



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

(51) Int. Cl.:

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

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

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

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

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

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).

- 2 -

#### 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 Ka superior a o igual a  $10^7\text{-M}^1$ .

La presente invención también proporciona:

una molécula de ácido nucléico 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 farmaceútica, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y un 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 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 une 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 nuceico aisladas donde se seleccionan dichas moléculas de ácidos nucleicos del grupo que comprende

- 25 (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
- 30 (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).

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 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 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 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 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 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 5 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 10 un anticuerpo completo (v.g., un fragmento  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$ , o  $Fv$ , o incluso una CDR). Asimismo se proporcionan hibridomas y otras células que son capaces de producir o expresar los anticuerpos anteriormente mencionados.

15 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 20 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, 25 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 30 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, 35 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-metilribonucleicos), 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.

También se refieren a métodos para producir 5 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 15 pueden ser formuladas en composiciones 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 cadena corta, un enlace interazúcar cicloalquílico, un 35

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

5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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.

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 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 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.

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 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 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 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 5 de hueso o de los análogos del mismo se incluyen hidroxiapatita y muestras de hueso humano primario obtenidas mediante biopsia.

En ciertas realizaciones de los métodos citados antes, 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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  
5 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 terapeúticamente 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,  
10 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  
15 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.  
20 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  
25 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 super-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, osteomalacia, 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 amplificar una porción del gen de ADNc de la primera hebra sintetizada a partir del ARN total (descrito con más detalle en el EJEMPLO 2A).

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

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

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

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

## 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 químéricas, 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 super-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

5 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 super-

familia del TGF-beta.

10 "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. químérico de ADN-ARN). Opcionalmente, el vector puede incluir una secuencia de poliadenilación, uno o más sitios de 15 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 20 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.

25 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 30 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 proteináceas 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. Berlin: 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 epítopo 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 hipervariante.

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 diagnósticos. 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 inmunoconjuguado" 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 inmunoconjuguado 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 transcrita 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. Berlin: Springer (pub.) 6 1967. págs. 351-355) a un trastorno similar a la hiperostosis cortical generalizada de van Buchem pero posiblemente difiriendo en la apariencia radiológica de los cambios del hueso y en la presencia de

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

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

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

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

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

10 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 homozigotos 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 homozigotos con 15 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 20 huesos escleróticos aparecen normalmente opacos a los rayos x.

25

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 novedoso 30 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 35 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 embrionario y a organogénesis de los órganos parenquimatosos, incluyendo el riñón. Se sabe ahora que la naturaleza cuenta con mecanismos moleculares comunes (y escasos) adaptados para proporcionar la emergencia de tejidos y órganos especializados. La súper-familia de BMP/OP es un elegante ejemplo de parsimonia natural en la programación de múltiples funciones especializadas que despliegan isoformas moleculares con una variación minoritaria en las unidades de aminoácidos dentro de regiones carboxi terminales altamente conservadas.

#### ANTAGONISMO DE BMP

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

- 30 -

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) 5 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 10 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) 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 9337-9342).

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

1. Antecedente re: proteínas de unión al TGF-beta  
20 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 25 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)

30 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 35 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 5 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 10 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 delecciones de las secuencias de 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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*, 2<sup>a</sup> 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.

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 5 puede preparar una genoteca deADNc en un vector derivado de bacteriófagos, tal como un vector λgt10 (ver, por ejemplo, Huynh y col., "Construction and Screening cDNA in λgt10 and λgt11", en *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.) página 49 (IRL Press, 1985); Wu 10 15 (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 20 25 (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).

30 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, 35 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 λgt11, o se pueden utilizar los anticuerpos para el inmunorastreo 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, 2<sup>a</sup> Edición*, Glover y col., (eds.) páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

20 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 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, 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 hidroxi 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 10 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 15 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 20 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 30 Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240:113, 1993; Content y col., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kea 2-5A synthesis induced by human interferon", en *Biological Interferon Systems*, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-35 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), 5x solución 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.

15           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 reguladora 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-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de cría de hámster (BHK-21; ATCC CRL 8544), células de riñón caninas (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster Chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias de ratones (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 reguladoras transcripcionales y traducionales también 25 pueden ser obtenidas de genes de mamíferos, tales como los genes de actina, colágeno, miosina, y metalotioneína.

30 Entre las secuencias reguladoras transcripcionales se incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Entre los promotores eucarióticos adecuados se incluyen el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón [Hamer 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* 79:6777, 1982], el promotor de citomegalovirus [Foecking y col., *Gene* 45, 101, 1980], y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (ver, generalmente, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", en *Protein Engineering Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativamente, se puede utilizar un promotor procariótico, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3 para controlar la expresión del gen de la proteína de unión al TGF-beta en células de mamífero si el promotor procariótico está regulado por un promotor eucariótico (Zhou y col., *Mol. Cell. Biol.* 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 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 *E. coli*, los promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, los promotores de *Streptomyces*, el promotor int del bacteriófago lambda, el promotor bla de pBR322, y el promotor CAT del gen de la cloramfenicol acetil transferasa. Los promotores procarióticos han sido revisados por Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277, 1987, Watson y col., *Molecular Biology of the Gene*, 4<sup>a</sup> Ed. (Benjamin Cummins 1987), y por 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, 5 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 10 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*, 2<sup>a</sup> 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). 15 20 25

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 30 35

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*, 2<sup>a</sup> 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*, 2<sup>a</sup> 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.), *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 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 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 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 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>, 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* 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 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 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 secuencia de aminoácidos hipervariable responsable de la unión al antígeno embebido en una secuencia marco. En términos generales el dominio de la región variable (V) puede ser cualquier ordenación adecuada de dominios variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y/o ligera ( $V_L$ ) de inmunoglobulina. De este modo por ejemplo el dominio de

la región V puede ser monomérico y ser un dominio  $V_H$  o  $V_L$  donde estos sean capaces de unirse independientemente con una afinidad aceptable. Alternativamente el dominio de la región V puede ser 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 5 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 10 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 15 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 20 creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, delecciones 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 25 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 30 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  $V_L$  35 puede estar conectado a un dominio  $C_K$  o un fragmento del

mismo. De este modo por ejemplo el anticuerpo puede ser un fragmento Fab en el que el dominio de unión al antígeno contiene dominios  $V_H$  y  $V_L$  asociados conectados en sus extremos C a un dominio CH1 y C $\kappa$  respectivamente.

5 El dominio CH1 puede ser prolongado con aminoácido adicionales, por ejemplo para proporcionar un dominio de la región bisagra como el encontrado en un fragmento Fab', o para proporcionar dominios adicionales, tales como los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo.

10 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  
15 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 en 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  
20 Expression of Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

25 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 5 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 expresed in *E. coli*", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2<sup>a</sup> Edición, Glover y col., 10 (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 15 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 20 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 30 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.

10 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 pro tamaños, y la cromatografía de intercambio 15 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)).

20 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 25 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 30 F(ab')<sub>2</sub>. 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 35 sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces

disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática en la que se utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos por ejemplo, por Goldenberg, 5 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.

10 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 15 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 deseé. 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 25 cisteína, para modificar, añadir o suprimir otros 30 aminoácidos o dominios según se deseé.

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 35

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 aldehido 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 polialquíleno 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, trietilentiofosforamida, busulfan, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopericina, tioguanina, ácido fluoroacético o ácido fluorocítrico, antibióticos,

tales como bleomicinas (v.g. sulfato de bleomicina), doxorrubicina, 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 procarbazina, 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 concretos de tales metales se incluyen tecnecio (Tc), 25 renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido. Entre los radionúclidos concretos se incluyen Tc<sup>99m</sup>, Re<sup>186</sup>, 30 Co<sup>58</sup>, Co<sup>60</sup>, Cu<sup>67</sup>, Au<sup>195</sup>, Au<sup>199</sup>, Au<sup>110</sup>, Pb<sup>203</sup>, Bi<sup>206</sup>, Bi<sup>207</sup>, In<sup>111</sup>, Ga<sup>67</sup>, Ga<sup>68</sup>, Y<sup>88</sup>, Y<sup>90</sup>, Tb<sup>160</sup>, Gd<sup>153</sup> y Sc<sup>47</sup>.

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

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 deseé utilizar un grupo tiol en el anticuerpo como punto de anclaje esto puede ser logrado por medio de una reacción con un grupo reactivo con tiol presente en la molécula efectora o informadora. Entre los ejemplos de tales grupos se incluyen un ácido o éster a-halocarboxílico, 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 Radio-inmunoanálisis, 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 super-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 super-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 super-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 super-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 5 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 10 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 15 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 20 debe entender que el hueso o los análogos del mismo hacen referencia a hidroxiapatita o una superficie compuesta por una forma en polvo de hueso, hueso triturado o hueso intacto. De un modo similar a los métodos descritos antes, se pueden utilizar una amplia variedad de métodos 25 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 30 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 35 etapa de aislar una molécula que inhibía 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 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; Cherala, 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 therof", WO 96/00148; Phillips, G.B. y G.P. Wei, "Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles", *Tet. Letters* 37:4887-25 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 30 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

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

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

5 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).

10 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, 15 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 20 de antisueros o bien mediante tomas de sangre semanales, 25 o bien mediante exanguinación del animal.

30 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*

5           *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.

10          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 15         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 20         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 25         se cosechan.

25          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, 30         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 secrete 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).

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

5 ingredientes adicionales, tales como suero bovino fetal (FBS, es decir, de Cyclone, 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 10 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 15 del TGF-beta.

15 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 contracorriente, los radioinmunoanálisis, las 20 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 25 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 30 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* 35 246:1275-1281, 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 immunoglobulinas 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  $V_{H\alpha}$ ,  $V_{H\beta}$ ,  $V_{H\gamma}$ ,  $V_{H\delta}$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  y  $C_L$ . Estos cebadores pueden ser utilizados para amplificar las regiones variables de la cadena pesada o ligera, que pueden ser insertadas después en vectores tales como ImmunoZAP® H o ImmunoZAP® L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores pueden ser introducidos después en *E. coli*, levaduras, o sistemas de expresión basados en mamíferos. Utilizando estos mecanismos, se pueden producir grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla conteniendo una fusión de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  (ver Bird 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 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 inhibidoras 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*, 2<sup>a</sup> 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 según los métodos descritos por Kyte y Doolittle (*J. Mol. Biol.* 157:105-132, 1982).

10 Las proteínas de la presente invención pueden ser preparadas en forma de sales ácidas o alcalinas, o en forma neutra. Además, se pueden modificar los restos aminoácido individuales mediante oxidación o reducción. Además, se pueden realizar diversas sustituciones, 15 delecciones, o adiciones en las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, cuyo efecto neto es conservar o intensificar o reducir adicionalmente la actividad 20 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 construir proteínas de fusión tales como Flag/proteína de 35

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 construidos utilizando sitios para endonucleasas de restricción convenientes adyacentes a la delección deseada. Después de la restricción, los salientes pueden ser rellenados, y el ADN religado. Los métodos ejemplares de elaboración de alteraciones mostrados antes son descritos por Sambrook y col., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> 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 5 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 10 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 15 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 20 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, 25 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 30 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*, 2<sup>a</sup> 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 (penicilinasa) 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 Enzymology* 101:20-77, 1983 y Vieira y Messing, *Gene* 19:259-268, 1982), y pNH8A, pNH16a, pNH18a, y Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, California).

Entre las células 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 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), YEpl3 (Broach y col., *Gene* 8:121-133, 1979), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) y derivados de 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 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 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 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 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 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

5 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 10 del experto normal en la técnica.

15 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 20 polietilenglicol como describen Cullen y col., (*Bio/Technology* 5:369, 1987).

25 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* 35 365:781-784, 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, 5 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 10 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 alfal-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, 15 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 20 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 25 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 30 los promotores específicos del hueso se incluyen la sialo-proteína ósea y el promotor de la osteocalcina. 35

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 E1a. Entre los promotores celulares se incluyen el promotor de la metalotioneína-1 de ratón (Palmeter y col., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.579.821), un promotor V<sub>K</sub> 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<sub>H</sub> 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 E1B 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 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).  
5 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, *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 injectado es detectada mediante análisis de transferencia de ADN desde las muestras de tejido. Se prefiere que el ADN introducido sea incorporado a la línea germinal del animal de manera que pase a la progenie del animal. La expresión específica de tejidos puede ser lograda por medio del uso de un promotor específico de tejidos, o por medio del uso de un promotor inducible, tal como el gen promotor de la metalotioneína (Palmiter y col., 1983, *ibid.*), que permita la expresión regulada del transgen.  
10  
15  
20  
25  
30

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

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

30

### 3. Moléculas de Ácido 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 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. 5 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 químéricos de los mismos (v.g., ADN/ARN/ARN).

10

#### 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 15 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 20 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 25 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 30 pueden ser marcados o conjugados con 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 35 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, 5 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; 10 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.* 15 *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, 20 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 seralbúmina no específica son diluyentes apropiados 25 30 35 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.

15 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, 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 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 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 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 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 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 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 5 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 10 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 15 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, 20 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 25 Guiness-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 30

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

MAPAS DE ESCLEREOSTIOSIS PARA EL BRAZO LARGO DEL  
10 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 hueso esquelético presenta un incremento sustancial en la densidad mineral en relación con la de los individuos no afectados. El hueso de la cabeza también presenta un sobrecrecimiento. Los pacientes con esclerosteosis son generalmente sanos aunque pueden mostrar grados variables de sindactilia al nacer y grados variables de compresión craneal y compresión nerviosa en el cráneo.

25 El análisis de conexión del defecto del gen asociado con la esclerosteosis fue realizado aplicando el método del cartografiado por homozigosis 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 chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). La población Afrikaner de Suráfrica es generalmente homogénea; la población desciende de un pequeño número de fundadores que colonizaron el área hace varios siglos, y ha estado aislada por barreras geográficas y sociales desde su

fundación. La esclerosteosis es rara en todo el mundo fuera de la comunidad Afrikaaner, lo que sugiere que se encontraba presente una mutación en el gen en la población fundadora y ha aumentado de número junto con el crecimiento de la población. El uso del cartografiado de homozigosidad se basa en la suposición de que es probable que los marcadores del cartografiado del ADN adyacentes a un mutación recesiva sean homozigotos en los individuos afectados de familias consanguíneas y en poblaciones 5 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 10 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, 15 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 20 de la familia, los análisis de los marcadores demostraron numerosos tamaños de alelos para cada marcador. Un marcador, D17S1299, mostraba una indicación de homozigosidad: una banda en algunas de las reservas de 25 individuos afectados.

Las 24 familias con esclerosteosis fueron 30 tipificadas con un total de 19 marcadores en la región D17S1299 (en 17q12-q21).

Los individuos afectados de cada familia demostraron ser homozigotos en esta región, y 25 de los 29 individuos eran homozigotos para un haplotipo central; cada uno 35 tenía los mismos alelos entre D17S1787 y D17S930. Los

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

#### EJEMPLO 2

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 asequible comercialmente ("Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis", Life Technologies, Rockville, MD): cerebro humano, hígado humano, bazo humano, timo humano, placenta humana, músculo esquelético humano, tiroides humano, pituitaria humana, osteoblastos humanos (NHOst de Clonetics Corp., San Diego, CA), línea celular de osteosarcoma humano (Saos-2, ATCC# HTB-85), hueso humano, médula ósea humana, cartílago humano, hueso de mono Vervet, *Saccharomyces cerevisiae* y monocitos de sangre periférica humana. Todas las muestras de ARN fueron adquiridas de una fuente

comercial (Clontech, Palo Alto, CA), excepto las siguientes que fueron preparadas por la empresa: osteoblasto humano, línea celular de osteosarcoma humano, hueso humano, cartílago humano y hueso de mono Vervet.

5 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 10 adicionalmente sobre una muestra genómica como control. El oligonucleótido Beer efector tenía la secuencia 5'-CCGGAGCTGGAGAACAAACAG-3' (SEC ID NO: 19). El cebador oligonucleotídico Beer antisentido tenía la secuencia 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEC ID NO: 20). Además, se 15 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 20 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 25 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.

30 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 35 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 (prosencéfalo), b=cerebro, f=masa frontal, g=intestino, j=mandíbula, li=hígado, lu=pulmón, ot=vesícula ótica, ao=, sc=médula espinal, skm=músculo esquelético, na=seno nasal, th=timo, to=lengua, fl=miembro anterior, di=diafragma.

30

### 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

35

cebadores oligonucleotídicos para PCR. El cebador oligonucleotídico 5' tenía la secuencia 5'-**AAGCTT**GGTACCATGCAGCTCCCAC-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**CTACTGTCATCGTCGTCCTGTCGTAGCTAGGCGTTCTCCAGCT-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 epítopo 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'-GCAC~~T~~GGCCGGAGCACACC-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 transfecaron 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'-GTCGTCGGATCCATGGGGTGGCAGGCCTCAAGAAT-GAT-3' (SEC ID NO: 26)

Cebador antisentido: 5'-GTCGTCAAGCTTACTTGTACCGTCCTTGT-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 epítopo 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 diáisis 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  
35 BEER, GREMLIN, Y DAN

## A. Preparación de antígeno

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

Beer H.

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

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

Gremlin H.

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

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

Dan H.

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

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

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

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 super-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 µl de tampón IP (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 1,4 mM, triton X-100 al 0,5%, y glicerol al 10%). Se aplicaron 30 ng de proteína BMP-5 humana recombinante (R & D systems) a 15 µl de matriz de afinidad FLAG (Sigma, St. Louis MO)) en presencia y ausencia de 500 ng de Beer marcada con el epítopo FLAG. Las proteínas fueron incubadas durante 4 horas @ 4°C y después las proteínas asociadas con la matriz de afinidad fueron lavadas cinco veces en tampón IP (1 ml por lavado). Las proteínas unidas se hicieron eluir de la matriz de afinidad en 60 microlitros de 1X tampón de muestra SDS PAGE. La proteínas fueron resueltas mediante SDS PAGE y la Beer asociada con BMP-5 fue detectada mediante transferencia Western utilizando antisuero anti-BMP-5 (Research Diagnostics, Inc.) (ver la Figura 5).

#### Análisis de Unión al Ligando BEER

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

0,2%. Los niveles e BMP-5 son detectados utilizando anti-suero BMP-5 vía ELISA (F.M. Ausubel 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 humano. 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  
20 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  $\mu$ M en el caso de las colecciones de moléculas orgánicas pequeñas y 1  $\mu$ 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 5 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 10 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).

15

#### 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 20 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 25 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 30 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 35 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 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. Despues 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 SOBREEXPRESAN EL  
GEN *BEER*

El clon BAC de ~200 kilobases (kb) 15G5, aislado dla genoteca deADN 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-AvlII 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 zigotos 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 contenido 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 resuspensión 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 [(C57BL/6J x SJL/J) F2].

MODELOS ANIMALES IIDESORGANIZACION DEL GEN BEER DE RATON MEDIANTE  
RECOMBINACION HOMOLOGA

La recombinación homóloga en células madre (ES) 5 embrionarias puede ser utilizada para inactivar el gen Beer endógeno de ratón y generar con posterioridad animales que porten la mutación con pérdida de función. Un gen informador, tal como el gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, fue diseñado en el vector de 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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' -AATCTGGATCCATAACTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGA  
TTCGAGGGGCCCT-3' (SEC ID NO: 34); la secuencia del  
cebador anti-sentido era 5' -AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAAA  
TAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAG TCAGCTTCTGA-  
5' (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 10 también incluía 30 ntd complementarios al extremo 5' del gen de la  $\beta$ -galatosidasa 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- 15 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 20 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  
GCTTAACCACATGGTGGCTCACACCAT-3' (SEC ID NO: 36) y la 25 secuencia del cebador anti-sentido era 5' -AACGACGGCCAGTGAATCCGTA ATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGGAGGGCA-  
3' (SEC ID NO: 37).

