gcatacccca	cgctctgaat	gctgccgagg	gcaggctcct	catgcacgtc	3540
aacaccagtg	ctagcttcta	cgaggattct	ggcatcacct	acttgggcat	caaggccaat	3600
gatacgagg	agttcaacct	cagtgtctac	tttgaaagg	ccacagattt	cattgaccag	3660
gcgctggccc	ataaaaatgg	taaggaaagt	acattccggc	acccatggag	cgtaagccct	3720
ctgggacctg	cttctccaa	agaggccccc	acttgaaaaa	ggttccagaa	agatcccaaa	3780
atatgccacc	aactagggat	taagtgtcct	acatgtgagc	cgatgggggc	cactgcataat	3840
agtctgtgcc	atagacatga	caatggataa	taatatttca	gacagagagc	aggagttagg	3900
tagctgtgct	cctttccctt	taattgagtg	tgccattttt	tttattcatg	tatgtgtata	3960
catgtgtgtg	cacacatgcc	ataggttgat	actgaacacc	gtcttcaatc	gttccccacc	4020
ccaccttatt	ttttgaggca	gggtctcttc	cctgatacctg	gggtcattg	gtttatctag	4080
gctgtggccc	agtgagctct	ggagttctgc	ttttctctac	ctccctagcc	ctgggactgc	4140
aggggcatgt	gctgggccc	gcttttatgt	cgcggtgggg	atctgaactt	aggcccttag	4200
gcctgagcac	cgtaaagact	ctgccacatc	cccagcctgt	ttgagcaagt	gaaccattcc	4260
ccagaattcc	cccagtgggg	ctttctctacc	cttttatttg	ctaggcattc	atgagtgggc	4320

acctcgccag aggaatgagt ggccacgact ggctcagggc cagcagccta gagatactgg	4380
gttaagtctt cctgccgctc gctccctgca gccgcagaca gaaagtagga ctgaatgaga	4440
gctggctagt ggtcagacag gacagaaggc tgagaggggtc acagggcaga tgtcagcaga	4500
gcagacaggt tctccctctg tgggggaggg gtggccact gcaggtgtaa ttggccttct	4560
ttgtgctcca tagaggcttc ctgggtacac agcagcttcc ctgtcctggg gattcccaaa	4620
gagaactccc taccactgga cttacagaag ttctattgac tgggtgtaacg gttcaacagc	4680
tttggctctt ggtggacggg gcatactgct gtatcagctc aagagctcat tcacgaatga	4740
acacacacac acacacacac acacacacac acacaagcta attttgatat gccttaacta	4800
gctcagtgac tgggcatttc tgaacatccc tgaagttagc acacatttcc ctctgggtgtt	4860
<del>cctggettaa caeettctaa atctatat</del> <del>ttt tatctttt</del> <del>gct gccctgttac cttctgagaa</del>	<del>4920</del>
gcccttaggg ccacttccct tcgcacctac attgctggat ggtttctctc ctgcagctct	4980
taaatctgat ccctctgcct ctgagccatg ggaacagccc aataactgag ttagacataa	5040
aaacgtctct agccaaaact tcagctaaat ttagacaata aatcttactg gttgtggaat	5100
ccttaagatt cttcatgacc tccttcacat ggcacgagta tgaagcttta ttacaattgt	5160
ttattgatca aactaactca taaaaagcca gttgtctttc acctgctcaa ggaaggaaca	5220
aaattcatcc ttaactgatc tgtgcacctt gcacaatcca tacgaatatc ttaagagtac	5280
taagattttg gttgtgagag tcacatgtta cagaatgtac agctttgaca aggtgcatcc	5340
ttgggatgcc gaagtgacct gctgttccag cccctacctt tctgaggctg ttttggaagc	5400
aatgctctgg aagcaacttt aggaggtagg atgctggaac agcgggtcac ttcagcatcc	5460
cgatgacgaa tcccgtcaaa gctgtacatt ctgtaacaga ctgggaaagc tgcagacttt	5520
aaggccaggg ccctatgggc cctcttaatc cctgtcacac ccaaccgag cccttctcct	5580
ccagccgttc tgtgcttctc actctggata gatggagaac acggccttgc tagttaagg	5640
agtgaggctt cacccttctc acatggcagt ggttgggtcat cctcattcag ggaactctgg	5700
ggcattctgc ctttacttcc tctttttgga ctacagggaa tatatgctga cttgttttga	5760
ccttgtgtat ggggagactg gatctttggg ctggaatgtt tcctgctagt ttttcccat	5820
cctttggcaa accctatcta tatcttacca ctaggcatag tggccctcgt tctggagcct	5880
gccttcaggg tgggtctcgg ggaccatgtc cctggtttct cccagcata tgggtgtcac	5940
agtgttcaact gcgggtgggt gctgaacaaa gcggggattg catcccagag ctccggtgcc	6000
ttgtgggtac actgctaaga taaaatggat actggcctct ctctgaccac ttgcagagct	6060
ctgggtgcctt gtgggtacac tgctaagata aaatggatac tggcctctct ctatccactt	6120
gcaggactct aggqaacaag aatccattac tgagaaaacc aggggctagg agcagggagg	6180
tagctgggca gctgaagtgc ttggcgacta accaatgaat accagagttt ggatctctag	6240
aatactctta aaatctgggt gggcagagtg gcctgcctgt aatcccagaa ctcgaggagg	6300
ggagacaggg aatcatcaga gcaaactggc taaccagaat agcaaaacac tgagctctgg	6360
gctctgtgag agatcctgcc ttaacatata agagagagaa taaaacattg aagaagacag	6420
tagatgccaa ttttaagccc ccacatgcac atggacaagt gtgcgtttga acacacatat	6480



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

gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggccg	8700
tccctggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tgggaaccaa	8760
acttgaatct aaagcaagca cttttaactg ctgaggcagc tctcagtacc cttcttcatt	8820
tctccgctg ggttccattg tatggacaca tgtagctaga atatcttgct tatctaatta	8880
tgtacattgt tttgtgctaa gagagagtaa tgctctatag cctgagctgg cctcaacctt	8940
gccatcctcc tgcctcagcc tcctcctcct gagtgctagg atgacaggcg agtggttaact	9000
tacatggttt catgttttgt tcaagactga aggataacat tcatacagag aaggtctggg	9060
tcacaaagtg tgcagttcac tgaatggcac aaccctgat caagaaacaa aactcagggg	9120
ctggagagat ggcactgact gctcttccag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca	9180
<del>tgggtggtca cagccateta taaegagatc tgacgcctc ttctggtgtg tctgaagaca</del>	<del>9240</del>
gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaaac acacacacac acacaattac	9300
caccccagaa agccactcc atgttcctc ccacgctctt gcctacagta cteccaggtt	9360
accactgttc aggtcttctaa caacctggtt tacttgggcc tcttttctgc tctgtggagc	9420
cacacatttg tgtgcctcat acacgttctt tctagtaagt tgcattattac tctgctttt	9480
tacatgtatt tatttattgt agttgtgtgt gcgtgtgggc ccatgcatgg cacagtgtgt	9540
ggggatgtca gagtattgtg aacaggggac agttcttttc ttcaatcatg tgggttccag	9600
aggttgaact caggtcatca tgtgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca	9660
tattcttttt ttttccctg aggtgggggc ttgttcata gcccaaactg gctttgcact	9720
tgcagttcaa agtgactccc tgtctccacc tcttagagta ttggaattac gatgtgtact	9780
accacacctg actggatcat taattctttg atggggcgcg ggaagcgac atgctgcagg	9840
tgaagggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaattgc	9900
tctcccaact gagctatttc ggtttgccag agaacaactt acagaaagtt ctcagtgcc	9960
tgtggattcg gggttggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctct acccactgag	10020
ccttctcact actctctacc tagatcatta attctttttt aaaaagactt attagggggc	10080
tggagagatg gctcagccgt taagagcacc gaatgccctt ccagaggctc tgaagtcaat	10140
tcccagcatg ccattgctgg gcagtagggg gcgcagggtg tcaacgtgag tagctgttgc	10200
cagttttccg cgggtggagaa cctcttgaca cctgctgtc cctggtcatt ctgggtgggt	10260
gcatggtgat atgcttgttg tatggaagac tttgactgtt acagtgaagt tgggcttcca	10320
cagttaccac gtctccctg tttcttgag gccgggtgct tgtccattgc cgcgagggct	10380
acagccgtc cccaacgcta gttatgcct acctcatgat gcggcagaag atggacgtca	10440
agtctgctct gactactgtg aggcagaatc qtgagatcgg ccccaacgat ggttccctgg	10500
cccaactctg ccagctcaat gacagactag ccaaggaggg caaggtgaaa ctctaggggtg	10560
cccacagcct cttttgcaga ggtctgactg ggagggccctt ggcagccatg tttaggaaac	10620
acagtatacc cactccctgc accaccagac acgtgcccac atctgtccca ctctggctct	10680
cgggggccac tccaccctta gggagcacat gaagaagctc cctaagaagt tctgctcctt	10740
agccatcctt tcctgtaatt tatgtctctc cctgaggtga ggttcaggtt tatgtccctg	10800