El "brazo largo" del locus del gen Beer fue generado 30 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'-ATTACTTAATTAAACATGGCGGCCATATGGCC GGCCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEC ID NO: 39). El producto de la PCR resultante fue clonado en el vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) como una etapa intermedia.

El constructo 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 inviables) al ganciclovir, es por lo tanto un modo conveniente de seleccionar frente a células resistentes a la neomicina en las cuales ha sido integrado el constructo mediante un evento no homólogo (Patente de los Estados Unidos 5.464.764). La casete RSVLTR-HSVTK fue amplificada de pSP1337 utilizando los cebadores que permiten la posterior clonación en los sitios FseI y AscI del "brazo largo"-plásmido vector TA. Para esta PCR, la secuencia del cebador efector era 5'-ATTACGGCCGGCCGCAAAGG AATTCAAGA TCTGA-3' (SEC ID NO: 40); la secuencia del cebador antisentido era 5'-ATTACGGCGCGCCCCTCACAGGCCGCACCC AGCT-3' (SEC ID NO: 41).

La etapa final en la construcción del vector redireccionado implicaba la clonación del fragmento SgrAI-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 transcripto 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 la proteína soluble se recoge. Este material se aplica a SDS PAGE en un gradiente desnaturizante al 10=20). Las 35

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 5 idénticos y se repiten las condiciones experimentales. El descenso en los niveles de ARNm o proteína Beer se considera significativo si el tratamiento con el oligonucleótido antisentido da como resultado un cambio del 50% en cualquier caso comparado con el oligonucleótido con las mismas bases orientadas de manera azarosa ("scrambled") de control. Esta metodología permite la inactivación selectiva del gen y la posterior caracterización del fenotipo de los nódulos mineralizados en el modelo de cultivo de tejidos.

15

## SECUENCIAS

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

5

AGACCTGTGCTACTGGTAAAGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC  
 CTGGCTGGTACACACAGCCTTCGGTGTAGTGGAGGGCAAGGGTGGCAGGGGTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCC  
 CGAGCTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAACAGACCGTGAACCGGGGGGAGAACGGAGGGGGC  
 CTCCCCACCCACCCCTTGAGACCAAAGAGCTGGTCCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACTTCAACCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCCGTGCCGAGGCCAAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCAGTGCAGGCGCCCTGCTGCCAACGCG  
 CATCGGCCGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCACGCGTGC  
 AGCTGGCTGTGCTCCGGTGGTGGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCGCCCTGGCTCGTGCAGTGCAGCGCGCTACCC  
 CGCTTCCACAAACGAGCTGGAGCTCAAGGACTTGGGACCGAGGGCGCTGGCCGAGAGGGGGAGGGAGGCCGGGG  
 CGGGGGAGGCCAAAGCCAACAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACTAGAGCCCGCCCGCCGCCCCCTCCCCAACGGCGGGC  
 GCCCCGGGGCTGAAACCCGGCCUCACATTCTGTCCTCTGCCGGTGGTTGATTGTTATATTGATTGATAATGCCCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGGCCCTGAGGAATCCGGGCGCCGGCAAGGCCGGCCCTCACGGCGCG  
 AGGGGCTCCCACGGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCCAGGCCCCGCTCTGGGGCGCGCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACCTTCAGAGGGGGPGAATGGAGGCATTTCACCGCCCTGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAATGGGATAAGATTCCCCCTTGCAACCTCGCTGCCCATCAGAAGGCTGAGGCGTGC  
 CCAGAGCACAGRACTGGGGCACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCTGGCTCTGCCACTTACTGCTGTGTAACCTTGAA  
 TACACATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGAAATAGGATCTCGAGGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTGTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAAATG  
 CAGTTGCATTGATTCACTGCAAGTCACCTCCAGAATTCAAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAA  
 CAAACAGAATTTAAAGTAAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTACGGGTGACAAACTCCTGGAGAAAGCTATGCTG  
 CTTCCCAGCCTGGCTCCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAGAATAPCATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCCACTTCAAAAGAGCAGCAGCATCCCTCCCC  
 ACCCATAGCCATGTTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAAGGCCAGGGAGC  
 AGCCATCPAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTCTGCCACCACTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGAAATCACGCTTACTGCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAAATATTGGGGAAAAAAACTACAAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAAATCTTTTGAAATCATTCAGACAACTC  
 TTACTTTCTGCTAGTTTAAATTGTTAAAAAAAGTTTAAACAGAAGCAGACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTGTTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGACTTGTCCACAAAGAATGAAAGTAGTGGTTTTAAAGAGTTAAGTACAT  
 ATTATTTCTCACTTAAGTTATTGAAAGAATGTTAATTTCTGCTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAA  
 CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAGACAATGAAATCATGACCGAAAG

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

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQFKNDATEIIIFELGEYEEFFPELENNKTMNRAENGREPHHFFETKDVSEYSC  
 RELHFTRYVTDGFCRSAKPVTELVC3GQCGFARLLPNAIRGRKWWRFSGFDRCIIFDRYRAQRVQOLLCEGGEAERARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNOSELKDGFTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

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

AGAGCCTGTGCTACTGGAAAGGTGGCGTGCCTCTGGTACCATGCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCCTGC  
 CTGCTGGTACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCCTGAAATGATGCCACGGAAATCATCG  
 CGAGCTCGGGAGTAGCCCCGAGCCCTCACCGGAGCTGGAGAACACAAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGC  
 CTCCCCACCACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGAGCTGCACCTCACCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCCGTGCCGAGCGCCAAGCCGGTACCGAGCTGGTGTCTCCGGCCAGTGCGCCCGGGCGCCTGCTGCCAACGC  
 CATCGGCCGCCGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCCGAGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCCCCTGGTGGAGGCCGCCGCGCGCAGGTGCGCCTGGTGGCCCTGCTGCAAGTGCAGGCCCTCACCG  
 CGCTTCCACACCCAGTCGGAGCTCAAGACTCGGGACCGAGGCCGCTGGCCGAGAACGGCCGGAGGCCGCCGCG  
 CGCCCGGAGCGCCAAGCCAACCAGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAGAGCCGCCGCCCCCTCCCCACCGGCGGGC  
 GCCCCGGCCCTGAAACCGCGCCCCCGTTCTGTCTCTGCCGTGGTTGATTGTTATATTCATTGTAATTGCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCAGGCCCTGAGGAATCCGGCCGCGGAAAGGCCGCCCTCAGCCGCCAGCTG  
 AGGGGTCCCCACGGGGCAGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCTCTGGGCCGCTACCT  
 TTGGCTGGTCCCACCTCAGAGGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGGGTGTGGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTGGATAAGATTCCCCCTGCACTCGCTGCCATCAGAAAGCCTGAGCGTGC  
 CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGGTTCTAGTCTGGCTGCACTAACCTGCTGTGTAACCTGAC  
 TACACAAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATTAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGA  
 CAGTTGCATTGATTGAGTCACCGCCAGGTCACCTCCAGAATTGAGGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAA  
 CAACACAAAAAAAGTAAAGAGTCTATTATGGCTGACATATTACGGCTGACAAACTCCTGGAAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCAGCCTGGCTCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAGAAATACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGGGAGGGATAGAAATCACATCGCCCAACTTCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTTAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTGCAGGGCCGAGGGAGC  
 AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTGAGACACCCGCTCTGCCCAACACTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGAAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAGAATATTATGGGGAAAAACTACAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTGAAAATCATTCCAGACAAACCTC

- 116 -

TTACTTTCTGTAGTTTAAATTGTTAAAAAAGGGTTAACAGAACACATGACATATGAAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTCGTTTTGGCAATTCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAGAATGAARGTAGTGGTTTTAAAGAGTTAAGTTCAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATGCAAAAGTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTGCTTTATGAAATTAA  
 CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

**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)**

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTGGCGTGCCCCCTCCTCTGGGTGGTACCATGAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCATCTSC  
 CTGCTGGTACCCACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCGGGGTGGCAGGGCTCAGGAAATGCAACGGAAATCATCCG  
 CGAGCTGGAGAGTACCCCGAGCCTCACCGAGCTGGAGAACACAAGACCATGAACCGGGGGAGAACGGAGGGGGC  
 CTCACCCACCAACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTCACCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCGTGCCGCAGCGCCAAGCCGGTACCCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGGGGCCCGCTGCTGCCAACCG  
 CATCGGCCGGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCACTTCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGCTCCGGTGGTGGCGCCGCGCGCGAACGGTGGCCCTGGTGGCTCGTGCAGTGCAGCGCTCACC  
 CGCTTCCACAAACAGTCGGAGCTCPAGGACTTCGGGACCGAGGGCCCTGGCCGCGAGAAGGGCCGGAGCCGGGGCC  
 CGCCCGGAGCGCCAAAGCCAACCAACGAGCTGGAGAACCGCTACTAGAGCCCCCCCCCGCCCCCTCCCCACCGGGGGC  
 GCCCCGGCCCTGAACCCCGGCCAACATTCTGTCTCGCGCTGGTTTGATTGTTATATTCAATTGTAATGCGTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCAAGGCCCGCTCACGGCCAGCTG  
 AGGGGTCCCAGGGGCAGGGGAGGGPATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCCAGCCCCGCTCTGGGCCCTACCT  
 TTGCTGGTCCCCTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTGGATAAGATTCCCCCTGCACTCGCTGCCACATAGAAAGCCTGAGGGTGC  
 CCAGAGCACCPACTGGGGCACTGTAGATGTGGTTCTAGTCCCTGGCTCTGCCACTAACCTGCTGTGAAACCTTGAAAC  
 TACACAAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTGTAAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAATG  
 CAGTTGCATTGATTCAAGTGCAGGTCACTTCCAGAACCTAGTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA  
 CAAACAGAAAAAGTAAAGAGTCATTTATGGCTGACATATTACGGCTGACAAACTCCCTGGAAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCCCAGCCCTGGCTTCCCGGATTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTAAAGAAATAACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCAACCTCCAAAGAGCAGCAGCATCCCTCCCCG  
 ACCCATAGCCATGTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTGAAGGTTCAAGGAACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC

AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTCTGCCAACACTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGAAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAGAATATTATTGGGGGAAAAACTACAGT  
 GCTGTACATATGCTGAGAAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTGAAAATCATTTCCAGACAAACCTC  
 TTACTTTCTGTGAGTTTAATTGTTAAAAAAAGTTTAAACAGAAGCACATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT  
 GGTGTTTTTGCAATTCTCACGTGGACTTGTCCACAAGAAATGAAGACTAGTGGTTTTAAAGAGTTAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTATGCAAAAGTTTCTTAGAGAAATGACAATGTTAATATTGCTTATGAAATTAA  
 CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAAAGACAATGAACTGACCGAAAG  
 :QQLFLALCLICLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATEIIRELGEYFEFFFELENNKTMNRAENGREPHFFETKDVSEYSC  
 RELHETRYVTDGFREAKFVTELVCSGQCGFARLLFNAIGRGKWWRESGFDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGEAPRARKVR  
 LVASCKCKRLTRFHNHQSELKDFGTEAARFQKGRKFPRARSAKANQAELENAY

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

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTGGCGTGCCTCCCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCCTGCTGC  
 CTGCTGGTACACAGCCTCCGTGAGTGGAGGGCAGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCG  
 CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACAAACAAAGACCATGAAACGGGGGGAGAACGGAGGGCGC  
 CTCCCCACCAACCCCTTGAGACCAAAGACGTGTCGGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGAT  
 GGGCGTGCCTCAGCGCCAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCCGGCCAGTGCAGGGCCGGCGCCTGCTGCCAACGC  
 CATCGGCCGCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGCGTGC  
 AGCTGCTGTGTCGGTGGTGGCGCCGCGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAAGCGCCTCACC  
 CGCTTCCACAAACCAGTGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGGCGCTCGCCGAGAAGGGCCGAAAGCCGGCCCG  
 CGCCCGGAGCGCCAAGCCAACCAGGGCAGCTGGAGAACCGCTACTAGAGCCGCCGCGCCCTCCCCACCGCGGGC  
 GCCCCGGCCCTGAACCCGGCCCCACATTCTGCTCTGCGCGTGGTTGATTGTTATATTCAATTGAAATGCCCTGC  
 AACCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCAAGGCCCTCAGCCGCCAGCTG  
 AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGGAGGGATTGAGAGTCACAGACACTGAGCCACGCAGCCCCGCCTCTGGGCCCTACCT  
 TTGCTGGTCCCACCTCAGAGGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTCACCGCCCTGGGTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG  
 GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC  
 CCAGAGCACAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTAACTGCTGTGTAACCTGAAC  
 TACACAATTCTCCTCGGGACCTCAATTCCACTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT  
 TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTGAAATGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGAATG

CAGTTGCATTGATTCACTGCCAAGCTCACTTCCAGAATTCAAGAGTTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAGAGATGA<sup>AAAAAA</sup>  
 CAAGCAG<sup>AAAAAAAAAA</sup>AGTAAAGH<sup>CT</sup>CTATTTATGGCTGACATATTACGGCTGACA<sup>A</sup>ACTCTGGAAAGAAGCTATGCTG  
 CTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGAT<sup>T</sup>TTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGA<sup>A</sup>TAACATCATCCATTGGGTAGA  
 AAAGGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGAGGGATAGAA<sup>A</sup>TCACATCCGGCCCC<sup>A</sup>CTTCCAAAGAGCAGCAGCATCCCTCCCCG  
 ACCC<sup>A</sup>TCAGCCATGTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTGA<sup>A</sup>GGTTCA<sup>A</sup>GGACACTGGCCTTGAGGCCCGAGGAGC  
 AGCCATCACAA<sup>A</sup>CTCACAGACCAGC<sup>A</sup>ATCCCTTTGAGACACCGCCTCTGCCACC<sup>A</sup>CTCACGGACACATTCTGCCT  
 AGA<sup>AAA</sup>ACAGCTTACTGCTCTTACATGTGATGGC<sup>A</sup>ATATTACACTAAAGA<sup>A</sup>ATTATTGGGGAA<sup>AA</sup>ACTACAGT  
 GCTGTAC<sup>A</sup>TATGCTGAGAA<sup>A</sup>CTGCP<sup>A</sup>GCATAATAGCTGCCACCC<sup>A</sup>ATCTTTGAA<sup>A</sup>NTCA<sup>A</sup>TTCCAGACAC<sup>A</sup>CTC  
 TTACTTTCTGTGAGTTAAATTSTTA<sup>A</sup>GGTT<sup>A</sup>GGAGTT<sup>A</sup>GGAGCAGACATGACATATGA<sup>A</sup>GGCTGCAGGACT  
 GGTCGTTTTGGC<sup>A</sup>TTCTCCAGTGGACTTGTCCP<sup>A</sup>AGAATGAGAGTAGTGGTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT  
 ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTATGCAA<sup>A</sup>AGTTTCTGTAGAGALTGACAA<sup>A</sup>TGTTAATATTGCTTATGAATTAA  
 CAGTCTGTTCTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAG

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

MQLFLALCLVLLVHTAFRVVEGQWQAFKNDATEIIR<sup>E</sup>LG<sup>E</sup>Y<sup>F</sup>FFFELENNKTMR<sup>R</sup>ENGGR<sup>F</sup>HFFETKD<sup>V</sup>SEYSC  
 RELHFTRYVTDFCRSAKEFVTELVC<sup>S</sup>QCGFARL<sup>L</sup>PN<sup>A</sup>IGRGKWWRESGEDRCIFDRYRAQRVQLLC<sup>E</sup>GGEA<sup>R</sup>ARKVR  
 LVASCKCKRLTREHNQSELKDFGTE<sup>A</sup>RPQKGRKFRFRARS<sup>A</sup>KANQAELENAY

5

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

ATGCAGCTCCACTGGCCCTGTGTTGCTGCCTGCTGGTACACGCAGCCTTCCGTGTACTGGAGGGCCAGGGTGGCA  
 GCCTTCAGAATGATGCCACGGAA<sup>A</sup>TCATCCCCGAGCTGGAGAGTACCCGAGCCTCACCCGGAGCTGGAGAAC<sup>A</sup>CA  
 AGACCATGAA<sup>A</sup>CCGGGCGGAGAATGGAGGGCGGC<sup>C</sup>CCCCACCACCC<sup>C</sup>TTTGAGACCA<sup>A</sup>AGACGTGTCCGAGTACAGCTGC  
 CGAGAGCTGCACTTCACCCGCTACGTGACCGA<sup>G</sup>GGCCGTGCCGAGCGCCAA<sup>G</sup>CCAGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGG  
 CCAGTGC<sup>G</sup>GGCCCGGCACGCC<sup>A</sup>CGCCATGCCGCCGGCAAGTGGTGGCCGCCAGTGGGCCCGACTTCCGCT  
 GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCA<sup>G</sup>CGTGTGCAAGCTGCTGTGTC<sup>G</sup>CCGGTGGTGC<sup>G</sup>CCGCCGCGCAAGGTGCGC  
 CTGGTGGCCTCGTGC<sup>A</sup>GTGCAAGCGCCTCACCCGTTCCACAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGTCCCAGGCCGC  
 TCGGCCGCAGAAGGGCCGGAAGCCGGCCCGCGCCGGGGGCCAAAGCC<sup>A</sup>TCAGGCCAGCTGGAGAACGCC<sup>A</sup>CT  
 AG

10

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

- 119 -

MQLFLPLCLVCLLVHAAFRVVEGQSWQAFKNDATEIIIFGLGEYFEPPELENNKTMNRENGGRFEHHFETKDVSEYS  
RELHFTRYVTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLPNAIGRGRWWRFNGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAPRKVR  
LVASCKCKRLTRFHQNQSELKDGFEPAREQKGRKPRERARGAKANQAELENAY

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

5

ATGCAGCCCTCACTAGCCCCGTGCCATCTGCCACTTGTGCACGCTGCCCTCTGTGCTGGAGGGCCAGGGGTGCCA  
AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTATCCCAGGGCTTGGAGAGTCCCCGAGCCTCCTCCTGAGAACCAACCAAGCCA  
TGAACCGGGCGGAGAGTGGAGGCAGACCTCCCCACCATCCCTATGACGCCAAGGTGTGTCGAGTACAAGCTGCCCGAG  
CTGCACTACACCCGCTTCTGACAGACGGCCATGCCGAGGCCAAGGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCCGGCCAGTG  
CGGCCCCCGCCGGCTGCTGCCAAGCCATGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAGGGACCGGATTCCGCTGCATCC  
CGGATCGUTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTG  
GCCTCGTGCAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAAACCGCTGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGGAGACCGCGCCGC  
GCAGAAGGGTCGCPAGCCGCGGCCCGGCCGGAGCCAAAGCCACCGAGCTGGAGACCGCTACTAGAG

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

10

MQESLAECCLIICLLVHAAFCAVEGQGWQAFRNDATEVI FGLGEYFEPPELENNKTMNRENGGRFEHHFETKDVSEYS  
LHYTRFLTDGFCRSAKFVTELVCSGQCGFARLLPNAIGRGRWWRFNGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCFGGAAPRSRKVRLV  
ASCKCKRLTRFHQNQSELKDGFEPAREQKGRKPRERARGAKANQAELENAY

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

15

GAGGACCGAGTGCCCTTCTCCCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCTTGCCCTGCCCTGCTTGACATGCA  
GCCTTCGTTGCTGTGGAGAGCCAGGGTGGCAAGCCTCAAGAAATGATGCCACAGAAATCATCCGGACTCAGAGAGTA  
CCAGAGCCTCCTCAGGAATAGAGAACCAACCAGACCATGAAACCGGGCCGAGAACGGAGGCAGACCCCCCACCATCCTT  
ATGACACCAAAGACGTGTCGAGTACAGCTGCCGAGCTGCACATACACCCGCTTGTGACCGACGGCCGTGCCGAGT  
GCCAAGCCGGTCACCGAGTTGGTGTGCTCGGCCAGTGCGGCCCGCGCTGCTGCCAACGCCATCGGGCGCGTGA  
GTGGTGGCGCCCGAACGGACCGACTTCGCTGCATCCGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCG  
GCGGCCGCGCCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACCCGCTTCCACAAACCAAG

- 120 -

TCGGAGCTCAGGACTTCGGACCTGAGACCGCGGGCCGCAGAAGGGTGGCTAGCCGGCCCCGGCGUCGGGAACCGAA  
AGCCAAACCRAGGCGGGAGCTGGAGAACGGCTACTAG

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

MQLSLAPCLACLLVHAAFFVAVESQSWQAFKNDATEIIIFGLREYEEFFPQELENHQTMRAENGGRFFHHEYDTKDVESEYI  
RELHYTRFVTDGFCRSAKEVTELVCSGQCGFARLLENAIGRVKWWRENEDERCIEDRYRAQRVQLLCGGAAFRERKVA  
LVASCHCKRLTRFHQNSELKDFGFETARFQKGRKFRERARGAKANQAELENAY

5

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

AAGATTTATGCCACAGAAATCATCCCCGAGCTGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAAACAAAGACCATTAAAC  
CGGGGGGGAAAGGGAGGAGACCTCCCCACCAACCCCTTGAGACCAAGACGCCCTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCA  
ATTCAGGGGCTACGTGACCGATGGCCGTGCCGCCAGCGGCCAAGGCCGGTACCCGAGCTGGTGTGCTGGGCCAGTGCGGCC  
GTAUAGGAGCTGCCCCACGCCATCGGCCGCCGCCAAGTGGTGGCCGCCAGCGGGGCCAGCTCCGCTGCATCCCCGAC  
GCTTACCGGGGAGCGCGGGTGCAGCTGTTGTCTGGCGGGCGGCCGCCGCCAGCGCAAGSTGCUCCCTGGTGGCTC  
ATLWAGTATLWAGCGCCTCACTCGCTTCACAAACAGTCCGAGGCTCAAGGACTTCGGGCCAGGGCCGCCGCCAGA  
CGAGCTGGAAAGCTGGGGCCCCGCCGCCGGGGCACCAAAGCCAGCCGGGGCGA

10

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

:IDATEI:PELGEYEEPELPELNKTMRAENGGRFFHFFETKDASEYSCRELHETRYVTDGFCRSAKPVTELVCSGQCGF  
PRLLNAIGRGKWWRFSGFDFRCIEDRYRAQRVQLLCPGGAAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHQNSELKDFGPEAARFQT  
GRKLRLRERARGTKASKA

15

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

CGCGTTTGGTGAGCAGCAATTGCGCTTCGATGAGCCTGGCGTTGAGATTGATAACCTCTGCTGCACAAAAGGCAATC

20

GACCGAGCTGGACCAGCGCATTGTCGACACCGTCTCCTCGAACCTTATTGCAATGGAGTGTCAATTCAAGGAACNGCC  
 TGATCGCPAATGGTGCTATCCACGCAGCGCATTGAAACCCCTCAGGCGGATGCAATCTACAAACATCAGCCTTGGT  
 ATCCTGCGTGAATGGCCAGCGCAGAACAGGTAAACCGTCAAGTGCCTGATAAGTTAAACCTGGTGTGATACCAA  
 CATTGAAACGTTGATCGAAAACGCCGTGAAAAACGCTGCTGAATGTGCGCGCTGGATGTCACAAGCAAAAGCAAAATGGCAGCAG  
 ACAAGAAAAGCGATGGATGAACTGGCTTCTATGTCGGCAGGGCCATCATGATGGAATGTTCCCCGGTGGTGTATCTGG  
 CAGCAGTGCCTGCGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCATTGCGGSPCTTCCGGATCCGCGCTTGTACGGGG  
 GGCGACCTCGCGGGTTTCGCTATTTATGAAAATTTCGGTTAACGGCTTCCGTTCTTCGTCAAACTTAATGT  
 TTTTATTTAAAATACCCCTCTGAAAAGGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAGGGAGCTTTTGCGCTCTGTGTTCCCTTC  
 TCTGTTTGTCCGTGGAATGAAACAAATGGAAAGTCACACAAAGGCAGAGCTATCGATGATAAGGGCTCAAAACATGAGAAAT  
 TCGCGCCCGATAAAACGACTCACTATAGGGATGACGCCACTCCCGCGCAGGAGCTGGACTCCGCATG  
 CCCAGAGACGCCCGAACCCCCAACGGCTGACCTCAGGCTCTACCAAGGCTGGCTGGCTGGGCTGGGGTCAAGGC  
 TACCAAGTTCTTAAACGGTGGCTGGCTGTCTCTTGGCGCGCTCATGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTC  
 ACCGTGGAAATGTCCTGCCTTCGTTGCCATGGCAACGGGATGACGGTTACAAATCTGGTGTGGAGCTTTCTGTCCGTGTC  
 GGAAATCCAATACCCCTAAAATACCCCTAGAAGAGGAAGTAGCTGAGCCAAAGCTTCCCTGGCTCTCCAGATAAGTTTG  
 ACTTAGAGGAAAGGAAACAAATGATAAGGACCCGAGCCATCTGAAATTTCTCTAATTGACCCACTAGGAAATGTGTA  
 TATTATTGAGCTCGTATGTGTTCTTATTTAAAAAGAAAACCTTAGTCATGTTATTAAATAAGAATTCTCAGCAGTGGGA  
 GAGAACCCATTAAAGTCTTAAAGTCTTAAAGTCTGACACTAGGAAAGCGATGGCCGGGATGGCTGAGGGGCTGTAAGG  
 ATCTTCATGTCTTACATGTGTTCTGTCCCTGCACCTAGGACCTGCTSCCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT  
 TCACATGATTAGTCAGACACTTGGGGCAGGTTGCACTGACTGCATCGCTATTCCATACGGAGCACCTACTATGT  
 TCAAAACACCATATGGTGTTCACTCTTCAGAACGGTGGTGGTCATCATGGTCAATTGCTGACGGTTGGATGGTGGTAGA  
 GAGCTGAGATATAAGGACCGACTCTTCAGCATTCTGTCAAGTGGCTGTGCATTCTGCTCTGAGCAGTGGCTAAACA  
 GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTGGGAAACCTCTCCAGTCCCTCCACTCTCAACTATCCA  
 AGAACGCCAGGGGCTTGGCGGTCTCAGGAGGCTGCTGGGGACAGGTTGTTGAGTTTATCTGCAGTAGGTTGCCT  
 AGGCATAGTGTCAAGGACTGATGGCTGCCCTGGAGAACACATCCTTGCCTCATGCAAATCTGACCTTGACATGGGGC  
 GCTGCTCAGCTGGAGGATCAACTGCATACCTAACGCCAAGCCTAAAGCTTCTCGTCCACCTGAAACTCCTGGACCAAG  
 GGGCTTCCGGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTTGAGCTGACACTTCCATCTGAGGCGTGGCTGAGAGGCAGA  
 GGGAGGTGGGGCAGAGCCTTGCAGCTTCCCTCCATCTGGACAGCGCTGGCTCAGCAGCCCATAATGAGCACAGGC  
 ACATCCCCACCCACCCCCACCTTCTGTCTGAGAATTAGGCTCTGTTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 TATCCTCTCTTAGGTAGACAGGACTCTGCAGGAGAACCTGCTTGTAAAGATACTGCAGTTAAATTGGATGTTGAGG  
 GGAAAGCGAAGGGCCTTTGACCATTCAAGTACGGTACCTCTAACTCCCATCGTATTGGGGCTACTCTAGTGTCTAG  
 ACATTGCAAGAGAGCCTCAGAACACTGTAGTTACCAAGTGTGGTAGGATTGATCCTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA  
 TTCTTCACCCAGTCACCGAACATTATTCAAGTACCTACCCGTAACAGGCACCGTAGCAGGTAACGGGAC  
 CAAAGAACTGACAGACCCAGGCCCTGGAAATATAAACACCAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTAAACACTCA  
 GGCCCTTAAACACTCAGGACCCCCACCCCCACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTCAGAGAGGAAAAACTA  
 GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGTTAACGCTTGTCTGATGGTAAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTCCA

ACTCTAGGGCTATTTCTTTCTCGTGTGCGAATCTGGGTCTTACTGGGTAACTCAGGCTAGCCTCACACTCAT  
 ATCCCTCTCCATGGCTTACGAGTGCTAGGATTCCAGGTGTGTGCTACCCTGTCTGACTCCCTTAGCTTGTCTATAACCA  
 TCCTCACAAACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACACCGGAAGGGAGCTGGGAATCTCCACAGAGGGCTCCGCAGGATG  
 ACAGGGCGAATGCCCTACACAGAAGGTGGGAAGGGGAAGCAAGGGGAACAGCATGGCGTGGGACCAAAAGTCATTTGGG  
 AACGCTGCCGGTAACCGTATATGGCTGGGTGAGGGAGAGGTCACTGAGATGAGGCAGGAAAGGCCACAGCAGGCAGCGGG  
 TACGGGCTCCTTATTGCCAAGAGGCTCGGATCTCCCTCTTCCCTCCGGGCTGCGTGTCTGATTTCCACACTG  
 CCTCCUCATCAGGTCTGTGGCTCAGGACATCACCCAGCTGCAGAATCTGGGCACTCACCCACGGCTCTGAATGCTGCCAGG  
 SCAGGGCTCTCATGCCACCGTCAACCCAGTGTAGCTTACGAGGATTCTGGCATCACCTACTTGGGATCAAGGCCAAT  
 GATACGGCAGGAGTTCAACCTCAGTGCTTACTTTGAAGGGCCACAGATTCTGACCCAGGGCTGGGCCATAAAAATGG  
 TAAGGAAACGTACATTCCGGCACCATGGAGCGTAAGCCCTCTGGGACCTGCTTCCCAAGAGGCCCACTTGAAGGAA  
 SGTTCCAGAAAAGATCCCACCAACTGCCACCAACTAGGGATTAPGTGTCTTACATGTGAGCCGATGGGGCCACTGCATAT  
 AATCTGTGCCATAGACATGACAATGGTAAATATATTTCAGACAGAGAGCAGGGAGTTAGSTAGCTGTGCTCTTCCCT  
 TATTGAGGTGCCCCATTTTTATTGATGTATGTGATACATGTGTGTCACACATGCCATAGGTTGATACTGAACACC  
 GTCTTCATGTTCCCCACCCACCTTATTGGAGGGCTCTTCCCTGATCTGGGCTCATGGTTATCTAG  
 AGCTGCTTGGCCAGTGTGAGCTCTGGAGTTCTGCTTCTACCTCCCTAGGCTGGACTGCAGGGCATGTGCTGGCCAG  
 GCTTTTATGTCGCGTTGGGATCTGAACTTAGGTCCCTAGGCTGAGCACCGTAAGAGACTCTGCCACATCCCCAGCCTGT  
 TTGAGCAGTGAACCACTCCCAAGAATTCCCCCAGGATTCTGGGCTTTCTAACCTTTTATTGGCTAGGCATTGAGTGGTC  
 ACCTCGCCAGAGGAATGAGTGGCCACGGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGATACTGGGTTAAGTCTTCTGCCGCTC  
 GCTCCCTGCGAGCCGAGACAGAAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAGTGGTCAGACAGGACAGAAGGCTGAGGGTC  
 ACAGGGCAGATGTCAGCAGAGCAGACAGGTTCTCCCTCTGTGGGGAGGGTGGCCACTGCAGGGTGAATTGGCCTCT  
 TTGTCGCTCCATAGAGGCTCTGGTAACAGCTTACAGCTTGGCTCTGGTATTCCAAAGAGAATCTCCCTACCTGTC  
 CTTACAGAAGTTCTATTGACTGGTCAACGGTTAACAGCTTGGCTCTGGTGGACGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC  
 AAAGAGCTCATTCACGAATGAAACACACACACACACACACACACACACACAGCTAATTGATATGCCCTAACTA  
 ACTCAGTGTGACTGGCATTCTGAAACATCCCTGAAGTTAGCACACATTCCCTCTGGTGTCTGGCTTAACACCTCTA  
 ATCTATATTTATCTTGCTGCCCTGTTACCTCTGAGAAGCCCTAGGGCACTTCCCTCGCACCTACATTGCTGGAT  
 GGTTCTCTCCCTGCGCTCTTAAATCTGATCCCTCTGCTCTGACCCATGGGAAACAGCCCAATAACTGAGTTAGACATA  
 AACAGTCTCTAGCCAAACTCAGTAAATTAGACAATAAAATCTTACTGGTGTGAAATCTTAAAGATTCTCATGACC  
 TCCTTCACATGGCACGGAGTATGAAGCTTATTACAATTGTTATTGATCAAACACTCATAAAAAGCCAGTTGTCTTC  
 ACCTGCTCAAGGAAGGAACAAAATTCTACCTTAACTGATCTGTCACCTTGACAACTCCATACGAATACTTAAAGAGTAC  
 TAAGTTTGTTGTGAGAGTCACATGTTACAGAAATGTACAGCTTGAACAGGTGCATCCTGGGATGCCGAAGTGCACCT  
 GCTGTTCCAGCCCCCTACCTCTGAGGCTGTTGGAAAGCAATGCTCTGGAAGCAACTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAC  
 AGCGGGTCACTTCAGCATCCCGATGACGAATCCCGCAAAGCTGTACATTCTGTAACAGACTGGGAAGCTGCAGACTTT  
 AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAATCCCTGTACACCCAAACCGAGGCCCTCTCCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC  
 ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGTGAGGCTTCACCCCTCTCAGATGGCAGTGGTGGTCA  
 CCTCATTCAGGGAACTCTGGGGCATTCTGCCTTTACTCCCTCTTGTGACTACAGGAAATATATGCTGACTTGTGTTTG  
 CCTTGTTGATGGGGAGACTGGATCTTGCTGGAAATGTTCCCTGCTAGTTTCCCCATCCTTGGCAACCCCTATCTA

TATCTTACCACTAGGCATAGTGGCCCTCGTTCTGAGGCTGCCCTCAGGCTGGTCTCGGGGACCATGTCCTGGTTCT  
 CCCCAGCATATGGTGTTCACAGTGTTCAGTGCCCCGGGGATTGCATCCCAGAGCTCCGGTGC  
 TTGTGGGTAACAGTGTAAAGATAAATGGATACTGGCCTCTCTATCCACTTGCAAGGACTCTAGGGAACAGGAATCCATTACTGAGAAAACC  
 AGGGGCTAGGGAGCAGGGAGGTAGCTGGGAGCTGAAGTGTGTTGGCGACTAACCAATGAATACCAAGAGTTGGATCTCTAG  
 AATACTCTAAATCTGGTGGGCAGAGTGGCCTGCTGAAATCCCAGAACCTGGGAGGCGAGACAGGAATCATCAGA  
 GCAGAACTGGCTAACCGAGAATAGCAGAACACTGAGCTCTGGCTCTGTGAGAGATCTGCCTTAACATATAAGAGAGAGAA  
 TAAAAACATTGAAAGAGACAGTAGATGCCATTAAAGCCCGAACATGCAATGGACAAGTGTGGCTTTGAAACACACATAT  
 GCACTCATGTGAAACAGGCATGCACACTGGCCTTATCACACCATPATTGAAAGAGAGAGTGAAGAGAGAGTGCAC  
 ATTAGAGTTACAGGAAGTGTGAGTGAGCACCCATGCAACAGACATGTGTGCCAGGGAGTAGGAAGGGAGCTGGG  
 TTTGTGATAAGAGGGAGCCATCATGTGTTCTAAGGAGGGCTGTGAAGGAGGGCTGTGTGGGCTGGGAGCTGGAGCAT  
 GGGTGTAACTGAGCATGCTCCCTGTGGGAAACAGGAGGGTGGCCACCCCTGCAAGAGGGTCCCAGTGTCCAGGGGATCAGT  
 AAAAGCCCCCTGCTGAGAACTTAGGTTATGCCAGAGAGGAAGGTAGGAAGTGGGGGACTCCCCTCTGTGAG  
 GAGGATCTGGCAAGTAGAGGTGCCTTGAGGTAGAAAGGGGCTGCAGAGGAGATGCTTAAATTGTGGCTAGCAGTT  
 TCTTTCACAAATAATGCTGTGAGGAGGTGTAGGTGGCCATTCTCACTCACTCAGCAGAGGGATGATGATGCCCGTGG  
 TGCTGGAAATGCCAGGCATCACCCCTGGCTCTGGAAAGAACCTCCATCTTCAGAAGGGAGATGGATCTGTGATGCCAG  
 CGGGGTCAAGGTGCTTGGGCCCCCTGGGGACTCCTAGCACTGGCTGATCTTATGCCAGTGTCTTGTGCGCAGGGCAG  
 TGGCCTGGGCTTGTCTGTCTGTGTTCTGTTCTGAGACAGACTCTGCTATGATCCGTGTCAATCTGG  
 ATCTCACTGCATAGCCCAAGGCTGCGGAGAGAGGGGAGGGCAATAGGCCTTGTAAAGCAAGCCACACTTCAGAGACTAGAC  
 TCCACCCCTGCGAATGATGACAGGTCAGAGCTGAGTTCCGGAAAGATTTTCTGAGCTGCCAGGTGGAGTGTGGAGTGGC  
 AGCTAGCGCAAGGGTAGAGGGCGAGCTCCCTGTGCAAGGAGAACATGCAAGCAAGAGATGGCAAGCCAGTGTGAGTTAACAT  
 TCTGTGTGGGAGCAGGTGGATGAAGAGAGAGCTGGCTTCCCTCTGGGGGGGGTGAAGGGGTGGGATGAGGTGA  
 GAGGAGGGCAGCTCCCTGCAGTGTGATGAGATTTCCTGACAGTGTACCTTGGCCTCTCCCTCCCCACTTCCCTCT  
 TCCCTTCTCCACCATGCTTCTGTGAGAAATTCTGAGTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTGAGGAGACGGAAACAGA  
 AGCCGT  
 GTATGTGTGTCACTGGGAAATGGCTCATAGTCTGCAGGAAGGTGGCAGGAAGGAATAGCTGTAGGCTGAGGAGCTGTGG  
 GATGCAGGGAGAGAGGGAGGGAGGGATACCAAGAGAGGAATTAAAGGGAGCTACAGAGGGCATTGTGGGTGTGTGT  
 TGT  
 GT  
 AACTGGAGTTGGAGGGAGGTGTGAGTCCCTGACATGTTGCTGGAAACTGAACCCGGTCCATGCAAGAGAGCAGGAAGT  
 GCAGTTATCTGCTGAGCCATCTCCAGTCCTGAAATCCATTCTTAAACATACAGTGGCAGAGACATGATGGGATTTA  
 CGTATGGATTAAATGTGGCGGTCAATTAGTTCGGCACAGGCAAGCACCTGTAAAGCCATCACACACACCGCAACAGTGA  
 ATGTGACCATCACCCCCATGTTCTCATGTCACACTCTTATGTCAGTGAAGTCACACAGCCTGCACCCCTTCCTGGTGT  
 TCGCTGGAGAACAGTGTGCATCTGCACACTCTTATGTCAGTGAAGTCACACAGCCTGCACCCCTTCCTGGTGT  
 TGGGTTCTGACTCTGCTATCACACACTACTGTACTGCATTCTCGCTCTTTTTAAACATTTTTTATGTGTGTGTGTGT  
 GTGTATGCACATGTGCCACATGTGTCAGATACTATGGAGGCCAGAAGAGGCCATGGCCGCTCCCTGGAGCTGGAGTTACA

GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGGTGTGGGTGCTGGGAACCAAACCTTAACTCTAAAGCAAGCATTAACTGCTGAGGCAGC  
 TCTCAGTACCCCTCTTCATTTCTCCGCTGGGTTCCATTSTATGAGCACATGTAGCTAGPATATCTTGCTTATCTAATT  
 TGTACATTGTTTGTGCTAAGAGAGTAAATGCTCTATAGCCTGAGCTGGCCTAACCTTGGCCATCCTCCTGCCTCAGCC  
 TCCTCCCTGAGTGTAGGATGACAGGGCAGTGGTAACCTACATGGTTCATGTTGTTCAAGACTGAAGGATAACAT  
 TCATACAGAGAAGGCTGGGTGACAGAGTGTGCACTGAACTGGCAGAACCGTGTCAAGAAAACAAACTCAGGG  
 CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTGGGAGTTCAATTCCAGCAACCACATGGTGGCTCACAGGCCATCTA  
 TAACGAGAGATCTGACGCCCTCTCTGGTGTGCTGAAAGACAGCTACAGTAACTCACATAAAATAATAATCTTAAAC  
 ACACACACACACACAAATTACCAACCCAGAAGGCCAACCTCTGTTGGCTCCACGCTCTGCTACAGTACTCTCCAGGTT  
 ACCACTTTCAAGGCTTCTAACAACTGGTTACTTGGGCTCTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTGTGTGCTGCTCAT  
 ACAGGTTCTTCTAGTAAAGTGCATATTACTCTGGTTTACATGTATTATTATTGTAGTTGTGTGCGTGTGGC  
 CCATGCACTGGCACAGTGTGGGGAGTCAGAGTATTGTGAAAGGGGGCAGCTCTTCTCAATCATGTGGGTTCCAG  
 AGGGTGAACTCAGGTCATCATGTGTGGCAGCAAAATGCCCTTACCCACTGAGACATCTGCAATTCTTTTTCCCCTG  
 AGGTGGGGCTTGTCCATAGCCAAACTGGCTTGCACCTGCAGTTCAAGTGACTIONCCCTGTCTCCACCTTAAAGTA  
 TTGGPATTACGATGTGTACTACCACACCTGACTGGATCATTAATTCTTGTGAGGGGGGGAGGCCACATGCTGCAAG  
 TGAGGGATGACTGGACTGGACATGAGCGTGGAAAGCAGAGAACAGCTTCACTCTAACTGCTCTCCAACTGAGCTATT  
 GGGTTGCCAGAGAACACCTAACAGAAAGTTCTCAGTGCCTGTGGATTGGGGTTGGAGTTCAACTCATCAGCTTGA  
 TGGCTCTCTACCCACTGAGCCTCTCACTACTCTCTACCTAGATCAATTCTTTAAAGGGACTTATTAGGGGG  
 TGGAGAGATGGCTCAGCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTCCAGAGGTCTGACTTCAATTCCAGCATGCCATTGCTGG  
 GCAGTAGGGGGCGCAGGTGTTCAACGTGAGTAGCTGTTGCCAGTTCCCGGGTGGAGAACCTCTGACACCCCTGCTG  
 CCTGGTCATTCTGGGTGGGTGCACTGGTATATGCTGTGATGGAAAGACTTGACTIONTTGACTGTTACAGTGAAGTGG  
 CAGTTACACGTCTCCCCGTTCTGAGGGCCAGAAGATGGACGTCAGTCTGACTGTGAGACTGTGAGGGCAGNATG  
 GTGAGGGATGGCTCAGCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTCCAGAGGTCTGACTTCAATTCCAGCATGCCATTGCTGG  
 CCCACAGCCTTTGGAGAGGTCTGACTGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTAGGAAACACAGTATACCAACTCCCTG  
 ACCACCAAGACACGTGCCACATCTGTCACACTCTGGTCCTCGGGGCCACTCCACCCCTAGGGAGCACATGAAGAAC  
 CCTAAGAAGTTCTGCTCCTTAGCCATCCTTCTGTAATTATGCTCTCCCTGAGGTGAGGTTCAAGGTTATGTCCCT  
 TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGAACCCAGGGTGGAGGGCTATCAGGGTGCACTGGCCGGACACGGCACTCT  
 GACCCCTCCCCACCTGGTTCTTCTGTGAGGTCCAGAACACAGGAGCCTGGTAAAGGAACATATGCAAAACACAG  
 ACCTCCCCATGTCCTGTTCTGGTCCCTCACAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACGAATGACATTAAGTCTG  
 AGTGGAGATAGATTAGTGACTAGATTCCAAAAAGAAGGAAABAAAGGCTGCATTAAATTATTCCTTGAATTAA  
 AGATACTACATAGGGCCCTGGTAAGCAAAATCCATTTCAGGAGGCTATCTGATTCTTGGAAATGTTAAAGTGT  
 GCCTTGCCAGAGAGCTTACGATCTATATCTGCTGCTTCAGAGCCTCCCTGAGGGATGGCTCTGTTCCCTGCTT  
 AGAGCGATGCCTGGGCAGGGTTCCCTTCTGAGAATACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAA  
 CAAACAAACAAAGGACCTCCATTGGAGAATTGCAAGGATTATCTGAATTATAGTGTGGTGAGTTCAAGTC  
 GCCAAGTGCTTGCCTCTGGTGTATTCTAAGAATAATTAGGAGGGAAACCTAGCCAATTGCAAGCTCATG  
 GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAGGGGTGCTGCCCCCTGGGACAGAAGGAAATGAAAGGCCCTGCTC  
 AC

CCTGGCCATTACGGGAGGCTCTGCTGGTCCACGCTGTCTGCAGGAATCCTGAAACTGACTCGCTGGACAGAAGAACGAG  
 ACTTGGCGGCAACCATGAGAATGGAGAGAGAGAGAGCAAAAGAAAGAAACAGCCTTAAAGAAGACTTTCTPAGGGTGGTTT  
 TGAAACCTCGCTGGACCTTGATGTGTGACATTTGCCAGAGATTGAAACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT  
 TTGTATGTCTCCGGGTACGCAGAGCCGTAGCCACCACCCAGCACCCGGACATAGGGCTCATAAAAGCCCATT  
 TATGAGAACACAGAGGCTGTTGAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGCTGGGACCCGGATCCAGCAGCCTGGT  
 TGCCTGCCTGTAGGGATGTCTTACAGGAAGTTGCAGAGAAGCTTCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTGTG  
 ATATTCAAATTCACTTAAGTGTAAAGACTCAGCACTGTTAGGTTAGGAAACATGCCCTTCCAGAGGCTGCT  
 GCAAGAGGCAGGAGAACGAGACCTGTCTTAGGATGTCACTCCAGGGTAAGAACCTGTGATCACAGCAGGAGCAGAGCTG  
 TGCAGCCTGGATGGTCATTGTCCCCATTCTGTGACCCACGGACACCTGGTCACATAGGGCTGGTCATCCTTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTGGCCCAAGAATGAAAGTGAACCATGGCAAGTGTGACCTGGGCTTGTGATGGTTAGTTCCAAGCGGCT  
 CTCTTGCTCAAATACAATGTGCAATTCAAAATAACACTGTAGAGTTGACAGAACTGGTTAGTGTGTTATGAGAGAGGAAAG  
 GPGAGGAAAGAACAAACAAAC  
 GCCCAGTTCATGAGAGGGCAGAGACAGGAAGACCGCCGAAAGGTCAAGGATAGCATGGTCTACGTATCGAGACTCCAGCC  
 GGGCTACGGTCCCAGGTCCTAGGTTTGGATTGGCTTGGTTGGAGAACAGGGTTCTCTGTGTAAGCCTGGCT  
 TCCCTGAAACTCGCTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACTTAGAGATCTGUCCTGACTCTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT  
 GCGACCAACTGCCAACTAAGATTCCATTAAAGAAAAAAAGTTCAAGATAATTAAAGAGTTGCCAGCTGGTAAAGCTA  
 GTAGAAGCAAGTCTCAGGCCCTGCTGCTGAGGCTGTTGGCTTGGACCTGAATCTGCCCTAACAGTGTCCAAGTGC  
 CATGACCTTGAGCCATCTCCAGAGAACGGAAAGTGAAGGAAATTGTGGCTCCCCAGTCGATTGGGACACAGTCTCTTGTCTA  
 GGTAACACATGGTGAACCATAGCATTGAACCTCTGAGGGTGGTTCCCTCCCCCTGCCCTCTGGGTTGGC  
 ACCCCATAGGAACGCCACAGGACAGTCACTAGCACCTACTGGAAACCTTTGTGGGAACATGAAGAACAGCCTTGGG  
 AGATTCCCTGGCTTCCATTAGGGCTGAAAGTACAACGGTTCTGGCTTGGCTTGCCTCGTGTGTTATAAGACTAGCTACTA  
 TTCTTCAGGTAAATACCGATGTTGGAAAGCCAAACCCCGTGGCTGCCGTGAGTAGGGGTGGGGTTGGGAATCCTG  
 GATAGTGTCTATCCATTGAAAGTGGTGGAAAGGAAATTGAGGATTTGGGTGTTCCCCCCCCCCCCAACCTCTCAGACCCAG  
 CCACCTTCTATGACTTAAACATCCAGGTAAATTACAAACATAAAATGTTCTCTTCATACTTCTAAAGTCTG  
 CCTGCCCTTCCAGGGGTAGGTCTGTTCTTGCTGTTCTATTGCTTGTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAATGAGGG  
 AACCTCTGGCCCATACTAAGGCTCTCTGGCTCCAGCACTCTAGTTATTAAAGAATTCTCACTTGGCCTTGTG  
 ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGGATAATGCCATGCCAGCAGGGGGCACTGTTGAGGCAGGGTGCCTTCCACCTTAAG  
 TTGCTTATAGTATTAAAGATGCTAAATGTTTAATCAAGAGAACGACTGATCTTAAACAGGAGATAGAGAATAGCTGGATATT  
 ACAGGAATGTCTTTCTATAATTCTTACAGGCTTGTCTGATCGTAGCATAGAGAACGAGATATTCT  
 TGTATTCCATTTCCTGCCAGCGTAGGTTAACCGTAAAGTGATTCACTGGACCGAAGAGGCTCAGAGGGCAGG  
 GGATGGTGGGGTGAGGCAGGCACTGTCACCTGCCAGGCATGGGAGGTCTGCCATCCGGGAGGGAAAGGAAAGTTAGC  
 CTCTAGTCTACCACCAAGTGTAAACGCACTCTAAAGTTGTAACCAAAATGTCTTACATTACAAAGACGTCTGTTTG  
 TGTTCTTGTGTTGGCTTTATGTTGCTTATAACTGCTGTGGTGGCTGTTAGTTGAGGTAGGA  
 TCTCAGGCTGGCCTTGAACCTGATCGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCC  
 AAAAGCACATGCCACCCACACAGCATTCTAACATTAAATAATCACCTAGGGCTGGAGAGAGGGTTCCA  
 GCTAAGAGTGCACACTGCTCTGGTAGGACCTGAGTTAGTCCCAGAACCTATACTGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

TCCAGGACCTCTGGCCTCCATGGCATCTGCCTTAACTACCCACATACAGATAACACATAAATAATALLATGAAGC  
 CTTTAATAAACCTCCTAABACCTAAGCCTTGGAGGTACGACTCTGGAAAGCTGGCATACTGTGTAGTCATCTCATGGTG  
 TTCTGGCTAACGTAAGACTTACAGAGACAGAAGAGAAGCTCAGGGGTGTGCTGGGGTTGGGATGGAGGAGAGGGATGAGT  
 AGGGGGAGCACGGGGAACTTGGGCASTGAAATAATTCTTTCAGGACACTAGAGGAGGATAAATACCAGTCATTGCACCCAC  
 TACTGGACAACTCCAGGAATTATGCTGGGTGAAAGAAGGGCCCAAGGTATTGGCTGCATTGGCTGCATTGGTAAC  
 ATTTTTTAAATTGAAAAGAAAGAAGATGTAATTCAGGTTAGATGAGTGGGTTCTGTGAGCTGAGAGCTGGGGTGAGTGA  
 GACATGTGAGCAGTCAGGAACTTCAGGAAAGAAGGGCTGTGGTGACAGCTACCTCTAACTCCACCTCCGGGAG  
 GTGATCAGGTTAGCCCTCAGCTAACCTGTGGTGCACTGAGGCGGATGTTCAAAAGCTTTAAATAAGAAATAATGAAAGA  
 SACATCAGGGCAGATCCTTGGGGCCAAAGGCCACAGGCGGAGCTCGTGGTAAAGTCGTGTAGAAGGGATGCATGAGCA  
 CGTSCCGCAGGCATCATGAGAGAAGCCTAGGTAAAGTAAAGGGATGTTGAGCTGCGGCTGGCGTGGCGCACTGCACGTCT  
 GGCTGTGGTGTGGACTGGCATCTTGGTGAAGCTGTGAGGGAAATGGTAGGGAGATCATAAATCCCTCCGAATTAT  
 TTCAAGAACTGTCTATTACAATTATCTCAAAATATTAAAGAAGAAGAATTAAGAACAAACCTATCCAGGTGTG  
 GTGGTGTGACCTATAGCCACGGGAGCTTGGGAGAGCTGGCAGGGATGGGAGTTGAGGTATCTGGGGCTGTACA  
 GCAAGACCGTCGTCGGAAACCAAAACCAAAACGCAACGCAAGCCTTATGTACACAAAGAGGTGTTATAGTGAGCGGCTCGCT  
 GAGAGCATGGGCTGGGGTGGGGTGGGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 TTGACTGCAGCTAACCTGGGAATGATAAGGGTTTGTGAGGTAAAGCAGTCGATTACTGACTTAACTCAAAATGA  
 AGA  
 TCTTCGAAAGGTCCAGAGTTCATCTCCAGCAACCAATGGTGGCTCACACCAATCTGTAACGAGATATGATGCCCTCTT  
 CTGGTGTGTCGAGACAGCTACAGTGTACTTACATATAATAAAATCTTAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA  
 CGAGCAACAGGCCCAAAACAGAAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 CATGGGGCGAGGGAGGTCAGAGAGTAGGCTGGTAAAGCTCAGTTCTCTGTATACCCCTTTCTGTGACACTACTTC  
 AAATACAGATAAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAAATAACAA  
 CAGGTGGCGGAAGTGTCCAAGGAGAGATCGCAGTCATTAAGGTGGCCAGCAATACTCCCAAGTCTGGAGCAATAGGAAGCTTCTGGC  
 CCAGACAGGGTTAACAGTCCACATTCCAGAGCAGGGAGLAGGAGACTGGAGGTACAGACAAAGGGCCAGCTTCAAC  
 AACCTCACAGCTCTGGTAGGGAGAGATAGATCACCCCCAACATGCCACAGCTGGTTGTCAAGAGCAGCTGCATTGAT  
 CTTAGGAAGCAGGTATCAGAGTCCCTCTGAGGGAGCTCTGTCTGCCTGTAAAGCTGTCAGAGCAGCTGCATTGAT  
 GTGTGGGTGACAGAAAGATGAAAAGGAGGAGCCAGGCAGATGCCACAGATGGACCGGCCACTTACAAGTCGAGGCAGGTG  
 GCAGAGCCTTGAGAAGCTCTGCAGGTGGACGACACTGATTCACTACCCAGTTAGCATACCAACAGCGGGCTAGGCGGACC  
 ACAGCCTCCCTCCAGTCTCCTCCAGGGCTGGGAGTCCTCCACCTCTGTCTCAGTGCAGCTTCCGCCAGCCCCCTCC  
 TCCTTTGCACCTGAGGTGTGAAACCTCCCTCCTCTCCTCTCCAGGGCTGGGATCTTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 TTGGATTCTTGTGCTTAGATAGACCTGAGATGGCTTCTGATTTATATATATATCCATCCCTGGATCTTACATCT  
 AGGACCCAGAGCTGTTGTGATACCATAAAGGGCTGGGGAGATGATATGGTAAGAGTGTGCTGTACAGCATGAAGAC  
 ATGAGTTGCAATCCCCAGCAACCATGTGGAAAAATAACCTTCTAACCTCAGAGTTGAGGGAAAGGCGGGTGGATTCTGG  
 GGGCTTACTGGCCAGCTAGCCAGCCTAACCTAAATGTCTCAGTCAGAGATCCTGTCTCAGGGAAATACTTGGGAGAATGA  
 CTGAGAAAGACACCTCCTCAGGTCTCCATGCACCCACACAGACACACAGGGGGGGGTAAATGTAATAAGCTAAGAAATA



TTTGGGGCAAGTTCTTCTGCGCTGGACCTGTGATAATGAGGGGGTTGGACGCCGCCTTGGTCGCTTCAAGCT  
AATGAATTCTTATCCCTACCCACTGCCCTCTACCCCGCTCTCACAGCAGCTGTCTGATTTATTACCTTCATTAC  
CTCCACTCCTTCTCCATCTCCTGGATAACCGCCCTGTCCCAGTGGCTGGTAAGGAGCTTAGGAGGACAGAGCAG  
GTGAGGCTAGAGGCTACAGGCAGGCTGGGATGAGGAGCTAACTGGAGAGGTGTTGGTAGTAGGCACAAAGCCT  
GGGGGGATCCCTGATACCGGAGAGTGGAGATGGGCTGAGAAAGTTCAGAACCCATCCATCTTAACTACACAGGCCGT  
TTGAGGCCAGCCTGGGCTACATAAAACCCAATCTCAAAAGCTGCCAATTCTGATTCTGTGCCACGTAGTGCCGATGTA  
ATATGTGGATGAAAGTGTGAACTCTGGGCAACCTATTTACAGATGTGGGAAAGCAGCTTAAAGTACCCCTGCCAGCA  
GATCACAAAGGAAAGTGTGACAGAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCCAAAGGACAGGGAGAGAGAGGCCAGGGTGGG  
ATCTCACTGCTCCCGGTGCCCTCTTCTATAATCCATACAGATTCGAAAGGCCAGGGCAGGGCAGGTTGGAAAGAGAGGAA  
GCTGGAAAGGAGCAGCACCAAGTGTGGCTTAGGCTGCAGCCCTCACCCATCCCTCTCTCCGCAGATGTGTCCGAGTACAGT  
GCCCGAGCTGCACATCACCCGCTCTGGACAGACGGGCCATGCCAGGCCAAGCCGGTCAACCGAGTTGGGAGGGATTTCCG  
CTGCATCCCGATCCTACCGCGCGAGCGGGTGAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGGGCGCCCGCTCGCCAGGGTCAAGGTGC  
GTCTGGTGCCTGCAAGTGCAGCGCCTCACCCGCTTCCACAAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGGAGGAGCC  
GCGCGCCGAGPAGGGTGCAGCGGCCCCGGCGCCGGGGAGCCAAAGCCPACCCAGGGGGAGCTGGAGAACGCGCT  
CTAGAGCGAGCCCGCGCCTATGCAGCCCCCGCGAGATCCGATTGGTTTCACTGTAAAGCCTGCAGCCCAGGCCAGGGGT  
GCCGAGCTTCCAGACCCGTGGAGTTCCCAAGCCAGTAGAGACCCGAGGTCTTCTGCCCGCTACGGGGGGATGGGGAGG  
GGGGGGTTCCCGCGGCCAGGAGAGGAAGCTTGAGTCCCAGCTCTGCCCTAGCCCCGGGTGGGATGGGGGTCTTCTA  
CCCTCGCCGGACCTATACAGGACAGGCAGTGTTCACCTTAAAGGAAGGGAGTGTGGAACGAAAGACCTGGGACTGG  
TTATGGACGTACAGTAAGATCTACTCCTTCCACCCAAATGTAAAGCCTGCCTGGCTAGATAGGGTTCTGACCCCTGACC  
TGGCCACTGAGTGTGATGTTGGCTACGTGGTTCTTTGGTACGGTCTTCTTGTAAAAATAGGGACCGGAAGCTCTGCT  
GAGATTCCAAGGATTGGGGTACCCCGTAGACTGGTAGAGAGAGAGGAGAACAGGGGAGGGGTTAGGGAGAGATTTGG  
TGGGCAACCGCCTAGAAGAGCTGTTGGCTCCAGCCTCCGGCTCAGAGGTTGGCTTCCCCACTCTTCTC  
TCAGATCTGCCTTCAGATCCATATCTGGATAGGGAGGCCAGGGTCCGAGAGATGGTGGAAAGGGCCAGAACACTCACA  
CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCCGCCCCAAGTGCCTGTCAATTGTAAAGGGATTTCTACACAACAGTTAAGGT  
CGTTGGAGGAAACTGGGCTTGCAGTCACCTCCCATCTTGTCCCTGCCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCACGG  
ACACATTCTGTCTAGAACAGAGCGCTGCTGCTGTGAGACAGCATATCTTACATTAAAAGAATAATACGGG  
GGGGGGGGCGGAGGGCGCAAGTGTATACATATGCTGAGAAGCTGTCAAGGCCACAGCACCCACAAATCTTTGT  
AAATCATTTCCAGACACCTTACTTCTGTGATTTAATGTAAAAGGGAGGGAGAGAGAGCGTTGTAAACAGAA  
GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGGTGGGGCTGGTGAGTTGGCAACTTCCATGTGAGACTCATCCCPAAAGACTGA  
AAGCCCGCTTTTTTTAAGAGTTCACTGACATATTATTTCTCATTTAAGTTATTATGCAAACATTTTTCTTG  
TAGAGAAGGCAGTGTAAATCGCTTGTGAAGCACAAAGTGTGTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTCCCCGACCAGA  
GGCATTGTTAATAAGAGACATGTGAACTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTTGTCAACCACACAAATGTCTCGCCACT  
GTCATCTCACTCCCTCCCTGGTCAACAGACCCAAACCTTGACAAACACTCCGACTGCTCTGTGAGGCTTC  
ATACGTGTTCTTGTGAAAGTCACATTCACTTCTTGTGAAACCTGGCTCTCATCCCCAGCTGGGTCATCGTCAT  
ACCCCTACCCCAAGCCTCCCTTGTGACCAACTCTCCACACTGTCTCCAAAGTGCACGTTCAAGGCCAGTTCC