tctgtggcat	agatacatct	cagtgaacca	gggtgggagg	gctatcaggg	tgcattggccc	10860
gggacacggg	cactcttcat	gacccctccc	ccacctgggt	tcttcctgtg	tgggccagaa	10920
ccacgagcct	ggtaaaggaa	ctatgcaaac	acaggccctg	acctcccat	gtctgttcct	10980
ggtcctcaca	gcccgcacag	ccctgctgag	gcagacgaat	gacattaagt	tctgaagcag	11040
agtggagata	gattagtgac	tagatttcca	aaaagaagga	aaaaaaaggc	tgcatttttaa	11100
aattatttcc	ttagaattaa	agatactaca	tagggggcct	tgggtaagca	aatccatttt	11160
tcccagaggc	tatcttgatt	ctttggaatg	tttaaagtgt	gccttgccag	agagcttacg	11220
atctatatct	gctgcttcag	agccttcctt	gaggatggct	ctgttccttt	gcttggttaga	11280
agagcgatgc	cttgggcagg	gtttccccc	tttcagaata	cagggtgtaa	agtccagcct	11340
attacaaaca	aacaaacaaa	caaacaaaca	aaggacctcc	atttgagaaa	ttgcaaggat	11400
tttatcctga	attatagtgt	tgggtgagtc	aagtcatcac	gccaaagtgt	tgccatcctg	11460
gttgctattc	taagaataat	taggaggagg	aacctagcca	attgcagctc	atgtccgtgg	11520
gtgtgtgcac	gggtgcatat	gttgaagggt	gtgcctgtcc	ccttggggac	agaagggaaa	11580
tgaaaggccc	ctctgctcac	cctggccatt	tacgggaggc	tctgctgggt	ccacggtgtc	11640
tgtgcaggat	cctgaaactg	actcgctgga	cagaaacgag	acttggcggc	accatgagaa	11700
tggagagaga	gagagcaaag	aaagaaacag	cctttaaaag	aactttctaa	gggtggtttt	11760
tgaacctcgc	tggaccttgt	atgtgtgcac	atttgccaga	gattgaacat	aatcctcttg	11820
ggacttcacg	ttctcattat	ttgtatgtct	ccggggtcac	gcagagccgt	cagccaccac	11880
cccagcacc	ggcacatagg	cgtctcataa	aagcccattt	tatgagaacc	agagctgttt	11940
gagtacccc	tgtatagaga	gagttgttgt	cgtggggcac	ccgatccca	gcagcctgg	12000
tgcctgcctg	taggatgtct	tacaggagtt	tgcagagaaa	ccttccttgg	agggaaagaa	12060
atatcaggga	tttttggtga	atatttcaaa	ttcagcttta	agtgtgaag	tcagcagtg	12120
tcatggttaa	ggtaaggga	atgccttttc	cagagctgct	gcaagaggca	ggagaagcag	12180
acctgtctta	ggatgtcact	cccagggtaa	agacctctga	tcacagcagg	agcagagctg	12240
tgcagcctgg	atggtcattg	tcccctattc	tgtgtgacca	cagcaaccct	ggtcacatag	12300
ggctgggtcat	cctttttttt	tttttttttt	tttttttttg	gcccagaatg	aagtgaccat	12360
agccaagttg	tgtacctcag	tcttttagtt	ccaagcggct	ctcttgctca	atacaatgtg	12420
catttcaaaa	taacactgta	gagttgacag	aactggttca	tgtgttatga	gagaggaaaa	12480
gagaggaaa	aacaaaacaa	aacaaaacac	cacaaaccaa	aaacatctgg	gctagccagg	12540
catgattgca	atgtctacag	gcccagttca	tgagaggcag	agacaggaag	accgccgaaa	12600
ggtaaggat	agcatgggt	acgtatcgag	actcagcca	gggctacgg	cccaagatcc	12660
taggttttg	atgttgggt	ttgggttttg	agacagggt	tctctgtgta	gccctggctg	12720
tcctggaact	cgctctgtag	accaggctgg	cctcaaactt	agagatctgc	ctgactctgc	12780
ctttgagggc	tgggacgaat	gccaccactg	cccaactaag	attccattaa	aaaaaaaaaa	12840
agttcaagat	aattaagagt	tgccagctcg	ttaaagctaa	gtagaagcag	tctcaggcct	12900
gctgcttgag	gctgttcttg	gcttggacct	gaaatctgcc	cccaacagtg	tccaagtgca	12960

catgactttg agccatctcc agagaaggaa gtgaaaattg tggctcccca gtcgattggg	13020
acacagtctc tctttgtcta ggtaacacat ggtgacacat agcattgaac tctccactct	13080
gaggggtggg ttcctccccc ctgcctcttc tgggttgggc accccatagg acagccacag	13140
gacagtcact agcacctact ggaaacctct ttgtgggaac atgaagaaag agccttttggg	13200
agattcctgg ctttccatta gggctgaaag tacaacggtt cttggttggc tttgcctcgt	13260
gtttataaaa ctagctacta ttcttcaggt aaaataccga tgttgtggaa aagccaaccc	13320
cgtggctgcc cgtgagtagg ggggtggggtt ggggaatcctg gatagtgttc tatccatgga	13380
aagtgggtga ataggaatta aggggtgttcc cccccccccc aacctcttcc tcagaccag	13440
ccactttcta tgacttataa acatccaggt aaaaattaca aacataaaaa tggtttctct	13500
<del>tetcaatctt</del> <del>ctaaagtctg</del> <del>cctgcctttt</del> <del>ccaggggtag</del> <del>gtctgtttct</del> <del>ttgctgttct</del>	13560
attgtcttga gagcacagac taacacttac caaatgaggg aactcttggc ccatactaag	13620
gctcttctgg gctccagcac tcttaagtta ttttaagaat tctcacttgg ccttttagcac	13680
acccgccacc cccaagtggg tgtggataat gccatggcca gcagggggca ctggtgaggg	13740
gggtgccttt ccaccttaag ttgcttatag tatttaagat gctaaatgtt ttaatcaaga	13800
gaagcactga tcttataata cgaggataag agattttctc acaggaaatt gtctttttca	13860
taattctttt acaggctttg tcctgatcgt agcatagaga gaatagctgg atatttaact	13920
tgtattccat ttctctctgc cagcgttagg ttaactccgt aaaaagtgat tcagtggacc	13980
gaagaggctc agagggcagg ggatgggtgg gtgaggcaga gcactgtcac ctgccaggca	14040
tgggaggtcc tgccatccgg gagggaaaagg aaagtttagc ctctagtcta ccaccagtgt	14100
taacgcactc taaagtgtga accaaaaataa atgtcttaca ttacaaagac gtctgttttg	14160
tgtttccttt tgtgtgtttg ggctttttat gtgtgcttta taactgctgt ggtggtgctg	14220
ttgttagttt tgaggtagga tctcaggctg gccttgaact tctgatcgcc tgcccctgcc	14280
cctgcccctg cccctgtccc tgccctccaag tgctaggact aaaagcacat gccaccacac	14340
cagtacagca tttttctaac atttaaaaat aatcacctag gggctggaga gagggttcca	14400
gctaagagtg cacactgctc ttgggttagga cctgagttta gttcccagaa cctatactgg	14460
gtggctccag gtccagagga tccaggacct ctggcctcca tgggcatctg ctcttagcac	14520
ataccacat acagatacac acataaaaat aaaatgaagc ctttaaaaac ctcttaaac	14580
ctagcccttg gaggtacgac tctggaaagc tggcatactg tgtaagtcca tctcatggtg	14640
ttctggctaa cgtaagactt acagagacag aaaagaactc aggggtgtgct ggggggttggg	14700
atggaggaag agggatgagt agggggagca cggggaactt gggcagtga aattctttgc	14760
aggacactaa aqagagataa ataccagtrc ttgcacccac tactggacaa ctccagggaa	14820
ttatgctggg tgaagagaga agggcccgagg tattggctgc attggctgca tttgcgtaac	14880
atttttttaa attgaaaaga aaaagatgta aatcaagggt agatgagtgg ttgctgtgag	14940
ctgagagctg ggggtgagtga gacatgtgga caactccatc aaaaagcgac agaaagaacg	15000
ggctgtggtg acagctacct ctaatctcca cctccgggag gtgatcaagg ttagccctca	15060
gctagcctgt ggtgcatgag acctgtttc aaaaacttta ataaagaaat aatgaaaaaa	15120

gacatcaggg	cagatccttg	gggccaaagg	cggacaggcg	agtctcgtgg	taaggctcgtg	15180
tagaagcggg	tgcattgagca	cgtgccgcag	gcattcatgag	agagccctag	gtaagtaagg	15240
atggatgtga	gtgtgtcggc	gtcggcgcac	tgcacgtcct	ggctgtgggtg	ctggactggc	15300
atctttgggtg	agctgtggag	gggaaatggg	tagggagatc	ataaaatccc	tccgaattat	15360
ttcaagaact	gtctattaca	attatctcaa	aatattaaaa	aaaaagaaga	attaaaaaac	15420
aaaaaaccta	tccaggtgtg	gtgggtgtgca	cctatagcca	cgggcacttg	gaaagctgga	15480
gcaagaggat	ggcgagtgtg	aaggtatctg	gggctgtaca	gcaagaccgt	cgtcccaaaa	15540
ccaaacccaa	cagcaaacc	attatgtcac	acaagagtgt	ttatagttag	cggcctcgct	15600
gagagcatgg	ggtgggggtg	gggggtgggg	acagaaatat	ctaaactgca	gtcaataggg	15660
atccactgag	accctggggc	ttgactgcag	cttaaccttg	ggaaatgata	agggttttgt	15720
gttgagttaa	agcatcgatt	actgacttaa	cctcaaataa	agaaaaagaa	aaaaagaaaa	15780
caacaaaagc	caaaccaagg	ggctgggtgag	atggctcagt	gggtaagagc	acccgactgc	15840
tcttccgaag	gtccagagtt	caaataccag	caaccacatg	gtggctcaca	accatctgta	15900
acgagatatg	atgccctctt	ctgggtgtgtc	tgaagacagc	tacagtgtac	ttacatataa	15960
taaataaatc	ttaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaagccaaa	ccgagcaaac	caggccccc	16020
aacagaaggg	aggcacgacg	gcaggcacca	cgagccatcc	tgtgaaaagg	caggggctacc	16080
catgggccga	ggagggtcca	gagagatagg	ctggtaagct	cagtttctct	gtataccctt	16140
tttcttggtg	acactacttc	aattacagat	aaaataacaa	ataaacaaaa	tctagagcct	16200
ggccactctc	tgctcgcttg	atctttctctg	ttacgtccag	cagggtggcg	aagtgttcca	16260
aggacagatc	gcattcattaa	ggtggccagc	ataatctccc	atcagcaggt	ggtgctgtga	16320
gaaccattat	ggtgctcaca	gaatcccggg	cccaggagct	gccctctccc	aagtctggag	16380
caataggaaa	gctttctggc	ccagacaggg	ttaacagtc	acattccaga	gcaggggaaa	16440
aggagactgg	aggtcacaga	caaaagggcc	agcttctaac	aacttcacag	ctctggtagg	16500
agagatagat	cacccccaac	aatggccaca	gctgggttttg	tctgccccga	aggaaactga	16560
cttaggaagc	aggtatcaga	gtcccccttc	tgaggggact	tctgtctgcc	ttgtaaagct	16620
gtcagagcag	ctgcattgat	gtgtgggtga	cagaagatga	aaaggaggac	ccaggcagat	16680
cgccacagat	ggaccggcca	cttacaagtc	gaggcagggtg	gcagagcctt	gcagaagctc	16740
tgcaggtgga	cgacactgat	tcattaccca	gttagcatac	cacagcgggc	taggcggacc	16800
acagcctcct	tcccagtcct	cctccagggc	tggggagtc	tccaaccttc	tgtctcagtg	16860
cagcttcgc	cagccccctc	tccttttgca	cctcaggtgt	gaacctctcc	tcctctcctt	16920
ctccctgtgg	catggccctc	ctgctaactg	aggctgagca	ttggatttct	ttgtgcttag	16980
atagacctga	gatggctttc	tgatttatat	atatatatcc	atcccttgga	tcttacatct	17040
aggacccaga	gctggttgtg	ataccataag	aggctgggga	gatgatattg	taagagtgtc	17100
tgctgtacaa	gcattgaagc	atgagttcga	atccccagca	accatgtgga	aaaataacct	17160
tctaacctca	gagttgaggg	gaaaggcagg	tggattctgg	gggcttactg	gccagctagc	17220
cagcctaacc	taaatgtctc	agttagagat	cctgtctcag	ggaataacct	gggagaatga	17280

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

cacatgctgt ccctcctgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccaccccaa	19500
aggagcatgc aatgcagtca cgtttttgca gaggaagtgc ttgacctaaag ggcactattc	19560
ttggaaagcc ccaaaactag tccttccctg ggcaaacagg cctccccac ataccacctc	19620
tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaaggggtggc aaggcctaca cctccccct	19680
gttgtgcccc ccccccccc gtgaagggtgc atcctggcct ctgccccctt ggctttggta	19740
ctgggatttt ttttttcctt ttatgtcata ttgatectga caccatggaa cttttggagg	19800
tagacaggac ccacacatgg attagttaaa agcctcccat ccatctaagc tcatggtagg	19860
agatagagca tgtccaagag aggagggcag gcatacagacc tagaagatat ggctgggcat	19920
ccaacccaat ctccctcccc ggagaacaga ctctaagtca gatccagcca cccttgagta	19980
accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggtataca gcagggtgcta aacaaatgct	20040
tgtggtagca aaagctatag gttttgggtc agaactccga cccaagtcgc gagtgaagag	20100
cgaaaggccc tctactcgcc accgccccgc cccacactgg ggtcctataa cagatcactt	20160
tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atcctaggtg gcccccccg ccccccccc	20220
gcaagcagcc cagccctgcc tttggggcaa gttcttttct cagcctggac ctgtgataat	20280
gaggggggtg gacgcgcgc ctttggtcgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc	20340
acctgcctt ctaccccgt cctccacagc agctgtcctg atttattacc ttcaattaac	20400
ctccactcct ttctccatct cctgggatac cgccctgtc ccagtggctg gtaaaggagc	20460
ttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggctaccag gcagggtgg ggatgaggag	20520
ctaaactgga agagtgtttg gttagtaggc acaaagcctt ggggtgggac cctagtaccg	20580
gagaagtgga gatgggcgct gagaagtcca agaccatcca tccttaacta cacagccagt	20640
ttgaggccag cctgggctac ataaaaacc aatctcaaaa gctgccaatt ctgattctgt	20700
gccacgtagt gcccgatgta atagtggatg aagtcgttga atcctggggc aacctatttt	20760
acagatgtgg ggaaaagcaa ctttaagtac cctgcccaca gatcaciaag aaagtaagtg	20820
acagagctcc agtgtttcat ccctgggttc caaggacagg gagagagaag ccagggtggg	20880
atctcactgc tccccggtgc ctcttccta taatccatac agattcgaaa gcgcagggca	20940
ggtttgaaa aagagagaag ggtggaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc	21000
tcacgcattc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc	21060
cgcttctga cagacggccc atgcccagc gccaaagcgg tcaccgagtt ggtgtgctcc	21120
ggccagtgcg gcccgcgcg gctgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc	21180
ccgaacggac cggatttccg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg	21240
ctgtgccccg ggggcgcggc gccgcgctcg cgcaaggtgc gtctggtggc ctctgcaag	21300
tgcaagcgcc tcaccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gccggagacc	21360
gcgcggccgc agaagggtcg caagccgcgg cccggcggc ggggagccaa agccaaccag	21420
gcggagctgg agaacgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcagcccc gcgcgatccg	21480
attcgtttct agtgtaaagc ctgcagccca ggccaggggt gccaaacttt ccagaccgtg	21540
tggagttccc agcccagtag agaccgcagg tccttctgcc cgctgcgggg gatggggagg	21600

gggtgggggtt cccgcggggcc aggagaggaa gcttgagtcc cagactctgc ctagccccgg	21660
gtgggatggg ggtctttcta ccctcgccgg acctatacag gacaaggcag tgtttccacc	21720
ttaaagggaa gggagtgtgg aacgaaagac ctgggactgg ttatggacgt acagtaagat	21780
ctactccttc cacccaaagtg taaagcctgc gtgggctaga tagggtttct gaccctgacc	21840
tggccactga gtgtgatgtt gggctacgtg gttctctttt ggtacggtct tctttgtaaa	21900
atagggaccg gaactctgct gagattccaa ggattggggg accccgtgta gactggtgag	21960
agagaggaga acaggggagg ggtagggga gagattgtgg tgggcaaccg cctagaagaa	22020
gctgtttgtt ggctcccagc ctgcgcgcct cagaggtttg gcttccccca ctccctcctc	22080
tcaaactctgc cttcaaatec atatctggga tagggaaggc cagggtcga gagatggtgg	22140
<del>aagggccaga aatcacactc ctggccccc gaagagcagt gtcccgcctt caactgcctt</del>	<del>22200</del>
gtcatattgt aaagggattt tctacacaac agtttaaggt cgttgaggga aactgggctt	22260
gccagtcacc tcccactctt gtcccttgcc aggacaccac ctccctgcctg ccacccacgg	22320
acacatttct gtctagaaac agagcgtcgt cgtgctgtcc tctgagacag catatcttac	22380
attaaaaaga ataatacggg gggggggggc ggaggggcga agtggtatac atatgctgag	22440
aagctgtcag gcgccacagc accacccaca atctttttgt aaatcatttc cagacacctc	22500
ttactttctg tgtagatttt aattgttaaa aggggaggag agagagcgtt tgtaacagaa	22560
gcacatggag gggggggtag ggggggtggg gctggtgagt ttggcgaact ttccatgtga	22620
gactcatcca caaagactga aagccgcgtt ttttttttta agagttcagt gacatattta	22680
ttttctcatt taagtatttt atgccaacat tttttcttg tagagaaagg cagtgttaat	22740
atcgctttgt gaagcacaag tgtgtgtggt tttttgtttt ttgttttttc cccgaccaga	22800
ggcattgtta ataaagacaa tgaatctcga gcaggaggct gtggtcttgt tttgtcaacc	22860
acacacaatg tctcgccact gtcatctcac tcccttccct tggtcacaag acccaaacct	22920
tgacaacacc tccgactgct ctctggtagc ccttgtggca atacgtgttt cctttgaaaa	22980
gtcacattca tcccttccct tgcaaacctg gctctcattc cccagctggg tcatcgtcac	23040
accctcacc cagcctccct ttagctgacc actctccaca ctgtcttcca aaagtgcacg	23100
tttcaccgag ccagttccct ggtccaggtc atcccattgc tccctcctgc tccagacctt	23160
tctcccacaa agatgttcat ctccactcc atcaagcccc agtggccctg cggctatccc	23220
tgtctcttca gttagctgaa tctacttgct gacaccacat gaattccttc ccctgtctta	23280
aggttcatgg aactcttgcc tgcccctgaa ccttccagga ctgtcccagc gtctgatgtg	23340
tcctctctct tgtaaagccc caccocacta tttgatcccc aattctagat cttcccttgt	23400
tcattccttc acgggagagt gtctcatctg gccaaagtcc gcttgataat yyyataaatg	23460
caaagccaag tacaattgag gaccagttca tcattggggc aagctttttt aaaatgtgaa	23520
ttttacacct atagaagtgt aaaagccttc caaagcagag gcaatgcctg gctcttcctt	23580
caacatcagg gctcctgctt tatgggtctg gtggggtagt acattcataa acccaacact	23640
aggggtgtga aagcaagatg attgggaggt cgaggccaat cttggctatg aggccctgtc	23700
tcaacctctc ctccctccct ccagggtttt gttttgtttt gtttttttga tttgaaactg	23760



caacacttta	aatccagtca	agtgcattctt	tgctgaggg	gaactctatc	cctaataataa	23820
gcttccatct	tgatttgtgt	atgtgcacac	tgggggttga	acctgggcct	ttgtacctgc	23880
cgggcaagct	ctctactgct	ctaaacccag	ccctcactgg	ctttctgttt	caactcccaa	23940
tgaattcccc	taaatgaatt	atcaatatca	tgtctttgaa	aaataccatt	gagtgcctgct	24000
gggtgccctg	tggttccaga	ttccaggaag	gacttttccag	ggaatccagg	catcctgaag	24060
aatgtcttag	agcaggaggc	catggagacc	ttggccagcc	ccacaaggca	gtgtgggtgca	24120
gagggtgagg	atggaggcag	gcttgcaatt	gaagctgaga	caggggtactc	aggattaaaa	24180
agcttcccc	aaaacaattc	caagatcagt	tcctgggtact	tgacactgtt	cagctatgca	24240
gagcccagtg	ggcatagggtg	aagacaccgg	ttgtactgtc	atgtactaac	tgtgcttcag	24300
agccggcaga	gacaaataat	gttatgggtga	ccccagggga	cagtgattcc	agaaggaaca	24360
cagaagagag	tgctgctaga	ggctgcctga	aggagaaggg	gtccagact	ctctaagcaa	24420
agactccact	cacataaaga	cacaggctga	gcagagctgg	ccgtggatgc	agggagccca	24480
tccaccatcc	tttagcatgc	ccttgtattc	ccatcacatg	ccagggatga	ggggcatcag	24540
agagtccaag	tgatgcccaa	acccaaacac	acctaggact	tgctttctgg	gacagacaga	24600
tgaggagag	actagggttg	gctgtgatcc	cattaccaca	aagagggaaa	aaacaaaaaa	24660
caacaaaca	aacaaaaaaa	aacaaaacaa	aacaaaaaaa	aacccaaggt	ccaaattgta	24720
ggtcaggtta	gagtttattt	atggaaagtt	atattctacc	tccatgggg	ctacaaggct	24780
ggcgcccatc	agaaagaaca	aacaacaggc	tgatctggga	gggggtgtac	tctatggcag	24840
ggagcacgtg	tgcttgggg	acagccagac	acggggcttg	tattaatcac	agggcttgta	24900
ttaataggct	gagagtcaag	cagacagaga	gacagaagga	aacacacaca	cacacacaca	24960
cacacacaca	cacacacaca	catgcacaca	ccactcactt	ctcactcgaa	gagcccctac	25020
ttacattcta	agaacaaacc	attcctcctc	ataaaggaga	caaagttgca	gaaacccaaa	25080
agagccacag	ggccccact	ctctttgaaa	tgacttggac	ttgttgacag	gaagacagag	25140
gggtctgcag	aggcttctctg	ggtgaccag	agccacagac	actgaaatct	ggtgctgaga	25200
cctgtataaa	ccctcttcca	caggttccct	gaaaggagcc	cacattcccc	aacctgtct	25260
cctgaccact	gaggatgaga	gcacttgggc	cttccccatt	cttgagtg	accctggttt	25320
ccccatctga	gggcacatga	ggtctcaggt	cttgggaaag	ttccacaagt	attgaaagtg	25380
ttcttgtttt	gtttgtgatt	taatttaggt	gtatgagtgc	ttttgcttga	atatatgcct	25440
gtgtagcatt	tacāagcctg	gtgcctgagg	agatcagaag	atggcatcag	ataccctgga	25500
actggacttg	cagacagtta	tgagccactg	tgtgggtgct	aggaacagaa	cctggatcct	25560
ccggaagagc	agacagccag	cgctcttagc	cactaagcca	tcactgaggt	tctttctgtg	25620
gctaaagaga	caggagacaa	aggagagttt	cttttagtca	ataggacct	gaatgttct	25680
cgtaacgtga	gactagggca	gggtgatccc	ccagtgcac	cgatggccct	gtgtagttat	25740
tagcagctct	agtcttattc	cttaataagt	cccagtttg	ggcaggagat	atgtattccc	25800
tgctttgaag	tggctgaggt	ccagttatct	acttccaagt	acttgtttct	ctttctggag	25860
ttggggaagc	tccctgcctg	cctgtaaatg	tgtccattct	tcaaccttag	acaagatcac	25920