GGTCCAGGTCACTCCCATTGCTCCTCCTGCTCCAGACCCCTCTCCACAPAGATGTTCATCTCCACTCCATCAAGCCCC  
 AGTGGCCCTGCGGCATATCCCTGTCCTTCAGTTAGCTGAATCTACTTGCTGACACCACATGAATTCCCTCCCTGTCTTA  
 AGGTTCATGGAACTCTTGCTGCCCTGAACCTTCAGGACTGTCCCAGCGTCTGATGTGTCCTCTCTTGTAAAGGCC  
 CACCCCACTATTTGATTCCAATTCTAGATCTTCCTTGTCTTCATCTCCACGGCATAGTGTCTCATCTGCCAAGTCCT  
 CCTTGATATTGGATAAATGCAAGTACATTGAGGACCAAGTCACTATTGGGCCAGGCTTTCAAAATGTGAA  
 TTTTACACCTATAGAAGTGTAAAGCCTTCCAAAGCAGAGGCCAATGCCCTGGCTTCTCCATACATCAGGGCTCCTGCTT  
 TATGGGTCTGGTGGGCTAGTACATTCAAAACCCAAACACTAGGGGTGTGAAAGCAGAGTGTGATGGGAGTTGAGGGCAAT  
 CTTGGCTATGAGGCCCTGTCTCAACCTCTCCTCCCTCCAGGTTTGTGTTTGTGTTTGTGATTTGAAACTG  
 CAACACTTTAAATCCAGTCAGTGCATCTTGCGTGAAGGAACTCTATCCATAATATAGCCTCCATCTGATTTGAT  
 ATGTGCACACTGGGGTTGAACTGGGCCCTTGTACCTGCCGGGAAAGCTCTACTGCTCTAAACCCAGGCCCTCACTGG  
 CTTTCTGTTCAACTCCCAATGAATTCCCTAAATGATTATCATTGTTGAAAGGAAATACCATTGAGTGCTGCT  
 GGTGTCCTGTGGTCCAGATTCCAGGAAGGACTTTTCAGGGAACTCCAGGCATCCTGAAAGATGTCTTGGACAGGAGG  
 CATGGAGACCTTGGCCAGCCCCAACAGGGCAGTGTGGTGCAGAGGGTAGGGATGGAGGGAGGCTTGCAATTGAGCTGAG  
 CAGGGTACTCAGGATTAAAGCTCCCCAACAAATCCAGATCAGTCCCTGGTACTTGCACCTGTTCAAGCTATGCA  
 GAGCCUAGTGGCATTGGTGAAGACACCGTTGTACTGTCATGTTACTAACTGTGCTTCAGAGCCGGCAGAGAACAAAT  
 GTTATGGTACCCCCAGGGGACAGTGTGTTCCAGAAGGAAACAGAAGAGATGCTGCTAGAGGCTGCTGAGGGAGGG  
 GTCCCCAGACTCTCTAAAGCAAAAGACTCCACTCACATAAGACACAGGCTGAGCAGGCTGGGCTGGATGCAAGGGAGGCC  
 TCCACCATCCTTAGCATGCCCTTGTATTCCCATCACATGCCAGGGATGAGGGCATAGAGAGTCCAAGTGTGATGCCAA  
 ACCCAAAACACACCTAGGACTTGCTTCTGGACAGACAGATGCAGGGAGAGACTAGGTTGGGCTGTGATCCATTACCA  
 AAGAGGGAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAAC  
 GGTCAGGTTAGAGTTATTGAAAGTTATATTCTACCTCCATGGGGCTACAAGGCTGGCGCCCATCAGAAAAGAAC  
 AACAAACAGGCTGATCTGGAGGGGTGGTACTCTATGGCAGGGAGCACGTGTGCTTGGGTACAGCCAGAACGGGCTTG  
 TATTAACTCACAGGGCTTGTATTAACTAGGCTGAGAGTCAGCAGACAGAGAGACAGAAGGAAACACACACACACACA  
 CACACACACACACACACACATGCACACACACTCACTCTCACTGAAAGAGCCCTACTTACATTCTAAAGAACAAAC  
 ATTCCCTCCTCATAAAGGAGACAAAGTGCAGAAACCCAAAGAGGCCACAGGGTCCCCTCTCTTGAATGACTTGGAC  
 TTGTTGCAGGGAAGACAGAGGGCTGCAGAGGCTTCCCTGGGTGACCCAGAGGCCACAGACACTGAAATCTGGTGTGAGA  
 CCTGTATAAACCCCTCTCCACAGGTTCCCTGAAAGGAGGCCACATTCCCAACCTGTCCTCTGACCAGTGGATGAGA  
 GCACCTGGGCCTTCCCATTCTGGAGTGCACCCCTGGTTCCCATCTGAGGGCACATGAGGCTCTAGGTCTGGAAAG  
 TTCCACAAAGTATTGAAAGTGTCTTGTGTTGATTTAGGTGTATGAGTGCTTGTGAAATATGCT  
 GTGTAGCATTACAAGCCTGGTCCTGAGGGAGTCAGAAGATGGCATCAGATAACCTGGAACCTGGACTTGCAGACAGTTA  
 TGAGCCACTGTGTGGGTCTAGGAACAGAACCTGGATCCTCCGGAGAGCAGACAGCCAGCGCTTCTAGCCACTAAGCCA  
 TCACTGAGGTTCTTCTGTGCTAAAGAGACAGGAGACAAAGGAGAGTTCTTGTCAATAGGACCATGAATGTTCT  
 CGTAACGTGAGACTAGGGCAGGGTGTCCCCCAGTGACACCGATGGCCCTGTGTAGTTATTAGCAGCTCTAGTCTTATT  
 CTAAATAAGTCCCAGTTGGGAGAGATATGTATTCCCTGCTTGAAGTGGCTGAGGTCCAGTTATCTACTTCAAGT  
 ACTTGTGTTCTTCTGGAGTTGGGAAAGCTCCCTGCCCTGCTGAAATGTGTCCTTCAACCTTAGACAAGATCAC  
 TTCCCTGAGCAGTCAGGCCAGTCCAAAGCCCTCAATTAGCTTCAATAAGGAACACCCCTTTGTTGGGTGGAGGTAG



ATTGTGTGATTGTTGGTGTGACTCTGATGTCACATGCTCATCTTGCCCTATGAGTTGA  
CATAAACAAACAAACTGTTGGCTGTTGCTCACGTTTCTTAAGCGTCTGCTGGTTGCTCTAGCATCAGGCAGCT  
TGCAGCAGLUTACATATGCTCAGCCCTGAAAGTCCTCTAAGGTGATGTCCTTCAGAATTTCAGAAAGTCATCTGTC  
TCCAGGACGCCCTGCACCTCTCCCTGCGCGAGGGCTGCAGACTCTAGGCTGGGTTGGAAGCAACGCTTACCTCTGGGAC  
AAGTATAACATGTTGGCTTTCTTCCTCTGTCGGCTCCACCTGGACATAAAATAGATGCAAGCTGTGATAATAATTATT  
TCCTCCCGTCACTTAGTTCTCAACAAATAACTACTCTGAGAGCACTTATTAACTAGGTGGCTTAGACATAAGCTTTGGCTC  
ATTCCCCCACTAGCTCTACTTCTTAACCTTTCAACCAATTCTGTCCTCCACATGGTTAGTTACCTCTCCTTCCAT  
CTGGTTGCTTCTTCCTCGAGTCGCCCTCAGTGTCTCTAGGTGATGCTTAAGATATTCTTCTACAAAGCTGAGAG  
TGGTGGCACTTGCGAGTTCAAGGCCAGCCTGATCTACACAGCAGCTCCAGGATRTCCAAGGCCATGTTGGGAAAGCT  
TTCTCAACAAACAAAGAGGGGTTCAAGTGTGTCAGGAGGGAGACCCATGGTTAAGAAGTCTAGACGAGCCATGGTGTGATGCA  
CTTTCATCCAGCACTTAGGAGGCAGAGAAAGGTGAAACTCTTGACTTTGAGGCCAGCTAGGTTACATAGTGTGATACCC  
TGCTTAGT  
TATGTATAAGTATTTGCTGCACTATGTATGTATGTATGTATACCATGTTGTCCTGGTGTGAGGGACTAGGCATAG  
ACTCCCTAGAACTAGAGTCATAGACAGTTGTGACACTCCCCAACCCCCCACCAGTGTGGGTGCTGAGCTAAACTCTGT  
CTTTGTAAAGCAGGGTGTCTATGAPCCCTGAAACCATCTCCAGTCTCCAGATGTGCAAGTGTGCTTCTCAAAGAGGGAGTC  
CATTTCCCTAAACTGAACATCCTATCAGTGAGCATCCTCGAGTCACCAAGCTACTGCAAAACCCCTTCTAGGGAAACAT  
TCACTATTCACTTCACTTGGCTCATGAACTTAAGTACACACACACACACACAGAGTCATGCACTCA  
CAAAAGCAGTGTACACCATTCTATTAGACTATGCTTGCTAAAGACTTCTCTAGATACTTTAAACATCAGCTCT  
GCCTTTGGTGGCAGGTTCCAAGRTGGTACTGGCTACTGGAAACTGAAACAAGGTAGAGATCTAGAAARTCAGCAG  
TCAGAAGGGCCAGCCTGACAAAGAGAGAGTTCCACACCTCCAGGAAACACTGAGCAGGGGGCTGGACCTTGCTCTCAG  
CCCAAGAAACTAGTGTGCTTCTGTATGCTGAGGATCTCCATAGAGATTCTGCTTCTGCCATAAGATCTCCTGC  
ATCCAGACAAAGCCTAGGGGAAGTTGAGAGGCTGCCAGTCTCTCCACAGGCCCTTCTGCTGGCAGTATTTTTTA  
TCTGGAGGAAGGAATCAGGGTGGGAATGATCAAATCAAATTATCAAGGAAAAAGTAAAGAACATATATATATAT  
AACTGATCTAGGGAGCTGGCTCAGCACTTAAGAGTTCTGGCTGCCCTTGCTTCAAGATCTGCTTGTGATTCCAGCACC  
CATGATGGCTTCAGCTATCTGCTTCCAGGGGATCCACAGCCTCTGACCTCCATAGACAGACCTAGTC  
TGCAAGAGCACCAGCTTCTATCTGTTGATCCATCTCTAGCCTCATGCCAGATCATTAAAAGTACTACTGGACACTGT  
CCCATTTCAGAAAGATGTCAGTGCCTAGCAGTCTGCTGAGGATTTGCTTCTGCTTCTGCCATACCCCTTGCA  
TTTATAAGAAAGATATCTGCATTGCTCCTGAGAGAAACAAAGGGTGGAGGGCTACTGAGATGGCTTAGGGTAAAGGT  
GCTTGCCACAAATCTGACAACTTATGTTGGCTTGGAAATCCACATGGTGGAGAGAGAGAGAGATCCCGTAAGTTG  
CCTCAACTTCCCACACATGTCGCTGTCGGCTTATGTTAACCCAAAGTAAAGATAGTTAAACACTACATAAGGTAG  
GGTTTCTCATGACCCCAAGGAATGATGCCCTGATAGAGCTTATGCTGAAACCCATCTCATTGTCCTAGGGAAAG  
AGACAAATTGCACTCCCGAAACAGAACTTCATGAAATGGATTAATGAGCTTATGAGCTTAAAGAAAGTGGCTTGGTTATTG  
TGGCGGCGTAATGACCTCCACCATGATGTTATCCAGCATGAAAGGTCTCACAGAAGTCATACAAATCTCTTAGGCTC  
CAGAGTCGTGAGCAAAAAAGCACACCTCTAAATTAACAGCCTCAGGTTAGTTAACACCGAAAATGAACCAAGGC  
AGTTCTAATACAAACCACTTCCCTCCCTGTTCAAAACCAAGGCCGTTGACACACATCTGAACTCTAGTACTGGGCTCAGGGGAG  
TTTAGGTTGCCAGTATTTATGAAACAAAGGCCGTTGACACACATCTGAACTCTAGTACTGGGCTCAGGGGAG

GACAGGTGGAGCCCTGGAGTTGAAATTCCAGGTTCTGTGAGAAACTCTCTGTGAAAGACATAATGGTGAGTGA  
 AGGATATCTGATATTGACTCTGCCCCAACACACAGCCCTCTGTGACATCTGTAGTTGCAGGCCTTTGCACAAAGT  
 GCCAGAGTCAGAGTTGCAGGTGGACTGAAATGCACTGTTGCTGGTGTACATCAGAAGTCACCCCTCTCTCAAG  
 CTAGCAGCACTGGCTTCGGCCAGCTGTCATTCAAGCCTCTTGCAAGAGTCATCACGGGGATGGGGAGCAGGGCC  
 CCTAGAACACCAAGCCTGTGGTTATTCAAGGACATTATTGAGGGGCCAGATGACAGATAACTCTATCACTTGG  
 CAGTCGGGTGCGGGTGTAGGTTATTCTGTGTCTGCAGAAACAGTGCACCCCTGGACAAAGAGATAAGTGA  
 TTTTCATTCAAGGCAACTAGATTCCGTGGTACAAAAGCTCCCTGGGAGGGCGGGACAGCGGGCTCTGAGTC  
 CTATTCCGCTGTCACCTCTCTAATCTCTTGATTCTCCCTCTGTCTGTTCCCTCTTGTGGGCCAGTGG  
 GTCTGTGTACTCACAGGGAGGAGGGTGGCAAGCCCTGSGCTCTACGGGCTGGGGAGGGGGAGCTGTCGG  
 TGACTTTTCCCCTTTCTTTCTTAGAAACAGTCATTAAAGTAATGAGTCTCCTCATTCACGTGTGCTCCT  
 ATTCAAGGGACTTATCCACCCCGCCCTGTCACATCTGGCTAAGTAAGGAAAGTCAAATTAAAGGGAA  
 AAGTGTGGCTGGACCGTGTGCCGCGAACGAAACAGGGATGGGGCTCTAGTTACATGCTCTGTGCCAG  
 TTTCCTTCGAAAGGAGACCCGGAGGTAAACGAAGTGCCAACTTTGATGATGGTGTGCCAGGGGTGACTCTTAA  
 ATGTCATCCATACCTGGATAGGGAGGGCTCTCAGGGAGTCATCTAGCCCTCCCTCAGGAAAGATTCA  
 TTAGTTAGGCTTCCCTGGTCCCTATCCGCTGTCTGCCACTAGTCCTCATCCATCCGTTCCGCC  
 TTGCCCTTTAGTTCTAGAAAGCAGCACCGTAGTCTGGCAGGTGGCCATTGGTCACTCCGCTACC  
 ACTGTTACATGCTCCAGGAGGAGGGAGGGAGGAGAGATCTAAAGCTCT  
 TGAGAACTGGAGTTCAATTCCACAGCACATGGATGTTTCCAGGACCTGGAGGGAGGAGAGATCTAAAGCTCT  
 GGCCAGACAGCCAGCCTAATTAGTAATCAGTGAGGAAACCTGTCAGGAAACATCAAGGTCAACCTC  
 TTGTCCTCACACACACAATTACACATGCAACATACATCCACACAGGCAACCATGCAACACAC  
 CAAATACATACATAAAAAAATAATACATACACACATAACATACACCAACATTCCCTCTCCTTAGTCT  
 GCTCTTGTCAACCCCACTAAGGCTCACTTCTCTATTCTCATCTTGCACCTCTGTACTTTGCATGCC  
 CAAGGGCTTTCTTAAATCTCGTCATTCAAAACTCCCTCTAAATTCTTCCCTGCCCTTTCT  
 GATAAAGACACACACTACAAAGTCACCGTGGGACCAAGTTATTCA  
 CCCACCCACCCACCTGCTCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 AAGTAGTCCAACCTCTCTGGTGTGACCTGGACCCCTGGCTTCACCACAGCTCCATGCTACCCAG  
 TTCAAGCCTAGCCTCTGGTCTCCACCGACAGGCCAGTCTGGCTCTATGTCCTAGAAATCT  
 CCTCCCTCTGAAATCTACCCCTTCTTCTCCCTCTGACCTCTAATGTC  
 TGAAATTAGCAGTTGGGTACCTCAGAGTCAGCAGGGAGCTGGGATGAAATC  
 ACATTCCAGGCCTTGCTTTGCTCC  
 CGGATTCTGACAGGCGTTCCGAGCTGAGTCCAGGAGCTGAAATT  
 TCACACTCCAGCTGGCTGCTGAGCTGCTGCTGGTGGCAGTGGTGTGCTGGTGGTGTGCTGGTGGTGGT  
 GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGTGTTCTGCTTTACAAA  
 ACTTTCTAATTCTTATAACAAAG  
 GACAAATCTGCCTCATATAGGCAGAAAGATGACTTATGCCTATATAAGATATAAGATGACTTTATGCC  
 ACTTATTAGCAAAAGTAATTCTATTATACACCCCTTACATGGTATT  
 GTCTGGTGTGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 ATGTATTAAAGGAAATTCCCCAGTCCTAAAGGTGAAGAATGGACCC  
 AGATAGAAGGTACGGCAAGGTCAAGGCAAGAGTATGGAGT  
 CGGAGTGAGTCCTGCCATGGCTGGACAGAAGCATCCAGAGAGGGT  
 CCAGACAAATGCCCTGCCCTCTAAGGAAC  
 ACTGGCAGCCCTGATGAGGTACCAAGAGATTGCTAAGTGGAGGA  
 ATACAGGATCAGACCCATGGAGGGCTTAAAGCGTGA