tttccctgag	cagtcaggcc	agtccaaagc	ccttcaattt	agctttcata	aggaacaccc	25980
cttttggttg	gtggaggtag	cacttgccct	gaatcccagc	attaagaagg	cagagacagt	26040
cggatctctg	tgagttcaca	gccagcctgg	tctacggagt	gagttccaag	acagccaggc	26100
ctacacagag	aaaccctgtc	tcgaaaaaaa	caaaaacaaa	agaaataaag	aaaaagaaaa	26160
caaaaacgaa	caaacagaaa	aacaagccag	agtgtttgtc	cccgtatttt	attaatcata	26220
tttttgcccc	tttgccattt	tagactaaaa	gactcgggaa	agcaggtctc	tctctgtttc	26280
tcacccggac	acaccagaa	ccagatgtat	ggaagatggc	taatgtgctg	cagttgcaca	26340
tctggggctg	ggtaggttgg	ttagatggca	tgggctgggt	gtggttacga	tgactgcagg	26400
agcaaggagt	atgtggtgca	tagcaaacga	ggaagtttgc	acagaacaac	actgtgtgta	26460
<del>ctgatgtgea</del>	<del>ggtatgggca</del>	<del>catgcaagca</del>	<del>gaagccaagg</del>	<del>gacagcctta</del>	<del>gggtagtgtt</del>	26520
tccacagacc	cctccccctt	tttaacatgg	gcattctctca	ttggcctgga	gcttgccaac	26580
tgggctgggc	tggctagctt	gtaggtccca	gggatctgca	tatctctgcc	tccctagtgc	26640
tgggattaca	gtcatatatg	agcacacctg	gcttttttat	gtgggttctg	ggctttgaac	26700
ccagatctga	gtgcttgcaa	ggcaatcggc	tgaatgactg	cttcatctcc	ccagaccctg	26760
ggattctact	ttctattaaa	gtatttctat	taaatcaatg	agcccctgcc	cctgcactca	26820
gcagttctta	ggcctgctga	gagtcaagtg	gggagtgaga	gcaagcctcg	agaccccatc	26880
agcgaagcag	aggacaaaga	aatgaaaact	tgggattcga	ggctcgggat	atggagatac	26940
agaaagggtc	agggaaaggaa	atgaaccaga	tgaatagagg	caggaagggt	agggccctgc	27000
atacatggaa	cctgggtgtac	atgttatctg	catggggttt	gcattgcaat	ggctcttcag	27060
caggttcacc	acactgggaa	acagaagcca	aaaagaagag	taggtggtgt	tggagtcaga	27120
tactgtcagt	catgcctgaa	gaaatggaag	caattaacga	tgcgccgcaa	ttaggatatt	27180
agctccctga	agaaaggcaa	gaagctgggc	tgtgggcact	gaagggagct	ttgaatgatg	27240
tcacattctc	tgtatgccta	gcagggcagt	attggagact	gagacttgac	ttgtgtgtcc	27300
atatgattcc	tccttttcct	acagtcatct	ggggctcctg	agcttcgtcc	ttgtccaaga	27360
acctggagct	ggcagtgggc	agctgcagtg	atagatgtct	gcaagaaaga	tctgaaaaga	27420
gggaggaaga	tgaaggacct	agaggaccac	cgacctctgc	tgcctgacaa	agctgcagga	27480
ccagtctctc	ctacagatgg	gagacagagg	cgagagatga	atggtcaggg	gaggagtcat	27540
agaaaggaga	gggtgaggca	gagaccaaa	gagggaacaa	cttgtgctct	acagctactg	27600
actgagtacc	agctgcgtgg	cagacagcca	atgccaaggc	tcggctgatc	atggcacctc	27660
gtgggactcc	tagcccagtg	ctggcagagg	ggagtgtgta	atggtgcatg	gtttggatat	27720
gatctgaatq	tqqtccaqcc	ctagtttctt	tccagtgtgt	gggataaagc	accctgaccc	27780
aagctacttt	tttgtttgtt	tgttttggtt	tggtttttgt	tggtttttcg	aggcagggtt	27840
tctctgtatc	accctagctg	tcctggaact	cactctgtag	accaggctgg	cctcgaactc	27900
agaaatcccc	ctgectctgc	ctcctaagtg	ctggaattaa	aggcctgcgc	caccactgcc	27960
ggcccaaagc	tactttaaga	gagagagagg	aatgtataag	tattataatt	ccaggttata	28020
gttcattgct	gtagaattgg	agtcttcata	ttccaggtaa	tctccacag	acatgccaca	28080

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

caaaagcatg	catgtacacc	attcttatta	gactatgctt	tgctaaaaga	ctttcctaga	30300
tactttaaaa	catcacttct	gccttttggg	gggcagggtc	caagattggg	actggcgtag	30360
tggaaactga	acaaggtaga	gatctagaaa	tcacagcagg	tcagaagggc	cagcctgtac	30420
aagagagagt	tccacacctt	ccaggaacac	tgagcagggg	gctgggacct	tgccctctcag	30480
cccaagaaac	tagtgcggtt	cctgtatgca	tgccctctcag	agattccata	agatctgcct	30540
tctgccataa	gatctcctgc	atccagacaa	gcctagggga	agttgagagg	ctgcctgagt	30600
ctctcccaca	ggcccttctt	tgccctggcag	tattttttta	tctggaggag	aggaatcagg	30660
gtgggaatga	tcaaatacaa	ttatcaagga	aaaagtaaaa	aacatatata	tatatatatt	30720
aactgatcta	gggagctggc	tcagcagtta	agagttctgg	ctgcccttgc	ttcagatctt	30780
gctttgatto	ccagcaccca	catgatggct	ttcaactgta	tctctgcttc	caggggatcc	30840
aacagcctct	tctgacctcc	atagacaaga	cctagtcctc	tgcaagagca	ccaaatgctc	30900
ttatctgttg	atccatctct	ctagcctcat	gccagatcat	ttaaaactac	tggaactgtt	30960
cccattttac	gaagatgtca	ctgccagctc	atttgccatg	agtggatatt	tcgattcttt	31020
ctatgtttct	acccttgcaa	tttataagaa	agatatctgc	atttgtctcc	tgagagaaca	31080
aaggggtggag	ggctactgag	atggctctag	gggtaaaggt	gcttgccaca	aaatctgaca	31140
acttaagttt	ggtcttgga	tccacatggt	ggagagagag	aagagattcc	cgtaagttgt	31200
cctcaaactt	cccacacatg	tgctgtggct	tatgtgtaac	cccaataagt	aaagatagtt	31260
ttaaacacta	cataaggtag	ggtttcttca	tgaccccaag	gaatgatgcc	cctgatagag	31320
cttatgctga	aaccccatct	ccattgtgcc	atctggaaaag	agacaattgc	atcccggaaa	31380
cagaatcttc	atgaatggat	taatgagcta	ttaagaaagt	ggcttggtta	ttgcacatgc	31440
tggcggcgta	atgacctcca	ccatgatgtt	atccagcatg	aaggtcctca	ccagaagtca	31500
tacaaatctt	cttaggcttc	cagagtcgtg	agcaaaaaaa	gcacacctct	aaataaatta	31560
actagcctca	ggtagttaac	caccgaaaat	gaaccaaggc	agttctaata	caaaaccact	31620
tcccttccct	gttcaaacca	cagtgcctta	ttatctaaaa	gataaacttc	aagccaagct	31680
tttaggttgc	cagtatttat	gtaacaacaa	ggcccgttga	cacacatctg	taactcctag	31740
tactgggcct	caggggcaga	gacaggtgga	gccctggagt	ttgaattcca	ggttctgtga	31800
gaaactctgt	ctgaaaagac	aatatgggtg	gtgacccggg	aggatatctg	atattgactt	31860
ctggccaaca	cacagccatc	tctgcacatc	tgtagttgca	agccttttgc	actaagtttg	31920
gccagagtca	gagtttgcaa	gtgtttgtgg	actgaatgca	cgtgttgctg	gtgatctaca	31980
aagtcacctt	ccttctcaag	ctagcagcac	tggcttcggc	cagctgctca	ttcaagcctc	32040
tttgagaggt	catcacgggg	atggggggagc	agggcccttc	cctagaacac	caagcctgtg	32100
gttggtttatt	caggacatta	ttgagggcca	agatgacaga	taactctatc	acttggccaa	32160
cagtcgggtg	ttgcgggtgt	aggttatttc	tgtgtctgca	gaaaacagtg	caacctggac	32220
aaaagaaata	aatgatatac	tttttcattc	aggcaactag	attccgtggg	acaaaaggct	32280
ccctggggaa	cgaggccggg	acagcgcggc	tcctgagtcg	ctatttccgt	ctgtcaactt	32340
ctctaacttc	ttgatttcc	ccctctgtct	gtttcccttc	tcttgctggg	gccagtgga	32400