CTGTAGCAGCCCTCCGCTGAGGGGCTCCPAGGTGGGGGCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCCACATGAGAGGTGATGTCTTG  
 GAGTCACCTCGGGTACCATTTGTTAGGGPAGGTGGGGATTGTGGTGTGGAGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTCAACA  
 ATGGTTGATGAGTTGGAACTAACAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGCTTGCAGCTTCCACATCTGCC  
 CCCCACCCCTGTCTGGCACCAAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC  
 ACCTCTTCTGGACCACATCAGGTGAGAGTGTGGCAGGCCCTAGGCTCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAAGGATGCTC  
 AGCTATCTCTGAGCTGGAACTATTTAGGAATAAGGATTATGCCCGCCGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC  
 TTSGTAAAGCAAGTGTGTTGATTATCTAAACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGACAAGTATGATGCATCTGT  
 TTCATGATCTGAAAAAGCGACACACACCATTTCACATCATGGCATCTTOCTAACCCCCATTCTTTTGTGTTT  
 TTGAGACAGGGTTCTCTGTGTAAGTCTGGCTGTGGAACTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACCTCAGAAATC  
 CTGGGATTPLPAGGTGTGTCACCACGCCCGCCCTAACCCCCATTCTTATGGTGAATCCAGTGGTTGAAATTTCGGGCC  
 ACACACATGTCCATTAGGGATTAGCTGCTGTCTTGAGCTACCTGGTACAPCTTTATCCCCTGGGCTGGCTCCTG  
 ATCCCTGACTCGGGCCCGATCAAGTCCAGTTCTGGCCGATCAAGTCCAGTTCTGGCCCGAACCTCCAGTCCT  
 AGCTCGATTAGCTCATCCTGGCTCCCTGGCTGTTCTTACACTCTTCCCCTGCTCTGGACTTGTGCTTCTTAA  
 CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAACCCACCTCTGTAAGACAACTAAGATAATACTTCCCCTCAAGCAGGAAAGTCCTG  
 AGTCACCACACCCCTCTGGAGGTGTGGPACACATGTTCATGGGTGTGGTTGCGCTTACGTACGTGTGC

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

5

tagaggagaa gtctttgggg agggtttgc ctgagcacac ccctttccct ccctccgggg 60  
 ctgagggaaa catggacca gcccgtcccc agcctgtcct cattggctgg catgaagcag 120  
 agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180  
 ggtggcgtgc ctcctctgg ctggtaccat gcagctccca ctggccctgt gtctcgctg 240  
 cctgctggta cacacagcct tccgttagt ggagggccag ggggtggcagg cgttcaagaa 300  
 tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360  
 gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc acccccttga 420  
 gaccaaaggat atggggtgga ggagagaatt cttagaaaa gatcctgggg aggtttaga 480

- 134 -

aacttctctt tgggaggcgtt ggaagactgg ggttagaccca gtgaagattt ctggccctgt 540  
ccagcaactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600  
5 gccttcaaata tcaggtgcag aggcatgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg 660  
gaggacgctg gggtggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720  
aaaagaaaaag gtttcaaaga atctccctt gggaaatata gggccacgtc cagctgctgg 780  
---  
taccactggg aagggAACAA ggttaagggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840  
caccggacac tctatgctgg tggtggtgtt cccaccaca cagacccaca tcatggaatc 900  
15 cccaggaggt gaacccccag ctcgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt 960  
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgcattca actgcaagat agccctgg 1020  
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080  
20 cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatggag 1140  
ttttcgac acgttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggagggag 1200  
25 agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccaccc cagtcacac 1260  
cttgcctcat tccagggag ggagaaggaa gggaaacctt gggttcctgg tcaggcctgc 1320  
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcattt ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380  
30 atqqqqqcgt ctgaaaatgac acttcagact aagagttcc clylccctgtt gccattatcc 1440  
aggtggcaga gaagtccact gcccaggctc ctggacccca gcccctccccg cctcacaacc 1500  
35 tgttggact atgggggtgtt aaaaaggggca actgcatggg aggccagccca ggaccctccg 1560

tcttcggaaaat ggaggacaag ggccgcctccc cccacagctc cccttcttagg caaggtcagc 1620  
tgggctccag cgactgcctg aagggtctgt aagggctgt aagggccaa acacaaaatg tccacccttgc 1680  
tggactcccc cgagaggcca cagccccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga 1740  
tctgcagagg aagtgcctgg cctagggcg ctattctcg aaagccqcaa aatgccccct 1800  
tccctggcga aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc 1860  
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccctgc 1920  
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtccccctc tctgggttgg 1980  
tcttaagact attttcatt ctttcttgct acatttggAAC tatccccatg aaacctttgg 2040  
gggtggactg gtactcacac gacgaccagc tattttaaaaa gctccccaccc atctaagtcc 2100  
accataggag acatggtcaa ggtgtgtca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160  
tctgcctgcc cagggagttt caccatgagg cgcccatca gataacacag aacaagaaat 2220  
tgccccagca gagagccagg tcaatgtttt tggcagctga acctgttaggt ttgggtcag 2280  
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagttaaaaa agcagccctc agctccatcc 2340  
cccagccccag cctccccatgg atgctcgaac gcagagcctc cactcttgcc ggagccaaaa 2400  
ggtgctggga ccccaaggaa gtggagtcgg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460  
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggac acactgcctt 2520  
tgattccctt caagtctaat gaattcctgt cctgatcacc tccccttcag tccctcgcc 2580  
ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactcctttc tccatcccc 2640

- 136 -

gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700  
tgtgctgagt acttaccctg cccaggccag ggacctgcg gcacaagtgt ggcttaatc 2760  
ataagaagac cccagaagag aaatgataat aataatacat aacagccgac gcttcagct 2820  
atatgtgcc aatggtattt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttg 2880  
ggcggccat tttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacttqccc aaqatqacac 2940  
ctgcagttag cgtggagcc ctgggtttt aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000  
cagggtgcgc aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tggacccctc ctgcaataga 3060  
tgttcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120  
gacgggcccgg tccagggcag ggggtggccag gcggggcggcc accctcacgc ggcctctct 3180  
ccacagacgt gtccgagttac agctgcccgc agctgcactt cacccgctac gtgaccgatg 3240  
ggccgtgcgc cagcgccaag ccggtcaccg agctgggtg ctccggccag tgcggcccg 3300  
cgccgcctgct gcccaacgcc atcggccgcg gcaagtggtg ggcacctagt gggcccgact 3360  
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccgggtggtg 3420  
aggcgccgcg cgcgcccaag gtgcgcctgg tggcctcgta caagtgcag cgcctcaccc 3480  
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggcgcgtcgcc cgccagaagg 3540  
ggcggaaaggcc gcgccccccycc yccccggaycc ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600  
cctactagag cccgcccgcg cccctccccca ccggcgccgcg ccccgccct gaaccgcgc 3660  
cccacatttc tgtcctctgc gcgtggttt attgtttata tttcattgtaaatgcctgca 3720

- 137 -

acccagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccgggcgc cgccaaggcc 3780  
ccccctcagcc cgccagctga ggggtcccac ggggcagggg aggaaattga gagtcacaga 3840  
cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcc tacctt tgctggtccc acttcagagg 3900  
aggcagaaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggttttaa gggagcggtg tgggagtg 3960  
aaagtccagg gactggtaa gaaagtggta taagattccc ccttgcaccc cgctgccat 4020  
cagaaaggct gaggcgtgcc cagagcacaa gactggggc aactgttagat gtggtttcta 4080  
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgtt accttgaact acacaattct ctttcgggac 4140  
; ctcaatttcc actttgtaaa atgagggtgg aggtggaaat aggtctcga ggagactatt 4200  
ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260  
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattt attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320  
)  
gagttgtgat gctctttctt gacagccaaa gataaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380  
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440  
5 ttcccagcct ggctccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500  
catcatccat tgggttagaa aaggagagg tccgagggtg gtgggaggga tagaaatcac 4560  
atccgccccca acttcccaaa gaggcagcattt cctccccca cccatagcca tgttttaag 4620  
0 tcaccttccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca 4680  
gccatcacaa actcacagac cagcacatcc ctttgagac accgccttctt gccaccact 4740  
5 cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

ttacactaaa agaatattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860  
tgcaagcat aatacgcc accaaaaat cttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920  
5 tactttctgt gtagttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980  
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040  
aagaatgaaa gtagtggttt taaagagtt aagttacata ttatatttct cacttaagtt 5100  
atttatgcaa aagttttct ttagagaat gacaatgtta atattgtttt atgaattaac 5160  
agtctgttct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220  
; gatgtggtct catttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280  
tcttggtcac tagagctcca accttggaca caccttgac tgctctctgg tggcccttgt 5340  
ggcaattatg tctcccttg aaaagtcatg tttatccctt ccttccaaa cccagaccgc 5400  
atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagcctgttac tcccttttagc agcctcccc 5460  
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcaactc ccctgctcaa aagccttcca 5520  
tagctcccccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580  
gcttgactcc cacctccccac tccaccaagc ttcctactga ctccaaatgg tcatgcagat 5640  
ccctgcttcc ttatgttgc atccacactt agcaccggca ataactaatc ctctttcttt 5700  
aggattcaca ttacttgtca tctcttcccc taacccttcca gagatgttcc aatctcccat 5760  
gatccctctc tcctctgagg ttcagcccc ttttgttctac accactactt tggttccaa 5820  
ttctgttttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

- 139 -

ctggcataga caacacaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940  
tcttcgaagt gtggatttga tgccctcctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000  
agcctcctgc acttctctca aagtctcgcc tccccaaaggt gtcttaatag tgctggatgc 6060  
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120  
ggtgggatgg tcaactggaa agctttaat taagtccagc ctaccttggg ggaacccacc 6180  
cccacaaaaga aagctgaggt ccctcctgat gacttgtag tttactacc aataaccac 6240  
ttgaattaat catcatcatc aagtctttga taggtgtgag tgggtatcag tggccggtcc 6300  
cttcctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagtgagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360  
catgagtgtc tcagggcccc gaatatgaga gcaggttagga aacagagaca tcttccatcc 6420  
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgtt 6480  
tgtttgtttg tttgagaca gagtctcgct ctattgcccc ggctggagtg cagtgtcaca 6540  
atctcggctt actgcaactt ctgccttccc ggattcaagt gattctcctg cctcagcctc 6600  
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaatttttg tattttgtat 6660  
agagacgggg tttcaccatg ttggccaggg tagtctcgaa ctcttgacct caagtgatct 6720  
gcctgcctcg gcctccaaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccac cccagcccc 6780  
ggttggtgtt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaatgttt tgcccacagc 6840  
catacttggg ctcagttcct tgccctaccc ctcacttgag ctgcttagaa cctggtgccc 6900  
acatggcaa taaccaggc acactgttt gtaccaagtg ttatggaat ccaagatagg 6960

- 140 -

agtaatttgc tctgtggagg gnatgaggga tagtggttag ggaaagcttc acaaagtggg 7020

tgttgcttag agatttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagccaaag 7080

5 caaagactgc aagtgcattgg ctgctcatgg gtataagaga atccaccatt cctcaacatg 7140

taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaatttcca agcaatgtcc 7200

aaaccttaggg tctgctttct gggacctgaa gatacaggat gnatcagccc aggctgcaat 7260

cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggtt ttagaggtta 7320

tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaaag 7380

gaacaaacaa cagaccttagc tgggaggggc agcattttgt ttagggggc gggcacatg 7440

ttctgggggt acagccagac tcagggttg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500

gggatagaag gaaataggc cctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560

tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgtt ggggtctact tatgtccaa 7620

gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttgg aggagccaca 7680

ggacccaaaa attccctgtt tcccttgaat caggcaggac ttacgcagct gggaggggtgg 7740

agagcctgca gaagccacct gcgagtaagc caagttcaga gtcacagaca cccaaagctg 7800

gtgccatgtc ccacacccgc ccacccccc cctgctccctt gacacagccc tgtgctccac 7860

aacccggctt ccagatcatt gallalayui cccccccctt cccgtccctt cctgccacat 7920

ccccacccca ttcttggAAC ctgcctctg tcttctccct tgccttgggg caggcaagg 7980

ctcagctatt gggcagcttt gaccaacagc tgaggctctt ttgtggctg gagatgcagg 8040

- 141 -

aggcagggga atattctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc cagggtggtc 8100  
tcgtttacac ctgttaggcca agcgtaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160  
gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220  
gcgtggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280  
gaggtcacga gtttagagact ggctggcca gcatggcaa accccatctt tactaaaaat 8340  
acaaaaatata gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400  
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat tgtgccactg 8460  
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520  
actgcagggaa gaacccaggt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagtgg 8580  
cagcacccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat gggtaactgaa gggtgccctg 8640  
aatgacgttc tgcttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcattgcct gttcatgggt 8700  
gagagactaa attcatcatt cttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgcctcca 8760  
atgccccatt tccctacaat tgtctgggt gcctaagctt ctgcccacca agagggccag 8820  
agctggcagc gagcagctgc aggttaggaga gataggtacc cataaggagag gtggaaaga 8880  
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgaggc 8940  
tggtcatgcc agcagattt aaggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000  
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga gggtgatcat tcattcatc cattgctact 9060  
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctc gggcatgtgg ttgtaatctt 9120

- 142 -

ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180

ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagtctcg aaagaaaaat aaagctggtg 9240

agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccagggattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300

c

9301

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Brunkow, Mary E.  
           Galas, David J.  
 5       Kovacevich, Brian  
       Mulligan, John T.  
       Paepel, Bryan W.  
       Van Ness, Jeffrey  
       Winkler, David G.

10      <120> COMPOSICIONES Y METODOS PARA INCREMENTAR LA  
           MINERALIZACION OSEA

<130> 240083.508

15      <140> US  
       <141> 1999-11-24

<160> 41

20      <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1  
       <211> 2301

25      <212> ADN  
       <213> Homo sapien

<400> 1

agagcctgtg	ctactggaag	gtggcgtgcc	ctccctctggc	tggtaccatg	cagctcccac	60
tggccctgtg	tctcgctctgc	ctgctggta	acacagcctt	ccgtgttagtg	gagggccagg	120
ggtgtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccc	cgagctcgga	gagtaccccg	180
agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	ccccttttag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcaccccgcta	cgtgaccgat	gggccgtgcc	gcagcgccaa	gccggtcacc	gagctggtgt	360

30

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

- 145 -

<400> 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

- 146 -

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 3

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc	ctccctctggc tggtaccatg cagctcccac	60
tggccctgtg ttcgcgtgc ctgctggta	acacagcctt ccgtgttagtg gagggctagg	120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg	aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga	ccatgaaccc ggcggagaac ggagggcggc	240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg	tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact	300
tcacccgcta cgtgaccgat	ggccgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt	360
gctccggcca gtgcggcccg	gcccacgc catcgccgc ggcaagtgg	420
ggcaccctag tggggcccgac	ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgc cagcgcgtgc	480
agctgctgtg tcccggtgtt	gaggcgccgc gcgcgcgcaaa ggtgcgcctg gtggcctcgt	540
gcaagtgc当地	gcccgc当地 accagtccaca accagtccga gctcaaggac ttccggaccg	600
aggccgc当地	gcccggaaagc cgccggcccg cgccggagc gccaaagcca	660
accaggccga gctggagaac	gcctactaga gccccccgc gcccctcccc accggcgggc	720
gccccggccc tgaaccgc当地	ccccacattt ctgtccctctg cgcgtggttt gattgtttat	780
atcccattgt aaatgcctgc	aaccaggggc agggggctga gacccccc当地 gccc当地 gagga	840
atcccggccg cccgc当地	ccccctcagc cccgc当地 aggggtccca cggggcagg	900
gagggaattt	agagtcacag acactgagcc acgcagcccc gcctctgggg cccgc当地 acct	960
ttgctggtcc	cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcaccgc当地 tggggtttata	1020
agggagcgg	gtgggagttgg gaaagtccag ggactggta agaaagtgg ataagattcc	1080
cccttgcacc	tcgctgccc当地 tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactgggg	1140
caactgtaga	tgtggttct agtccctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac	1200
tacacaattt	tccttcggga cctcaattt当地 cactttgtaa aatgagggtg gaggtggaa	1260
taggatctcg	aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgc当地 tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagtgc当地 gattcagtgc	1380
caaggtca	tccagaattt当地 agagttgtga tgctctttcc当地 tgacagccaa agatgaaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaaaatca aagagtctat ttatggctga catat当地 acg gctgacaaac	1500
tccttggaaa	agctatgtg cttccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagg	1620
gggggggg	atagaaaatca catccgcccc aacttccaa ayaayayatcc cccccc当地	1680
acccatagcc	atgtttaaa gtcaccttcc gaagagaatg gaaaggttca aggacactgg	1740
ccttgcaggc	ccgaggaggc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttggaga	1800
caccgc当地	tgcccaccac tcacggacac atttctgc当地 agaaaacagc ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaatg	1920
gctgtacata	tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tcttttgaa	1980

aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgttagtttt	aattgttaaa	aaaaaaaaagt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcgtttt	ttggcaattc	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
atttattttc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagttttc	ttgttagagaa	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															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	tggtaccatg	cagctcccac	60
tggccctgtg	tctcatctgc	ctgctggta	acacagcctt	ccgtgttagtg	gagggccagg	120
ggtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccg	cgagctcgga	gagtacccc	180
agcctccacc	ggagctggag	aacaacaaga	ccatgaaccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccacca	cccctttgag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctgccgc	gagctgcact	300
tcacccgcta	cgtgaccgat	ggggcgtgcc	gcagcgccaa	gccggtcacc	gagctggtgt	360
gctccggcca	gtgcggcccg	gcbcgcctgc	tgcacaacgc	catcgccgc	ggcaagtgg	420
ggcgcacccat	tgggcccgcac	ttccgcgtca	tccccgaccg	ctaccgcgcg	cagcgcgtgc	480
agctgctgtg	tcccgggttgt	gaggcgccgc	gcgcgcgcaa	ggtgcgcctg	gtggcctcgt	540
gcaagtgc当地	gcgcctcacc	cgcttccaca	accagtcgga	getcaaggac	ttcgggaccg	600
aggccgctcg	gccgcagaag	ggccggaagc	cgcggccccg	cgcccgagc	gccaaagcc	660
accagggcga	gctggagaac	gcctactaga	gcccgcggc	gccccctcccc	accggcgggc	720