gtctgtgtac	tcacagggag	gaggggtggca	aagccctggt	cctctacggg	ctgggggaag	32460
gggggaagct	gtcggcccag	tgactttttc	ccctttctct	ttttcttaga	aaccagtctc	32520
aatttaagat	aatgagtctc	ctcattcacg	tgtgctcact	attcataggg	acttatccac	32580
ccccgccctg	tcaatctggc	taagtaagac	aagtcaaatt	taaaagggaa	cgttttttcta	32640
aaaatgtggc	tggaccgtgt	gccggcacga	aaccagggat	ggcgggtctaa	gttacatgct	32700
ctctgccagc	cccggtgcc	tttcctttcg	gaaaggagac	ccggaggtaa	aacgaagttg	32760
ccaacttttg	atgatgggtg	gcgcggggtg	actcttttaa	atgtcatcca	tacctgggat	32820
agggaaggct	cttcaggag	tcatctagcc	ctcccttcag	gaaaagattc	cacttccggt	32880
ttagttagct	tccacctggt	cccttatccg	ctgtctctgc	ccactagtcc	tcatccatcc	32940
ggtttccgcc	ctcatccacc	ttgccctttt	agttccctaga	aagcagcacc	gtagtcttgg	33000
caggtgggcc	attggtcact	ccgctaccac	tgttaccatg	gccaccaagg	tgtcatttaa	33060
atatgagctc	actgagtcct	gcgggatggc	ttggttggtg	atatgcttgc	tgcaaaatcg	33120
tgagaactgg	agttcaattc	ccagcacatg	gatgtatttc	cagcacctgg	aaggcagggg	33180
gcagagatct	taaagctcct	ggccagacag	cccagcctaa	ttagtaatca	gtgagagacc	33240
ctgtctcaag	aaacaagatg	gaacatcaaa	ggtcaacctc	ttgtctccac	acacacaaat	33300
acacacatgc	acatacatcc	acacacaggc	aaacacatgc	acacacctga	acaccctcca	33360
caaatacata	cataaaaaaa	taaatacata	cacacatata	tacatacacc	aacattccct	33420
ctccttagtc	tcctgggtac	gctcttgtea	ccccacttaa	ggcttcaact	tcttctattt	33480
cttcatcttg	actcctctgt	actttgcatg	ccttttccag	caaaggcttt	tctttaaatc	33540
tccgtcattc	ataaactccc	tctaaatttc	ttcccctgcc	cttttctttc	tctctagggg	33600
gataaagaca	cacactacaa	agtcaccgtg	ggaccagtgt	attcaccac	ccaccctgc	33660
ttctgttcat	ccggccagct	aagtagtcca	acctctctgg	tgctgtaccc	tggaccctgg	33720
cttcaccaca	gctcctccat	gctacccagc	cctgcaaacc	ttcagcctag	cctctggttc	33780
tccaaccagc	acaggcccag	tctggcttct	atgtcctaga	aatctccttc	attctctcca	33840
tttccctcct	gaatctacca	ccttctttct	cccttctcct	gacctctaat	gtcttggtca	33900
aacgattaca	aggaagccaa	tgaatttagc	agtttggggt	acctcagagt	cagcagggga	33960
gctgggatga	attcacattt	ccaggccttt	gctttgctcc	ccggattctg	acaggcagtt	34020
ccgaagctga	gtccaggaag	ctgaatttaa	aatcacactc	cagctggggt	ctgaggcagc	34080
cctaccacat	cagctggccc	tgactgagct	gtgtctgggt	ggcagtgggtg	ctggtgggtgc	34140
tggtgggtgct	gggtgggtgg	gtggtgggtg	tggtgggtgg	gggtgggtgg	tgtgtgtgtg	34200
ttttctgctt	ttacaaaact	tttctaattc	ttatacaaa	gacaaatctg	cctcatatag	34260
gcagaaagat	gacttatgcc	tatataagat	ataaagatga	ctttatgcca	cttattagca	34320
atagttactg	tcaaaagtaa	ttctatttat	acacccttat	acatggtatt	gcttttggtg	34380
gagactctaa	aatccagatt	atgtatttaa	aaaaaaattc	cccagtcctt	aaaaggtgaa	34440
gaatggaccc	agatagaagg	tcacggcaca	agtatggagt	cggagtgtgg	agtcctgcca	34500
atggtctgga	cagaagcatc	cagagagggg	ccaagacaaa	tgctctgcct	cctaaggaac	34560

- 174 -

```

actggcagcc ctgatgaggt accagagatt gctaagtgga ggaatacagg atcagaccca 34620
tggaggggct taaagcgtga ctgtagcagc cctccgctga ggggctccag gtgggcgccc 34680
aaggtgctgc agtgggagcc acatgagagg tgatgtcttg gagtacctc gggtagcatt 34740
gtttagggag gtggggattt gtggtgtgga gacaggcagc ctcaaggatg cttttcaaca 34800
atggttgatg agttggaact aaaacagggg ccatcacact ggctcccata gctctgggct 34860
tgccagcttc cacatctgcc cccaccccc tgtctggcac cagctcaagc tctgtgatcc 34920
tacacatcca aaagaggaag agtagcctac tgggcatgcc acctcttctg gaccatcagg 34980
tgagagtgtg gcaagcccta ggctcctgtc caggatgcag ggctgccaga taggatgctc 35040
agctatctcc tgagctggaa ctatcttagg aataaggatt atgcccggcc ggggttgccc 35100
agcaccaccag cagcctgtgc ttgctgtaaaa gcaagtgtctg ttgatttacc taaaaacaga 35160
gccgtggacc caccacagg acaagtatgt atgcatctgt ttcatgtatc tgaaaagcga 35220
cacaaccatt tttcacatca tggcatcttc ctaaccccc ttcttttttg tttgttttt 35280
ttgagacagg gtttctctgt gtagtcttg ctgtcctgga actcactttg tagaccaggc 35340
tggcctcgaa ctcagaaatc ctgggattaa aggtgtgtgc caccacgccc ggccctaacc 35400
cccatctcta atggtgatcc agtgggtgaa atttcgggccc acacacatgt ccattaggga 35460
ttagctgctg tcttctgagc tacctggtac aatctttacc ccctggggcc tgggctcctg 35520
atccctgact cgggcccgat caagtccagt tcctgggccc gatcaagtcc agttcctggg 35580
ccgaacaag tccagtcctt agctcgatta gctatcctg gctccctggc ctgttcttac 35640
ttacactctt ccccttgctc tggacttgtt gctttcttta ctcaagttgt ctgccacagt 35700
ccctaagcca cctctgtaag acaactaaga taatacttcc ctcaagcacg gaaagtcctg 35760
agtcaccaca ccctctggag gtgtgtggac acatgttcat gcgtgtgggt gcgcttacgt 35820
acgtgtgc 35828

```

```

<210>      18
<211>      9301
5  <212>      ADN
   <213>      Homo sapien

```

```

<400>      18

```

```

tagaggagaa gtctttgggg aggggttgct ctgagcacac ccctttccct ccctccgggg 60
ctgaggggaaa catgggacca gccctgcccc agcctgtcct callygtgg catgaagcag 120
agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180
ggtaggcgtgc cctcctctgg ctggtacat gcagctccca ctggccctgt gtctcgtctg 240
cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag ggggtggcagg cgttcaagaa 300
tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360
gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc acccctttga 420

```

gaccaaaggt atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggtttttaga	480
aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagacca gtgaagattg ctggcctctg	540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgcttg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca	600
gccttcaa at tcaggtgcag aggcctgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg	660
gaggacgctg ggggtggtgag ggtatggcat cagggcctca gaacaggctc aggggctcag	720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaaatatag gagccacgtc cagctgctgg	780
taccactggg aagggaaaca ggtaaggagg cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg	840
caccggacac tctatgctgg tgggtggctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc	900
cccaggaggt gaacccccag ctcaaggagg aagaaacagg tccaggcac tcagtaactt	960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctggtg	1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca	1080
ccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcaattgaa ggaatgggag	1140
tttctggcac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag	1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagtcccaac	1260
cttgctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaaccct ggggtcctgg tcaggcctgc	1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc	1380
atgggggct ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc	1440
aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggaccca gccctccccg cctcacaacc	1500
tgttgggact atgggggtgct aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggacctccg	1560
tcttcaaaat ggaggacaag ggcgctccc cccacagctc ccttctagg caaggctcagc	1620
tgggctccag cgactgcctg aagggtgtga aggaaccaa acacaaaatg tccacctg	1680
tggactcca cgagaggcca cagcccctga ggaagccaca tgetcaaaac aaagtcatga	1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggag ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct	1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc	1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctcccctgc	1920
tgtgcttgct ctccagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctgggttgg	1980
tcttaagact atttttcatt ctttcttctc acattggaac tatcccatg aaacctttgg	2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tatttaaaaa gctcccacc atctaagtcc	2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc	2160
tctgcctgcc caggaggtat caccatgagg cgccattca gataacacag aacaagaaat	2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtagg tttgggtcag	2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc	2340
cccagcccag cctcccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa	2400
ggtgctggga ccccaggga gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagtcc	2460
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac aactgcctt	2520
tgattccttt caagtcta atgaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctgcct	2580