- 148 -

gccccggccc	tgaaccccgcg	ccccacattt	ctgtcctctg	cgcgtggttt	gattgtttat	780
atttcattgt	aatgcctgc	aacccagggc	agggggctga	gaccttccag	gccctgagga	840
atcccgggcg	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgcccagctg	aggggtccca	cggggcaggg	900
gagggaaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gcctctgggg	ccgcctacct	960
ttgctggtcc	cacttcagag	gaggcagaaa	tggaagcatt	tccaccgccc	tggggtttta	1020
agggagcggg	gtggggagtgg	gaaagtccag	ggactggta	agaaagttgg	ataagattcc	1080
cccttgcacc	tcgctgccc	tcagaaagcc	tgaggcgtgc	ccagagcaca	agactggggg	1140
caactgtaga	tgtggttct	agtcttggct	ctgcccactaa	cttgcgtgt	aaccttgaac	1200
tacacaattt	tccttcggg	cctcaattt	cactttgtaa	aatgagggtg	gaggtgggaa	1260
—taggatetcg	aggagactat	tggcatatga	tcccaaggac	tccagtgcct	tttgaatggg	1320
cagaggtgag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggtcact	tccagaattt	agagttgtga	tgctcttctt	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaacagaaa	aaaaaaaaa	aagagtctat	ttatggctga	catatttacg	gctgacaaac	1500
tccttggaa	agctatgctg	cttcccagcc	tggcttcccc	ggatgtttgg	ctacctccac	1560
ccctccatct	caaagaaaata	acatcatcca	ttggggtaga	aaaggagagg	gtccgagggt	1620
ggtggggaggg	atagaatca	catccgcccc	aacttccaa	agagcagcat	ccctcccccc	1680
acccatagcc	atgtttaaa	gtcaccttcc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgcaggc	ccgagggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ccttttgaga	1800
caccgccttc	tgcccaccac	tcacggacac	atttctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gatggcatat	cttacactaa	aagaatatta	ttggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgctgagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tcttttgaa	1980
aatcatttcc	agacaacctc	ttactttctg	tgtagtttt	aattgttaaa	aaaaaaaaagt	2040
tttaaacaga	agcacatgac	atatgaaagc	ctgcaggact	ggtcgttttt	ttggcaattt	2100
ttccacgtgg	gacttgtcca	caagaatgaa	agtagtggtt	tttaaagagt	taagttacat	2160
atttattttc	tcacttaagt	tatttatgca	aaagtttttc	ttgttagagaa	tgacaatgtt	2220
aatattgctt	tatgaattaa	cagtctgttc	ttccagagtc	cagagacatt	gttataaaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 213

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 6

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

- 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

- 150 -

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtaccatg cagctccac 60  
 tggccctgtg tctcgctgc ctgctggta acacaggctt ccgtgttagtg gagggccagg 120  
 ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccg cgagctcgga gagtaccccg 180  
 agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggccgagaac ggagggccgc 240  
 ctccccacca ccccttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact 300  
 tcacccgcta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgc当地 gccc当地 gagctgggt 360  
 gctccggcca gtgc当地 ccg gccctgc tgcccaacgc catggccgc ggcaagtggt 420  
 ggc当地 ctggccgac ttccgctgca tccccc当地 ctaccgccgc cagcgc当地 480  
 agctgctgtg tcccggttgt gaggccgc当地 gc当地 ggc当地 gtggc当地 540  
 gcaagtgcaa gc当地 cacc cgttccaca accagtc当地 gctcaaggac ttccggaccg 600  
 aggccgctcg gc当地 cagaag ggccggaagc cgc当地 cc当地 cggc当地 gcca当地 660  
 accaggccga gctggagaac gc当地 actaga gccc当地 cccctccccc accggccggc 720  
 gccccggccc tgaaccggc ccccacattt ctgtccctgt cgc当地 ggtttt gattgrrttat 780  
 atttcattgt aaatgc当地 c aaccaggc当地 agggggctga gacccctccag gccc当地 gagga 840  
 atcccgccg cc当地 cagggc cccctc当地 cccgccagctg aggggctccca cggggc当地 900  
 gagggatgtg agagtc当地 agactgagcc acgc当地 cc当地 gc当地 ctgggg cccctcacct 960  
 ttgc当地 ggtcc cacttc当地 gagggc当地 gggc当地 tggaaagcatt ttccaccgccc tggggttta 1020  
 agggagc当地 gtgggagtg gaaagtc当地 ag gactggta agaaagttgg ataagattcc 1080  
 cccttgc当地 cccgctccca tc当地 agaaagcc tgaggc当地 cc当地 gagc当地 agactgggg 1140  
 caactgtaga tgtggtttct agtc当地 ggct cgc当地 actaa cttgctgtgt aacccctgaac 1200  
 tacacaatttcc ccccttccggc cctcaatttcc cactttgtaa aatgagggtg gaggtgggaa 1260  
 taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaaggac tccaggc当地 tttgaatggg 1320  
 cagaggtgag agagagagag agaaaagagag agaatgaatg cagttgc当地 gattc当地 1380  
 caaggctact tccaggatttcc agagttgtga tgctctttcc tgacagccaa agatgaaaaaa 1440  
 caaacagaaaa aaaaaaaaaa aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaaac 1500  
 tccttggaaa agctatgctg cttccc当地 aggtttccccc ggatgtttgg ctacccctccac 1560  
 ccctccatct caaaggaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt 1620  
 ggtgggaggg atagaaaatca catccgcccc aacttcccaa agagc当地 catccccc当地 1680  
 accccatagcc atgtttaaa gtc当地 cttcc local gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740  
 ccttgc当地 cccgaggc当地 agccatcaca aactcacaga ccagcacatc cctttgaga 1800  
 cacccgc当地 tggccaccac tc当地 acggacac atttctgc当地 agaaaacacg ttcttactgc 1860  
 tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaagt 1920  
 gctgtacata tgctgagaaa ctgc当地 gagca taatagctgc cacccaaaaa tctttt当地 1980  
 aatcatttcc agacaacccctc ttactttctg tgtagttttt aatgtttaaa aaaaaaaaaa 2040  
 tttaaacaaga agcacatgac atatgaaaagc ctgc当地 caggact ggtcg当地 ttggcaattt 2100  
 ttccacgtgg gacttgc当地 caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160  
 atttattttcc tcaacttaagt tatttatgca aaagttttcc ttgttagagaa tgacaatgtt 2220  
 aatattgctt tatgaattaa cagtc当地 gttc ttccagagtc cagagacatt gttataaaag 2280  
 acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

- 151 -

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

5

&lt;400&gt; 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 gtgtcttgc tgcctgctgg tacacgcagc cttccgtgta      60
gtggagggcc aggggtggca gcgcattcaag aatgatgcca cgaaaatcat ccccgagctc      120
ggagagtacc ccgagcctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa cggggcggag      180
aatggagggc ggccctccccca ccaccccttt gagaccaaag acgtgtccga gtacagctgc 240
cgagagctgc acttcacccg ctacgtgacc gatggggcgt gccgcagcgc caagccagtc      300
accgagttgg tgtgctccgg ccagtgcggc cggcacegcc tgctgcccaa cgccatcggc      360
cgccggcaagt ggtggcgccc gagtgggccc gacttccgct gcattccgaa cgcgtaccgc      420
gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccggt ggtgccgcgc cgccgcgcgc caaggtgcgc      480
ctgggtggccct cgtgcaagtgc caagcgcctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag 540
gacttcggtc ccgaggccgc tcggccgcag aagggccgga agccgcggcc cgcgcggccgg      600
ggggccaaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag      642

```

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

15 &lt;400&gt; 10

```

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  
 5      <212>      ADN  
 <213>      Mus musculus

<400>      11

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgtc      60  
 gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgtatgcca cagaggtcat cccagggctt      120  
 ggagagtacc ccgagccctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga      180  
 ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgccc aaagggtgtgt ccgagtacag ctgccgcgag      240  
 ctgcactaca cccgcttcct gacagacggc ccatgcccga gcgc当地agcc ggtcaccgag      300  
 ttgggtgtgtc cggccagtg cggccccggcg cggctgtgtc ccaacgcccatt cgggc当地gtc      360  
 aagtgggtggc gccc当地acgg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta cc当地gc当地cag      420  
 cgggtgc当地c tgctgtgccc cggggggc当地cg cggcc当地cgct cgc当地caagggt gctgtgtgtc      480  
 gcctcgtgca agtgcaaggcg cctcacccgc ttccacaacc agtc当地ggagct caaggacttc      540  
 gggccggaga cgc当地cggcc gcagaagggt cgc当地aggcc ggccc当地ggc当地 cc当地ggggagcc      600  
 aaagccaaacc aggccgagct ggagaacgc当地 tactagag      638

10

<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  
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

10 <210> 13  
<211> 674

- 155 -

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

```

gaggaccgag tgcccttcct cttctggca ccatgcagct ctcaactagcc cttgccttg      60
cctgcctgct tgtacatgca gccttcgttg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca    120
agaatgatgc cacagaaatc atcccggac tcagagagta cccagagcct cctcaggaac    180
tagagaacaa ccagaccatg aaccgggccc agaacggagg cagacccccc caccatcctt   240
atgacaccaa agacgtgtcc gagtacagct gccgcgagct gcactacacc cgcttcgtga   300
ccgacggccc gtgccgcagt gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg   360
gccccgcgcg gctgctgccc aacgcccattcg ggccgcgtgaa gtggggcgc ccgaacggac   420
ccgacttccg ctgcattcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg   480
gcggcgcggc gccgcgcctcg cgcaagggtgc gtctggtggc ctctgtcaag tgcaagcgcc  540
tcacccgctt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggccgc   600
agaaggggtcg caagccgcgg ccccgccccc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg  660
agaacgccta ctag                                         674

```

5

<210> 14

<211> 213

<212> PRT

10 <213> Rattus norvegicus

<400> 5

Met	Gln	Leu	Ser	Leu	Ala	Pro	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu	Leu	Val	His	Ala
1														15.	
Ala	Phe	Val	Ala	Val	Glu	Ser	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp
20														30	
Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Gly	Leu	Arg	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Gln
35	-													45	
Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr	Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg
50														60	
Pro	Pro	His	His	Pro	Tyr	Asp	Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser	Cys
65														80	
Arg	Glu	Leu	His	Tyr	Thr	Arg	Phe	Val	Thr	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ser
85														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
	Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln		160
		165	170
	Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly		175
		180	185
	Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu		190
195		200	205
	Leu Glu Asn Ala Tyr		
210			

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

agaatgatgc cacagaaaatc atccccgagc tggcgagta ccccgagcct ctgccagagc	60
tgaacaacaa gaccatgaac cggcgaggaga acggagggag acctccccac caccctttg	120
agaccaaaga cgcctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcacccgc tacgtgaccg	180
atggccgtg ccgcagcgcc aagccggtca ctcgactgggt gtgtcgccc cagtgcggcc	240
cggcgccct gctgccaaac gccatcgccc gcggcaagtg gtggcccca agcgggccc	300
acttccgctg catccccgac cgctaccgccc cgcaagggttgc agactgttg tgtccgtgc	360
gcgcggcgcc gcgcgcgc aagggtgcgc tggtgccctc gtgcaagtgc aagcgcctca	420
ctcgcttcca caaccagtcc gagctcaagg acttcggccc cgaggccgcg cggccgcaaa	480
cgggcccqqa qctqcqqccc cggggggggg gcaccaazgc cagccggccc ga	532

10	<210> 16
	<211> 176
	<212> PRT
15	<213> Bos torus

- 157 -

	<400>	16	
	Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro		
	1	5	10
	Leu Pro Glu Leu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly		15
	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
	Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro		80
	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
	Gly Arg Lys Leu Arg Pro Arg Ala Arg Gly Thr Lys Ala Ser Arg Ala		160
	165	170	175
	<210>	17	
5	<211>	35828	
	<212>	ADN	
	<213>	Mus musculus	
	<220>		
10	<221>	rasgos_misc	
	<222>	(1) ... (35828)	
	<223>	n=A,T,C O G	
	<400>	17	

cgcgtttgg tgagcagcaa tattgcgctt cgatgaggct tggcggttag attgataacct 60  
 ctgctgcaca aaaggcaatc gaccgagctg gaccagcgca ttcgtgacac cgtctcccttc 120  
 gaacttatttc gcaatggagt gtcattcatc aaggacngcc tgcatacgaaa tggtgctatc 180  
 cacgcagcgg caatcgaaaa ccctcagccg gtgaccaata tctacaacat cagccttggt 240  
 atccctgcgtg atgagccagc gcagaacaag gtaaccgtca gtgccgataa gttcaaagtt 300  
 aaacctggtg ttgataccaa cattgaaacg ttgatcgaaa acgcgctgaa aaacgctgct 360  
 gaatgtgcgg cgctggatgt cacaagcaa atggcagcag acaagaaagc gatggatgaa 420  
 ctggcttcct atgtccgcac ggccatcatg atggaatgtt tccccgggtgg tgttatctgg 480  
 cagcagtgcgc gtcgatagta tgcaattgtat aattattatc atttgcgggt ccttccggc 540  
 gateegeett gttacggggc ggcgacctcg cgggttttcg ctatattatga aaattttccg 600  
 gtttaaggcg tttccgttct tcttcgtcat aacttaatgt ttttatttaa aataccctct 660  
 gaaaagaaaag gaaacgacag gtgctgaaag cgagctttt ggccctgtc gtttcccttc 720  
 tctgttttttgc tccgtggaat gaacaatgga agtcaacaaa aagcagagct tatcgatgt 780  
 aagcggtcaa acatgagaat tcgcggccgc ataatacgac tcactatagg gatcgacgcc 840  
 tactccccgc gcatgaagcg gaggagctgg actccgcattg cccagagacg ccccccaccc 900  
 cccaaagtgc ctgacacctcg cctctaccag ctctggcttg ggcttggcg gggtaaggc 960  
 taccacgttc tcttaacagg tggctggct gtctcttggc cgccgtcat gtgacagctg 1020  
 cctagttctg cagtgaggatc accgtggaat gtctgccttc gttgccatgg caacgggatg 1080  
 acgttacaat ctgggtgtgg agcttttccct gtccgtgtca gggaaatccaa ataccctaaa 1140  
 ataccctaga agaggaagta gctgagccaa ggcttccctg gcttctccag ataaagttt 1200  
 acttagatgg aaaaaaacaa aatgataaaag acccgagcca tctgaaaatt cctcctaatt 1260  
 gcaccactag gaaatgtgtt tattattttagt gtcgtatgtg ttcttatttt aaaaagaaaa 1320  
 cttagtcat gttattataa agaatttctc agcagtggga gagaaccaat attaacacca 1380  
 agataaaaagt tggcatgatc cacattgcag gaagatccac gttgggtttt catgaatgt 1440  
 aagaccccat ttattaaagt cctaagctct gttttgcac actaggaagc gatggccggg 1500  
 atggctgagg ggctgttaagg atctttcaat gtcttacatg tgtgtttccct gtcctgcacc 1560  
 taggacctgc tgcctagcct gcagcagagc cagagggtt tcacatgatt agtctcagac 1620  
 acttgggggc aggttgcattg tactgcattg ctatattcca tacggagcac ctactatgt 1680  
 tcaaacacca tatgggttgc actcttcaga acgggtgtgg tcatcatggt gcatttgcgt 1740  
 acgggtggat tgggtggtaga gagctgagat atatggacgc actcttcagc attctgtcaa 1800  
 cgtggctqtc cattctqct cctgagcaag tggtaaaca gactcacagg gtcagccccc 1860  
 agctcagtcg ctgcatagtc ttagggaaacc tctcccaactg ctccttacatc caactatcca 1920  
 agaagccagg gggcttggcg gtctcaggag cctgcttgcgt gggggacagg ttgttgagtt 1980  
 ttatctgcag taggttgcct aggcatagtg tcaggactga tggctgcctt ggagaacaca 2040  
 tccttgcctt tctatgcataa tctgaccttg acatgggggc gtcgtcagc tgggaggatc 2100  
 aactgcatac ctaaagccaa gcctaaagct tcttcgttca cctgaaactc ctggaccaag 2160

gggcttcgg cacatcctct caggccagtg agggagctg tgtgagctgc actttccat	2220
ctcagggcgt gagaggcaga gggaggtggg ggcagacgc tgcagctctt tcctcccatc	2280
tggacagcgc tctggcttag cagccatat gагcacaggc acatccccac cccacccca	2340
ccttcctgt cctgcagaat ttaggctctg ttacacgggg gggggggggg ggggcagtcc	2400
tatcctctct tagtagaca ggactctgca ggagacactg ctggtaaga tactgcagtt	2460
taaaatttggaa tggtgtgagg ggaaagcgaa gggcctctt gaccattcag tcaaggtacc	2520
ttctaactcc catcgtattt gggggctact ctagtgctag acattgcaga gagcctcaga	2580
actgttagttt ccagtgtggt aggattgatc ctgcaggag cctgacatgt gacagttcca	2640
ttcttcaccc agtcaccgaa catttattca gtacctaccc cgtaacaggg accgttagcag	2700
gtactgaggg acggaccact caaagaactg acagaccgaa gccttggaa ataaacacca	2760
aagcatcagg ctctgccaac agaacactt ttaacactca ggcctttaa cactcaggac	2820
ccccacccccc accccaagca gttggactg ctatccacat tttacagaga gaaaaaacta	2880
ggcacaggac gatataagtg gcttgcttaa gcttgctgc atggtaaatg gcagggctgg	2940
attgagaccc agacatttca actcttaggtt ctattttctt ttttctcggt tggtcgaatc	3000
tgggtcttac tgggtaaaact caggctagcc tcacactcat atccctctcc catggcttac	3060
gagtgtctagg attccaggtg tggcttacca tggctactc cctgttagctt gtctataacca	3120
tcctcacaac ataggaattt tgatagcagc acacacacccg gaaggagctg gggaaatccc	3180
acagagggtt ccgcaggatg acaggcgaat gcctacacag aaggtgggg aaggaagcag	3240
agggAACAGC atgggcgtgg gaccacaagt ctatgggg aagctgccgg taaccgtata	3300
tggctgggtt gaggggagag gtcatgagat gaggcagggaa gagccacagc aggacgggg	3360
tacgggctcc ttattgccaa gaggctcggg tttccctt cttccctt ccgggctgc	3420
ctgttcattt tccaccactg cctccatcc aggtctgtgg ctcaggacat cacccagctg	3480
cagaaaactgg gcatcacccca cgtcctgaat gctgccgagg gcaggtccctt catgcacgtc	3540
aacaccagtg ctgttctta cgaggattct ggcacacactt acttggcat caaggccaaat	3600
gatacgcagg agttcaacct cagtgttac tttgaaaggcc acacagattt cattgaccag	3660
gcgcgtggccc ataaaaatgg taaggaacgt acattccggc acccatggag cgtaagccct	3720
ctgggacctg cttcccttca agaggcccccc acttgaaaaa ggttccagaa agatcccaa	3780
atatgccacc aacttagggat taagtgttccat acatgtgagc cgatggggc cactgcata	3840
agtctgtgcc atagacatga caatggataa taatattca gacagagagc aggagttagg	3900
tagctgtgtt cttccctttaattgagtg tgcccatttt tttattcatg tatgtgtata	3960
catgtgtgtt cacacatgcc ataggttgcactt actgaacacc gtctcaatc gttccccacc	4020
ccacccattt ttttggggca gggctcttc cctgatcctg gggctcattt gtttatctag	4080
gctgctggcc agtgagctct ggagttctgc ttttctctac ctcccttagcc ctggactgc	4140
agggggcatgt gctggccag gctttatgt cgcgttgggg atctgaactt aggtccctag	4200
gcctgagcac cgtaaagact ctgccacatc cccagcctgt ttgagcaagt gaaccattcc	4260
ccagaattcc cccagtgggg cttccctacc cttttatgg ctggcattc atgagtggtc	4320