ccacagcagc	tgccctgatt	tattaccttc	aattaacctc	tactcctttc	tccatcccc	2640
gtccaccct	cccaagtggc	tggaaaagga	atttgggaga	agccagagcc	aggcagaagg	2700
tgtgctgagt	acttaccctg	cccaggccag	ggaccctgcg	gcacaagtgt	ggcttaaatac	2760
ataagaagac	cccagaagag	aatgataat	aataatacat	aacagccgac	gctttcagct	2820
atatgtgcca	aatggtat	tctgcattgc	gtgtgtaatg	gattaactcg	caatgcttgg	2880
ggcggcccat	tttgagaca	ggaagaagag	agagggttaag	gaacttgccc	aagatgacac	2940
ctgcagttag	cgatggagcc	ctggtgtttg	aacccagca	gtcatttggc	tccgagggga	3000
caggggtg	aggagagctt	tccaccagct	ctagagcatc	tgggaccttc	ctgcaataga	3060
tgttcagggg	caaaagcctc	tggagacagg	cttggcaaaa	gcagggctgg	ggaggagaga	3120
gacgggccc	tccagggcag	gggtggccag	gcgggccc	accctcacgc	gcgcctctct	3180
ccacagacgt	gtccgagtac	agctgccg	agctgcactt	cacccgctac	gtgaccgatg	3240
ggcgtgccc	cagcgccaag	ccggtcaccg	agctgggtgtg	ctccggccag	tgcggcccgg	3300
cgcgcctgct	gcccacgccc	atcgcccg	gcaagtgggtg	gcgacctagt	gggcccgact	3360
tccgctgcat	ccccgaccgc	taccgcgcgc	agcgcgtgca	gctgctgtgt	cccgggtggtg	3420
aggcgccg	cgcgcgcaag	gtgcgcctgg	tggcctcgtg	caagtgcaag	cgcctcacc	3480
gcttccacaa	ccagtggag	ctcaaggact	tgggaccga	ggccgctcgg	ccgcagaagg	3540
gccggaagcc	gcggccccgc	gcccggagcg	ccaaagccaa	ccaggccgag	ctggagaacg	3600
cctactagag	ccgcgccg	ccctcccca	ccggcgggcg	ccccggccct	gaaccgcgc	3660
cccacatttc	tgtcctctgc	gcgtgggttg	attgtttata	tttcattgta	aatgcctgca	3720
accagggca	gggggctgag	accttccagg	ccctgaggaa	tcccgggcgc	cggcaaggcc	3780
ccctcagcc	cgccagctga	ggggtccac	ggggcagggg	agggaattga	gagtcacaga	3840
cactgagcca	cgcagccccg	cctctggggc	cgcctacctt	tgctgggtccc	acttcagagg	3900
aggcagaaat	ggaagcattt	tcaccgccct	ggggttttta	gggagcggtg	tgggagtg	3960
aaagtccagg	gactgggtta	gaaagtggga	taagattccc	ccttgccact	cgctgccc	4020
cagaaagcct	gaggcggtgc	cagagcacaa	gactgggggc	aactgtagat	gtggtttcta	4080
gtcctggctc	tgccactaac	ttgctgtgta	accttgaact	acacaattct	ccttcgggac	4140
ctcaatttcc	actttgtaaa	atgaggggtg	agggtgggaat	aggatctcga	ggagactatt	4200
ggcatatgat	tccaaggact	ccagtgcctt	ttgaatgggc	agaggtgaga	gagagagaga	4260
gaaagagaga	gaatgaatgc	agttgcattg	attcagtgcc	aaggtcactt	ccagaattca	4320
gagttgtgat	gctctcttct	gacagccaaa	gatgaaaaac	aaacagaaaa	aaaaaagtaa	4380
agagtctatt	tatggctgac	atatttaccg	ctgacaaac	cclyyayaa	gctatgctgc	4440
ttcccagcct	ggcttccccg	gatgtttggc	tacctccacc	cctccatctc	aaagaaataa	4500
catcatccat	tggggtagaa	aaggagaggg	tccgaggggtg	gtgggaggga	tagaaatcac	4560
atccgcccc	acttcccaaa	gagcagcatc	cctccccga	cccatagcca	tgttttaaag	4620
tcaccttccg	aagagaagtg	aaaggttcaa	ggacactggc	cttgcaggcc	cgagggagca	4680
gccatcacaa	actcacagac	cagcacatcc	cttttgagac	accgccttct	gcccaccact	4740



cacggacaca	tttctgccta	gaaaacagct	tcttactgct	cttacatgtg	atggcatatc	4800
ttacactaaa	agaatattat	tgggggaaaa	actacaagtg	ctgtacatat	gctgagaaac	4860
tgcagagcat	aatagctgcc	acccaaaaat	ctttttgaaa	atcatttcca	gacaacctct	4920
tactttctgt	gtagttttta	attgttaaaa	aaaaaaagtt	ttaaacagaa	gcacatgaca	4980
tatgaaagcc	tgcaggactg	gtcgtttttt	tggcaattct	tccacgtggg	acttgtccac	5040
aagaatgaaa	gtagtgggtt	ttaaagagtt	aagttacata	tttattttct	cacttaagtt	5100
atttatgcaa	aagtttttct	tgtagagaat	gacaatgtta	atattgcttt	atgaattaac	5160
agtctgttct	tccagagtcc	agagacattg	ttaataaaga	caatgaatca	tgaccgaaag	5220
gatgtgggtc	cattttgtca	accacacatg	acgtcatttc	tgtcaaagtt	gacacccttc	5280
tcttggtcac	tagagctcca	accttggaca	cacctttgac	tgtctcttgg	tggcccttgt	5340
ggcaattatg	tcttcctttg	aaaagtcatg	tttatccctt	cctttccaaa	cccagaccgc	5400
atttcttcac	ccagggcatg	gtaataacct	cagccttgta	tccttttagc	agcctccctt	5460
ccatgctggc	ttccaaaatg	ctgttctcat	tgtatcactc	ccctgctcaa	aagccttcca	5520
tagctccccc	ttgccaggga	tcaagtgcag	tttccctatc	tgacatggga	ggccttctct	5580
gcttgactcc	cacctcccac	tccaccaagc	ttcctactga	ctccaaatgg	tcattgcagat	5640
ccctgcttcc	ttagtttgcc	atccacactt	agcaccceca	ataactaatc	ctctttcttt	5700
aggattcaca	ttacttgtca	tctcttcccc	taaccttcca	gagatgttcc	aatctcccat	5760
gatccctctc	tcctctgagg	ttccagcccc	ttttgtctac	accactactt	tggttccctaa	5820
ttctgttttc	catttgacag	tcattcatgg	aggaccagcc	tggccaagtc	ctgcttagta	5880
ctggcataga	caacacaaaag	ccaagtacaa	ttcaggacca	gctcacagga	aacttcatct	5940
tcttcgaagt	gtggatttga	tgcctcctgg	gtagaaatgt	aggatcttca	aaagtggggc	6000
agcctcctgc	acttctctca	aagtctcgcc	tccccaaggt	gtcttaatag	tgtctggatgc	6060
tagctgagtt	agcatcttca	gatgaagagt	aaccttaaaag	ttactcttca	gttgccctaa	6120
gggtgggatgg	tcaactggaa	agctttaaat	taagtccagc	ctaccttggg	ggaaccacc	6180
cccacaaaga	aagctgaggt	ccctcctgat	gacttgtcag	tttaactacc	aataaccac	6240
ttgaattaat	catcatcatc	aagtctttga	taggtgtgag	tgggtatcag	tggccggtcc	6300
cttcctgggg	ctccagcccc	cgaggaggcc	tcagtgagcc	cctgcagaaa	atccatgcat	6360
catgagtgtc	tcagggccca	gaatatgaga	gcaggtagga	aacagagaca	tcttccatcc	6420
ctgagaggca	gtgcggtcca	gtgggtgggg	acacgggctc	tgggtcaggt	ttgtgttgtt	6480
tgtttgtttg	ttttgagaca	gagtctcgct	ctattgccca	ggctggagtg	cagtgtcaca	6540
atctcggttt	actgcaactt	ctgccttccc	ggattcaagt	gattctcctg	cctcagcctc	6600
cagagtagct	gggattacag	gtgcgtgcca	ccacgcctgg	ctaatttttg	tatttttgat	6660
agagacgggg	tttcaccatg	ttggccaggc	tagtctcgaa	ctcttgacct	caagtgatct	6720
gcctgcctcg	gcctcccaaa	gtgctgggat	tacaggcggtg	agccaccaca	cccagcccca	6780
ggttggtggt	tgaatctgag	gagactgaag	caccaagggg	ttaaagtgtt	tgcccacagc	6840
catacttggg	ctcagttcct	tgccttacct	ctcacttgag	ctgcttagaa	cctggtgggc	6900

acatgggcaa	taaccagggtc	acactggtttt	gtaccaagtg	ttatgggaat	ccaagatagg	6960
agtaattttgc	tctgtggagg	ggatgagggga	tagtggttag	ggaaagcttc	acaaagtggg	7020
tgttgcttag	agatttttcca	ggtggagaag	ggggcttcta	ggcagaaggc	atagcccaag	7080
caaagactgc	aagtgcattg	ctgctcatgg	gtagaagaga	atccaccatt	cctcaacatg	7140
taccgagtcc	ttgccatgtg	caaggcaaca	tgggggtacc	aggaattcca	agcaatgtcc	7200
aaacctagggt	tctgctttct	gggacctgaa	gatacaggat	ggatcagccc	aggctgcaat	7260
cccattacca	cgagggggaa	aaaaacctga	aggctaaatt	gtaggtcggg	ttagagggtta	7320
tttatggaaa	gttatattct	acctacatgg	ggctctataag	cctggcgcca	atcagaaaag	7380
gaacaaacaa	cagacctagc	tgggaggggc	agcattttgt	tgtagggggc	ggggcacatg	7440
ttctgggggt	acagccagac	tcagggcttg	tattaatagt	ctgagagtaa	gacagacaga	7500
gggatagaag	gaaatagggtc	cctttctctc	tctctctctc	tctctctctc	actctctctc	7560
tctctcacac	acacacacag	acacacacac	acgctctgta	ggggtctact	tatgctccaa	7620
gtacaaatca	ggccacattt	acacaaggag	gtaaaggaaa	agaacgttgg	aggagccaca	7680
ggaccccaaa	attccctggt	ttccttgaat	caggcaggac	ttacgcagct	gggagggtgg	7740
agagcctgca	gaagccacct	gcgagtaagc	caagttcaga	gtcacagaca	ccaaaagctg	7800
gtgccatgtc	ccacaccgcg	ccacctccca	cctgctcctt	gacacagccc	tgtgctccac	7860
aacccggctc	ccagatcatt	gattatagct	ctggggcctg	caccgtcctt	cctgccacat	7920
ccccacccca	ttcttggaac	ctgccctctg	tcttctccct	tgtccaaggg	caggcaaggg	7980
ctcagctatt	gggcagcttt	gaccaacagc	tgaggctcct	tttgtggctg	gagatgcagg	8040
aggcagggga	atattcctct	tagtcaatgc	gaccatgtgc	ctggtttgcc	cagggtgggtc	8100
tcgttttacac	ctgtagggca	agcgtaatta	ttaacagctc	ccacttctac	tctaaaaaat	8160
gacccaatct	gggcagtaaa	ttatatggtg	cccattgctat	taagagctgc	aacttgctgg	8220
gcgtgggtggc	tcacacctgt	aatcccagta	ctttgggacg	tcaaggcggg	tggatcacct	8280
gaggtcacga	gttagagact	ggcctggcca	gcatggcaaa	accccatctt	tactaaaaat	8340
acaaaaatta	gcaaggcatg	gtggcatgca	cctgtaatcc	cagggtactcg	ggaggctgag	8400
acaggagaat	ggcttgaacc	caggaggcag	aggttgacgt	gagccaagat	tgtgccactg	8460
ccctccagcc	ctggcaacag	agcaagactt	catctcaaaa	gaaaaaggat	actgtcaatc	8520
actgcaggaa	gaacccagggt	aatgaatgag	gagaagagag	gggctgagtc	accatagtgg	8580
cagcacccgac	tcctgcagga	aaggcgagac	actgggtcat	gggtactgaa	gggtgccctg	8640
aatgacgttc	tgcttttagag	accgaacctg	agccctgaaa	gtgcatgcct	gttcatgggt	8700
gagagactaa	attcatcatt	ccttggcagg	tactgaatcc	tttcttaccg	ctgccctcca	8760
atgcccaatt	tccttacaat	tgtctgggggt	gcctaagctt	ctgccacca	agagggccag	8820
agctggcagc	gagcagctgc	aggtaggaga	gataggatcc	cataagggag	gtgggaaaga	8880
gagatggaag	gagaggggtg	cagagcacac	acctccctg	cctgacaact	tcctgagggc	8940
tggatcatgcc	agcagattta	aggcgagggc	aggggagatg	gggcgggaga	ggaagtgaag	9000
aaggagaggg	tggggatgga	gaggaagaga	gggtgatcat	tcattcattc	cattgctact	9060

gactggatgc	cagctgtgag	ccaggcacca	ccctagctct	gggcatgtgg	ttgtaatctt	9120
ggagcctcat	ggagctcaca	gggagtgtctg	gcaaggagat	ggataatgga	cggataacaa	9180
ataaacattt	agtacaatgt	ccgggaatgg	aaagttctcg	aaagaaaaat	aaagctggtg	9240
agcatataga	cagccctgaa	ggcggccagg	ccaggcattt	ctgaggaggt	ggcatttgag	9300
c						9301

5	<210>	19
	<211>	21
	<212>	ADN
	<213>	Secuencia Artificial

10	<220>	
	<223>	Cebador para PCR
	<400>	19

ccggagctgg	agaacaacaa	g	21
------------	------------	---	----

15	<210>	20
	<211>	19
	<212>	ADN
	<213>	Secuencia Artificial

20	<220>	
	<223>	Cebador para PCR
	<400>	20

25	gcactggccg	gagcacacc	19
	<210>	21	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	

30	<220>	
	<223>	Cebador para PCR

	<400>	21	
		<b>aggccaaccg cgagaagatg acc</b>	23
5	<210>	22	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
10	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	22	
		<b>gaagtccagg gcgacgtagc a</b>	21
15	<210>	23	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
20	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	23	
25		<b>aagcttggtgta ccatgcagct cccac</b>	25
	<210>	24	
	<211>	50	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
30	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	24	
35		<b>aagcttctac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgtaggcg ttctccagct</b>	50

	<210>	25	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
5	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	25	
10	<b>gcactggccg gagcacacc</b>		19
	<210>	26	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	26	
20	<b>gtcgtcgat ccatggggtg gcaggcggtc aagaatgat</b>		39
	<210>	27	
	<211>	57	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
30	<400>	27	
	<b>gtcgtcaagc ttctacttgt catcgtcctt gtagtcgtag gcgttctcca gtcggc</b>		57
	<210>	28	
	<211>	29	
35	<212>	ADN	

	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
5	<400>	28	
		<b>gacttggatc ccaggggtgg caggcggtc</b>	29
	<210>	29	
	<211>	29	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
15	<400>	29	
		<b>agcataagct tctagtaggc gttctccag</b>	29
	<210>	30	
	<211>	29	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
25	<400>	30	
		<b>gacttggatc cgaagggaag aagaaaggg</b>	29
	<210>	31	
	<211>	29	
30	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		

	<223>	Cebador para PCR	
	<400>	31	
5		<b>agcataagct tttaatccaa atcgatgga</b>	29
	<210>	32	
	<211>	33	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
15	<400>	32	
		<b>actacgagct cggccccacc acccatcaac aag</b>	33
	<210>	33	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
20	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
25	<400>	33	
		<b>acttagaagc tttcagtcct cagccccctc ttcc</b>	34
	<210>	34	
	<211>	66	
30	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador para PCR	

	<400>	34		
		aatctggatc cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg	60	
		gcccct	66	
5	<210>	35		
	<211>	82		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
10	<220>			
	<223>	Cebador para PCR		
	<400>	35		
		aatctgaatt ccaccggtgt taattaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta	60	
		tagatctaga gtcagcttct ga	82	
15	<210>	36		
	<211>	62		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
20	<220>			
	<223>	Cebador para PCR		
	<400>	36		
		atctaggtga cactatagaa ctcgagcagc tgaagcttaa ccacatggtg gctcacaacc	60	
		at	62	
25	<210>	37		
	<211>	54		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
30	<220>			
	<223>	Cebador para PCR		
	<400>	37		



		aacgacggcc agtgaatccg taatcatggt catgctgcca ggtggaggag ggca	54
	<210>	38	
	<211>	31	
5	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
10	<400>	38	
		attaccaccg gtgacaccg cttcctgaca g	31
	<210>	39	
	<211>	61	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
20	<400>	39	
		attacttaat taaacatggc gcgccatatg gccggcccct aattgcggcg catcgttaat	60
		t	61
	<210>	40	
25	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador para PCR	
30	<400>	40	
		attacggccg gccgcaaagg aattcaagat ctga	34

<210> 41  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Cebador para PCR

<400> 41

10

attacgggcgc gccctcaca ggccgcaccc agct

34

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una proteína codificada por el SEQ ID NO: 1, 5, 7, 9, 11,13, o 15 con una Ka mayor o igual a  $10^7 \text{ M}^{-1}$ .
2. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína codificada es la del SEQ ID NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento une dicha proteína codificada por el SEQ ID NO, 1,5, 7, 9, 11, 13 o 15 cuando se exprese por células de insectos.
4. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 3 donde el anticuerpo o fragmento une dicha proteína codificada por el SEQ ID NO. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 cuando se expresa en células Sf9 mediante el uso de un sistema de baculovirus.
5. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento une dicha proteína codificada por el SEQ ID NO. 1, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 cuando se exprese por células renales de embrión humano.
6. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 5, donde las células renales de embrión humano son células 293-HEK.
7. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a dicha proteína con una Ka mayor o igual a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .
8. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una  $\text{F(ab')}_2$ ,  $\text{F(ab)}_2$ ,  $\text{Fab'}$ ,  $\text{Fab}$ , o  $\text{Fv}$ .

9. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es monoclonal.
10. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la  
5 reivindicación 9, que es ratón o humano.
11. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que está humanizado.
12. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una  
10 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es policlonal.
13. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo o fragmento de clase IgG.
- 15 14. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 13, donde la clase IgG se selecciona de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>.
15. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el  
20 anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento IgE, IgM o IgA.
16. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está conjugado a una molécula efectora o informadora.
- 25 17. El anticuerpo de la reivindicación 16 donde el anticuerpo o fragmento está conjugado a un polímero.
18. El anticuerpo de la reivindicación 17 donde el anticuerpo o fragmento está conjugado a polietilenglicol.
19. Una molécula de ácido nucleico que codifica un  
30 anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19.

21. Una célula que produce un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

22. La célula de acuerdo con la reivindicación 21 que es un hibridoma.

23. Un método para producir un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales o fragmento del mismo según se define en la reivindicación 9, comprendiendo el método:

(i) un roedor con una proteína de la inmunizar secuencia del SEQ ID No. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o porción de la misma

(ii) sacrificar el roedor y cosechar los nódulos de bazo y/o linfáticos del animal; y

(iii) fusionar las suspensiones de células de nódulos de bazo o linfáticos con células de mieloma para generar hibridomas.

24. El método de la reivindicación 18, donde el método comprende adicionalmente rastrear los hibridomas para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo contra dicha proteína.

25. El método de la reivindicación 18 o 19, donde el roedor es una rata o ratón.

26. El método de la reivindicación 25, donde el ratón ha sido diseñado para producir anticuerpos humanos.

27. Un método para producir un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende aislar y purificar el anticuerpo o fragmento de un hibridoma según se define en

la reivindicación 22 o manipular o re-expresar el ADN que codifica las regiones variables.

5 28. El anticuerpo o fragmento según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para utilizar en un método de aumentar la mineralización ósea en un animal de sangre caliente.

29. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 28, donde el animal de sangre caliente tiene osteopenia o fractura ósea.

10 30. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 29, donde la osteopenia está causada por un estado anémico, esteroides, heparina, un trastorno de médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia en calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia u  
15 osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, senectud, estado post-menopáusica, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes melitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de  
20 distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria u osteomalacia.

31. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 28 donde el animal tiene osteoporosis.

25 32. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 28 donde el animal tiene acondroplasia.

33. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, donde el animal de sangre caliente es humano.

30 34. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 35. Un método in vitro para detectar una proteína de la secuencia SEQ ID NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 que comprende incubar un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 bajo condiciones y durante tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a dicha proteína y detectar dicha unión.

10 36. El método de acuerdo con la reivindicación 35 donde dicho anticuerpo o fragmento se une a un soporte sólido.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 36 donde dicho anticuerpo o fragmento está marcado.

15 38. El método de acuerdo con la reivindicación 37 donde dicho anticuerpo o fragmento está marcado con un marcador seleccionado de una enzima, una proteína fluorescente y un radioisótopo.

20 39. Un estuche para la detección de una proteína de SEQ. ID. NO. 2, 6, 8, 10, 12, 14 o 16, que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

25 40. El uso de un anticuerpo o fragmento según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para la fabricación de un medicamento para aumentar la mineralización ósea en un mamífero de sangre caliente.

41. El uso de acuerdo con la reivindicación 40, donde el mamífero tiene osteopenia o fractura ósea.

30 42. El uso de acuerdo con la reivindicación 41, donde el mamífero tiene osteoporosis.

- 192 -

## Esqueleto de Cisteína Común

1				50	
human_gremlin.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	MHLLLFQLLV	LLPLGKTTRH	QDGRQNQSSL	SPVLLPRNQR	ELPTGNHEEA
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
human_gremlin.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLLPA	AEGKKKGSQG
human_cerberus.pro	EEKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----
human_beer.pro	-----	-----	-----	----MQLPLA	LCLVCLLVHT
	101				150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QQPGSRNRGR	GQGRGTAMPG	EEVLESSQEA
human_cerberus.pro	SDSEFPFPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLRE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV
human_dan.pro	-----	-----	-----	MLRVLVGAVL	PAMLLAAPPP
human_beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATET	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGGRPP
	151	↓	↓	↓	200
human_gremlin.pro	LHVTERKYLK	RDWCKTQPLK	QTIHEEGCNS	RTIINRF.CY	GQCNSFYIPR
human_cerberus.pro	ILPIKSHEVH	WETCRTVPFS	QTITHEGCEK	VVVQNNL.CF	GKCGSVHFP.
human_dan.pro	INKLALFPDK	SAWCEAKNIT	QIVGHSGCEA	KSIQNRA.CL	GQCFSYSVPN
human_beer.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTTELVC	GQCGPARLLP
	201	↓	↓		250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPPTK	K.KRVTRVKQ
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE
human_dan.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHEEVPR	VDKLVEKILH
human_beer.pro	NAIGRGKWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGGEAPRA	RKVRLVAS..
	↓↓↓				300
human_gremlin.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	CQCKVKTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGVSA-	-----	-----
human_dan.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH	PGGQTPEPED
human_beer.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQKGRK	PRPRARSACA	NQAELENAY~
	301	314			
human_gremlin.pro	-----	-----			
human_cerberus.pro	-----	-----			
human_dan.pro	PPGAPHTEEE	GAED			
human_beer.pro	-----	-----			

Figura 1



# Expresión del Gen Beer Humano por RT-PCR

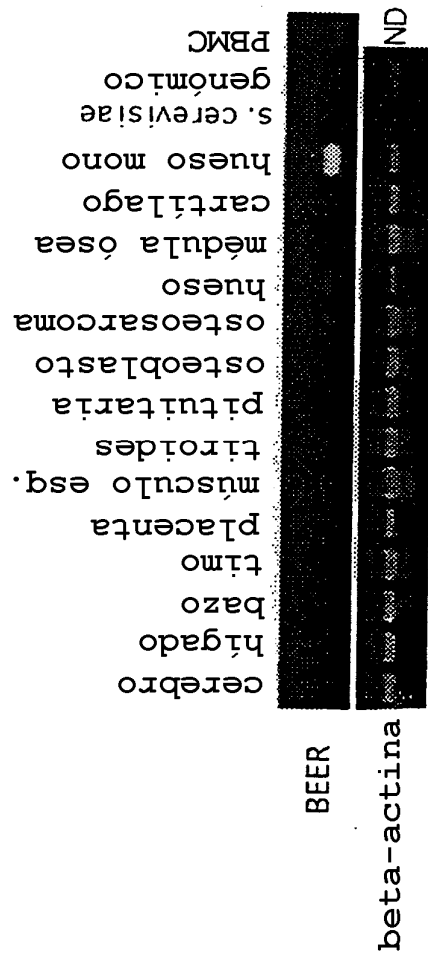


Fig. 2

Hibridación In Situ de ARN de Secciones de Embrión de Ratón

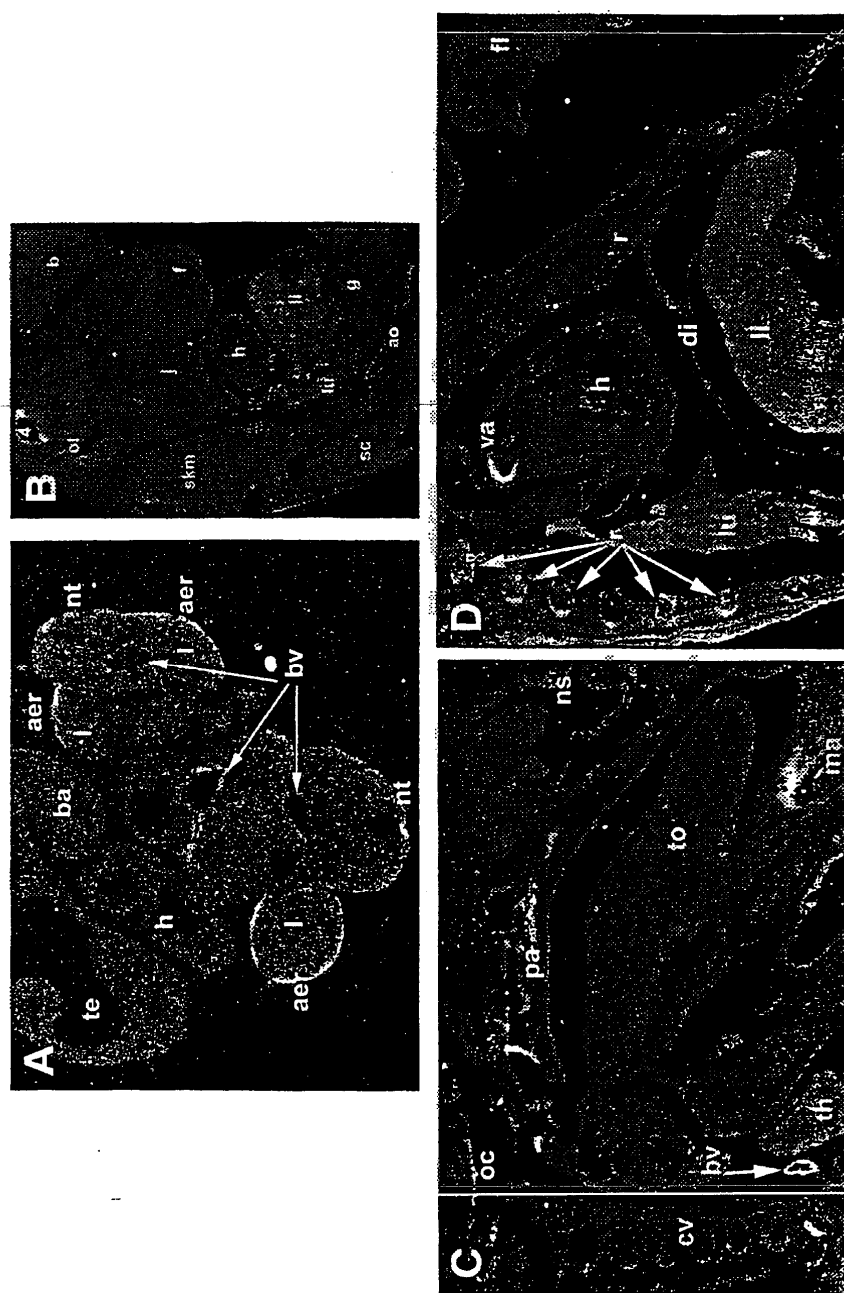
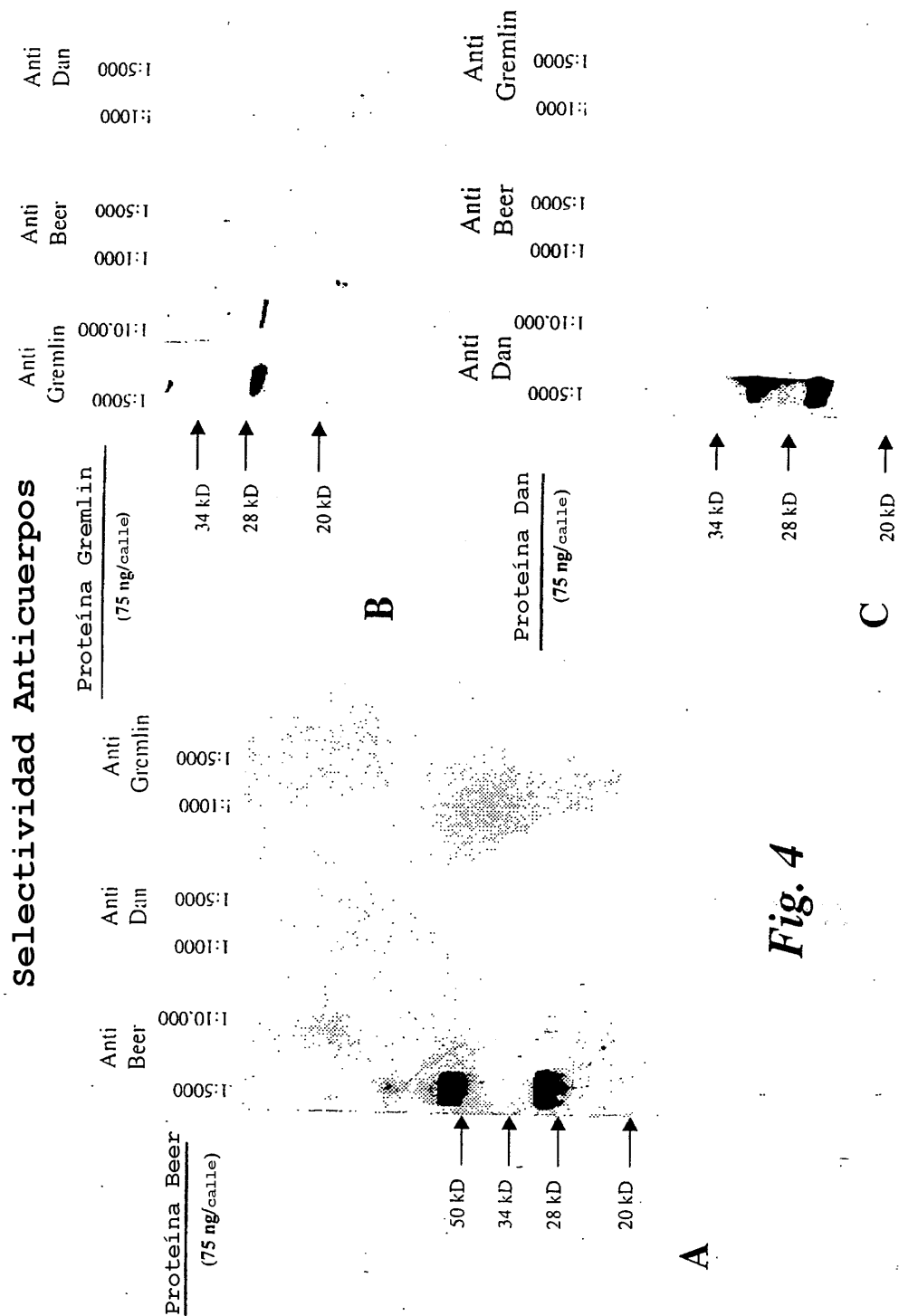


Fig. 3

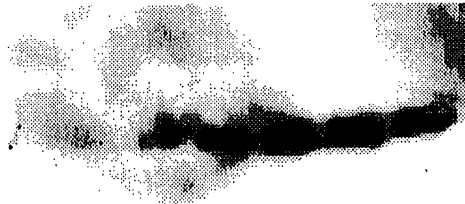


**Fig. 4**



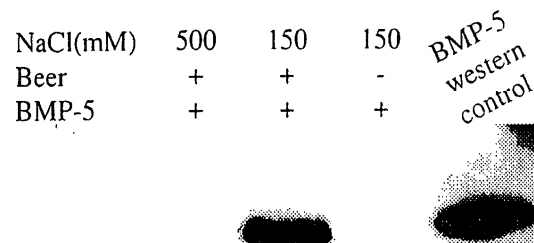
Caracterización de la Constante de Disociación de BMP-5/Beer

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



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

Desorganización Iónica de la Unión BMP-5/Beer



\* Inmunoprecipitación anti-FLAG  
\*. Western anti-BMP-5

**Fig. 6**