acctcgccag	aggaatgagt	ggccacgact	ggctcagggt	cagcagccta	gagatactgg	4380
gttaagtctt	cctgccgctc	gctccctgca	gccgcagaca	gaaagttagga	ctgaatgaga	4440
gctggctagt	ggtcagacag	gacagaaggc	tgagagggtc	acagggcaga	tgtcagcaga	4500
gcagacaggt	tctccctctg	tgggggaggg	gtggccact	gcaggtgtaa	ttggccttct	4560
tttgctcca	tagaggcttc	ctgggtacac	agcagcttc	ctgtcctgg	gattccaaa	4620
gagaactccc	taccactgga	cttacagaag	ttcttattgac	tggtgtaacg	gttcaacacgc	4680
tttggcttctt	ggtggacggt	gcatactgct	gtatcagctc	aagagctcat	tcacgaatga	4740
acacacacac	acacacacac	acacacacac	acacaagcta	attttgatata	gccttaacta	4800
gctcagtgac	tgggcatttc	tgaacatccc	tgaagtttagc	acacatttcc	ctctgggttt	4860
cttgggtttaa	caacccatata	atcttatattt	tatctttgtc	gcctcggtac	cttcttgagaa	4920
cccccttaggg	ccacttccct	tcgcacctac	attgtctggat	ggtttctctc	ctgcagctct	4980
taaatctgtat	ccctctgcct	ctgagccatg	ggaacagccc	aataactgag	ttagacataa	5040
aaacgtctct	agccaaaact	tcaagctaaat	ttagacaata	aatcttactg	gttgtggaaat	5100
ccttaagatt	cttcatgacc	tccttcacat	ggcacgagta	tgaagcttta	ttacaattgt	5160
ttattgtatca	aactaactca	aaaaagccca	gttgtcttcc	acctgctcaa	ggaagggaaaca	5220
aaattcatcc	ttaactgatc	tgtgcacctt	gcacaatcca	tacgaatatac	ttaagagttac	5280
taagatttttgc	gttgtgagag	tcacatgtt	cagaatgtac	agctttgaca	aggtgcattcc	5340
ttgggatgcc	gaagtgaccc	gctgttccag	ccccctaccc	tctgaggctg	ttttggaaagc	5400
aatgctctgg	aagcaacttt	aggaggtagg	atgctggAAC	agcgggtcac	ttcagcatcc	5460
cgatgacgaa	tcccgtcaaa	gctgtacatt	ctgtAACAGA	ctgggaaagc	tgcagacttt	5520
aaggccaggg	ccctatggtc	cctcttaato	cctgtcacac	ccaaACCCGAG	cccttctcct	5580
ccagccgttc	tgtgctctc	actctggata	gatggagaac	acggccttgc	tagttaaagg	5640
agtgggttct	caccctctc	acatggcagt	ggttggcat	cctcatttcag	ggaactctgg	5700
ggcattctgc	ctttacttcc	tctttttgg	ctacaggaa	tatatgtcga	tttgttttga	5760
ccttgggtat	ggggagactg	gatctttgg	ctggaaatgtt	tcctgctagt	ttttccccat	5820
ccttggcaaa	accctatcta	tatcttacca	ctaggcatag	tggccctcg	tctggagcc	5880
gccttcaggc	tggttctcgg	ggaccatgtc	cctggtttct	ccccagcata	tgggtttcac	5940
agtgttcaact	gcgggtgggt	gctgaacaaa	gcggggattg	catcccagag	ctccggtgcc	6000
ttgtgggtac	actgctaaga	aaaaatggat	actggctct	ctctgaccac	ttgcagagct	6060
ctgggtcctt	gtgggtacac	tgctaaagata	aaatggatac	tggctctct	ctatccactt	6120
gcaggactct	aggqaacaqq	aatccattac	tggaaaaacc	agggggctagg	agcagggagg	6180
tagctggca	gctgaagtgc	ttggcgacta	accaatgaat	accagagttt	ggatctctag	6240
aataactctta	aatctgggt	gggcagagtg	gcctgcctgt	aatcccagaa	ctcgggaggc	6300
ggagacaggg	aatcatcaga	gcaaactggc	taaccagaat	agcaaaacac	tgagctctgg	6360
gctctgtgag	agatcctgcc	ttaacatata	agagagagaa	aaaaacattt	aagaagacag	6420
tagatgccaa	tttaagccc	ccacatgcac	atggacaagt	gtgcgttga	acacacat	6480

gcactcatgt	gaaccaggca	tgcacactcg	ggcttatcac	acacataatt	tcaaagagag	6540
agtgagagag	gagagtgcac	attagagttc	acaggaaagt	gtgagtgagc	acacccatgc	6600
acacagacat	gtgtgccagg	gagtaggaaa	ggagcctggg	tttgttata	agagggagcc	6660
atcatgtgtt	tctaaggagg	gcgtgtgaag	gaggcgttgc	gtgggctggg	actggagcat	6720
ggttgtaact	gagcatgctc	cctgtggaa	acaggagggt	ggccaccctg	cagagggtcc	6780
cactgtccag	cgggatcagt	aaaagccccct	gctgagaact	ttaggtata	gccagagaga	6840
gaaaggtagg	aaagtggggg	gactcccattc	tctgatgtag	gaggatctgg	gcaagtagag	6900
gtgcgtttga	ggtagaaaaga	gggggtgcaga	ggagatgctc	ttaattctgg	gtcagcagtt	6960
tcttc当地	taatgcctgt	gaggaggtgt	aggtggtggc	cattcactca	ctcagcagag	7020
ggatgatgat	gcccgggtgg	tgctggaaat	ggccgagcat	caaccctggc	tctggaagaa	7080
ctccatctt	cagaaggaga	gtggatctgt	gtatggccag	cggggtcaca	ggtgcttggg	7140
gccccctgggg	gactccatgc	actgggtgat	gtttatcgag	tgctcttgc	tgccaggcac	7200
tggcctgggg	ctttgtttct	gtctctgttt	tgtttcgttt	ttttagacag	actcttgcta	7260
tgtatccgtg	tcaatcttgg	aatctcaactg	catagcccg	gctgcccaga	gaggggaggg	7320
caataggcct	tgtaagcaag	ccacacttca	gagactagac	tccaccctgc	gaatgatgac	7380
aggtcagagc	tgagttccgg	aagatttttt	ttccagctgc	caggtggagt	gtggagtggc	7440
agctagcggc	aagggttagag	ggcgagctcc	ctgtgcagga	gaaatgcaag	caagagatgg	7500
caagccagtg	agtttaagcat	tctgtgtggg	gagcaggtgg	atgaagagag	aggctggct	7560
ttcgcctctg	gggggggggt	gaggggtggg	atgaggtga	gaggagggca	gctccctgca	7620
gtgtgtatgag	atttttcctg	acagtgacct	ttggcctctc	cctcccccac	ttcccttctt	7680
tcctttcttc	ccaccattgc	tttccttgc	cttgagaaat	tctgagttc	cacttcactg	7740
gtgatgcaga	cggaaacaga	agccgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	7800
gtgtgtgtgt	ttgtgtgtat	gtgtgtgtgt	gtgtttgtgt	gtatgtgtgt	cagtggaaat	7860
ggctcatagt	ctgcaggaag	gtggggcagga	aggaataagc	tgtaggctga	ggcagtggtgg	7920
gatgcagggg	gagaggagag	gagggatacc	agagaaggaa	attaaggag	ctacaagagg	7980
gcattgttgg	ggtgtgtgtg	tgtgtgtgtt	gtttatattt	gtattggaaa	tacattctt	8040
taaaaaaatac	ttatccattt	atttattttt	atgtcacgt	gtgtgtgcct	gcatgagttc	8100
atgtgtgcca	cgtgtgtgcg	ggaacccttg	gaggccacaa	ggggccatct	gatccctgg	8160
aactggagtt	ggaggagggtt	gtgagtcctt	tgacatgttt	gctggaaact	gaaccccggt	8220
cctatgcaag	agcaggaaagt	gcagttatct	gctgagccat	ctctccagtc	ctgaaatcca	8280
ttctctttaaa	atacacgtgg	cagagacatg	atgggattta	cgtatggatt	taatgtggcg	8340
gtcattaaagt	tccggcacag	gcaagcacct	gtaaagccat	caccacaacc	gcaacagtga	- 8400
atgtgaccat	caccccccatt	ttcttcattgt	ccccgttccc	ctccatccctc	cattctcaag	8460
caccccttgc	tctgcctctg	tcgctggaga	acagtgtgca	tctgcacact	cttatgtcag	8520
tgaagtca	cagcctgcac	cccttcctgg	tctgagttatt	tggttctga	ctctgctatc	8580
acacactact	gtactgcatt	ctctcgctct	cttttttaa	acatattttt	atttgtttgt	8640

gtgtatgcac atgtgccaca tgtgtacaga tactatggag gccagaagag gccatggcg	8700
tccctggagc tggagttaca ggcagcgtgt gagctgcctg gtgtgggtgc tggaaaccaa	8760
acttgaatct aaagcaagca cttaactg ctgaggcagc tctcagtacc ctttttcatt	8820
tctccgcctg ggttccattt tatggacaca tgtagctaga atatcttgc tatctaatta	8880
tgtacattgt ttgtgctaa gagagagtaa tgctctatag cctgagctgg cctcaacctt	8940
gccatcctcc tgcctcagcc tcctcctcct gagtgctagg atgacaggcg agtggtaact	9000
tacatggttt catgttttgt tcaagactga aggataacat tcatacagag aaggctctgg	9060
tcacaaaatgt tgcagttcac tgaatggcac aacccgtgat caagaaacaa aactcagggg	9120
ctggagagat ggcactgact gctttccag aggtccggag ttcaattccc agcaaccaca	9180
----- gctacagtgt actcacataa aataaataaa tctttaaaac acacacacac acacaattac	9240
caccccgagaa agcccactcc atgtttccctc ccacgtctct gcctacagta ctcccagggt	9300
accactgttc aggcttctaa caacctgggt tacttggcc tctttctgc tctgtggagc	9360
cacacatttg tgcctcat acacgttctt tctagtaagt tgcataattac tctgcgtttt	9420
tacatgtatt tatttattgt agttgtgtgt gcgtgtgggc ccatgcatttgg cacagtgtgt	9480
ggggatgtca gagtattgtg aacaggggac agttttttc ttcaatcatg tgggttccag	9540
aggttgaact caggtcatca tgcgtggcag caaatgcctt taccactga gacatctcca	9600
tattttttt ttttccccctg aggtgggggc ttgttccata gccaaactg gctttgcact	9660
tgcagttcaa agtgactccc tgcctccacc tcttagagta ttggaaattac gatgtgtact	9720
accacacctg actggatcat taatttttg atggggcgg ggaagcgcac atgctgcagg	9780
tgaaggatg actggactgg acatgagcgt ggaagccaga gaacagcttc agtctaattgc	9840
tctcccaact gagctatttc ggtttgccag agaacaactt acagaaagtt ctcagtgcca	9900
tgtggattcg ggggtggagt tcaactcatc agcttgacat tggctcctct acccaactgag	9960
ccttctcaact actctctacc tagatcatta attttttttt aaaaagactt attagggggc	10020
tggagagatg gtcagccgt taagagcacc gaatgcctt ccagaggtcc ttagttcaat	10080
tcccagcatg ccattgctgg gcagtagggg ggcaggtgt tcaacgtgag tagctgtgc	10140
cagttttccg cggtgagaa cctttgaca ccctgctgtc cctggtcatt ctgggtgggt	10200
gcatggtgat atgcttggat tatggaaagac tttgactgtt acagtgaagt tgggcttcca	10260
cagttaccac gtctccctg ttcttgca gccgggtgct tgcatttgc cgcgagggt	10320
acagccgctc cccaaacgcta gtatgcct acctcatgat gccggcagaag atggacgtca	10380
agtctgtct gagtactgtg aqgcagaatc qtqagatcgcc cccaaargat ggtttctgg	10440
cccaactctg ccagctcaat gacagactag ccaaggaggg caaggtgaaa ctctagggt	10500
cccacagccctt cttttgcaga ggtctgactg ggagggccct ggcagccatg ttttagaaac	10560
acagtataacc cactccctgc accaccagac acgtgcccac atctgtccca ctctggctt	10620
cggggccac tccaccctta gggagcacaat gaagaagct cctaagaagt tctgtccctt	10680
agccatcctt tccatgttaatt tatgtctctc cctgaggtga ggttcagggtt tatgtccctg	10740
----- -----	10800

tctgtggcat agatacatct cagtgaccca	gggtgggagg gctatcaggg	tgcatggccc	10860
gggacacggg cactttcat gacccctccc	ccacctgggt tcttcctgtg	tggtccagaa	10920
ccacgagct ggtaaaggaa ctatgaaac	acaggccctg acctccccat	gtctgttct	10980
ggtcctaca gccccacacg ccctgctgag	gcagacgaat gacattaagt	tctgaagcag	11040
agtggagata gattagtgac tagatttcca	aaaagaagga aaaaaaaggc	tgcattttaa	11100
aattatttcc tttagaattaa agatactaca	tagggccct tggtaagca	aatccattt	11160
tcccagaggc tatcttgatt ctttggaaatg	tttaaagtgt gccttgcag	agagcttacg	11220
atctatatct gctgcttcag agccttccct	gaggatggct ctgttctt	gcttggtaga	11280
agagcgatgc cttggcagg gttcccccct	tttcagaata cagggtgtaa	agtccagcct	11340
attacaaaca aacaaacaaa caaacaaaca	aaggacctcc atttggagaa	ttgcaaggat	11400
tttatcctga attatagtgt tggtgagttc	aagtcatcac gccaagtgt	tgccatcctg	11460
gttgctattc taagaataat taggaggagg	aacctagcca attgcagtc	atgtccgtgg	11520
gtgtgtgcac gggtgcataat gtggaaaggg	gtgcctgtcc cttggggac	agaaggaaaa	11580
tgaaggccc ctctgctcac cctggccatt	tacgggaggc tctgctgg	ccacgggtgc	11640
tgtgcaggat cctgaaactg actcgctgga	cagaaacgag acttggcggc	accatgagaa	11700
tggagagaga gagagcaaag aaagaaacag	cctttaaaag aacttctaa	gggtggg	11760
tgaacctcgc tggaccttgc atgtgtgcac	atttgccaga gattgaacat	aatcctctt	11820
ggacttcacg ttctcattat ttgtatgtct	ccggggtcac gcagagccgt	cagccaccac	11880
cccagcaccc ggcacatagg cgtctcataa	aagccat	tatgagaacc agagctgtt	11940
gagtaccccg tgtatagaga gagttgtgt	cgtggggcac ccggatccca	gcagcctgg	12000
tgcctgcctg taggatgtct tacaggagtt	tgcaagaaaa	ccttccttgg agggaaagaa	12060
atatcagggaa tttttgttga atatttcaaa	ttcagttta agtgaagac	tcagcagtgt	12120
tcatggtaa ggtaaggaac atgcctttc	cagagctgt	gcaagaggca ggagaagcag	12180
acctgtctta ggatgtcaact cccagggtaa	agacctctga tcacagcagg	agcagagctg	12240
tgcagcctgg atggtcatttgc tcccatttc	tgtgtgacca	cagaaccct ggtcacatag	12300
ggctggcat cctttttttt tttttttttt	tttttttttg	gccagaatg aagtgaccat	12360
agccaagttg tgtacctcg tcttttagttt	ccaagcggct	ctttgctca atacaatgtg	12420
catttcaaaa taacactgta gagttgacag	aactggttca	tgtgttatga gagagggaaa	12480
gagagggaaag aacaaaacaa aacaaaacac	cacaaaccaa	aaacatctgg gctagccagg	12540
catgattgca atgtctacag gcccagttca	tgagaggcag	agacaggaag accgcccggaaa	12600
ggtcaaggat agcatggtct acgtatcgag	actccagcca	gggctacggt cccaagatcc	12660
taggttttgg atttttggct ttggtttttgg	agacagggtt	tctctgtgtaa gcccggctg	12720
tcctggaact cgctctgttag accaggctgg	cctcaaactt	agagatctgc ctgactctgc	12780
ctttgagggc tgggacgaat gccaccactg	cccaactaag	attccattaa aaaaaaaaaaa	12840
agttcaagat aattaagagt tgccagctcg	ttaaagctaa	gtagaagcag tctcaggcct	12900
gctgctttag gctgttcttg	gcttggacct	gaaatctgcc cccaaacagtg tccaaagtgc	12960

catgacttg agccatctcc agagaaggaa gtgaaaattg tggctccccca gtcgattggg	13020
acacagtctc tctttgtcta ggtAACACAT ggtgcACACAT agcATTGAAC tctccACTCT	13080
gagggtgggt ttcccTCCCCC ctgccttTC tgggtTggTC accCCATAGG acAGCCACAG	13140
gacAGTCACT AGCACCTACT ggAAACCTCT ttgtgggaAC atGAAGAAAG agcCTTGGG	13200
agattcctgg ctttccatta gggctgaaAG tacaacggTT cttggTTggc tttgcctcgT	13260
gtttataAAA AtagctactA ttcttcaggt AAAATACCGA tgTTgtggAA aAGCCAACCC	13320
cgtggctGCC cgtgagtagg gggTggggTT ggAAATCCTG gatAGTgtTC tatCCATGGA	13380
aagtggTgGA atAGGAATTAA aggGTgttCC ccccccccccc aaccTCTtCC tcAGACCCAG	13440
ccactttcta tgacttataa acatCCAGGT AAAAATTACA AACATAAAAAA tggTTTCTCT	13500
tcTcaatCTT ctaaaAGTCTG cctgcctttt ccAGGGGTAG gTCTgtttCT ttgctgttCT	13560
attgtcttGA gagcacAGAC taacACTTAC caaatgAGGG aactCTTggc ccataCTAAG	13620
gCTCTTCTGG gCTCCAGCAC tCTTAAGTtA ttttAAGAAT tCTCACTTGG cCTTTAGCAC	13680
acCCGCCACC CCCAAGTGGG tGTggATAAT gCCATggCCA gcAGGGGGCA ctgTTgaggc	13740
gggtgcctt ccacCTTAAG ttgcttATAG tATTAAGAT gCTAAATGTT ttaATCAAGA	13800
gaAGCAGTGA tCTTATAATA CGAGGATAAG agATTTCTC ACAGGAAATT gTCTTTTCA	13860
taattCTTT acaggCTTtG tCCTgATCGT AGCATAGAGA gaATAGCTGG atATTTAACT	13920
tgtattCCAT tttcCTCTGC cAGCgttAGG ttaACTCCGT AAAAAGTgAT tcAGTggACC	13980
gaAGAGGCTC AGAGGGCAGG ggATggTggG gTgAgggCAGA gCActgTCAC ctGCCAGGCA	14040
tgggaggtCC tGCCATCCGG gaggAAAAGG AAAGTTAGC ctCTAGTCTA CCACCAgTGT	14100
taacgcACTC taaAGTTGTA accAAAATAA atGTCTTACA ttacAAAGAC gTCTgttttG	14160
tgtttcCTT tGTgttttG ggCTTTTAT gTGTgCTtA taACTgCTGT ggtggTgCTG	14220
ttgTTtagTT tgaggTAGGA tCTCAGGCTG gcCTTgAACT tCTgATGCC tGCCCTGCC	14280
cctgccccCTG cccCTGTCCC tGCCCTCAAG tgCTAGGACT AAAAGCACAT gCCACCACAC	14340
cagtACAGCA ttttCTAAC ATTAAAAAT AATCACCTAG gggCTggAGA gagggttCCA	14400
gCTAAGAGTg cacACTgCTC ttgggTAGGA CCTgAGTTA gttcccAGAA CCTATAACTGG	14460
gtggCTCCAG gtCCAGAGGA tCCAGGACCT ctggcCTCCA tggcATCTG ctCTTAGCAC	14520
atACCCACAT ACAGATAAC ACATAAAAAT AAAATGAAGC CTTAAAAC CTCCTAAAAC	14580
ctagccCTG gaggtACGAC tCTggAAAGC tggcATACTG tgtaAGTCCA tCTCATGGT	14640
ttCTggCTAA cgTAAGACTT ACAGAGACAG AAAAGAACtC aggGTgtGCT gggggTTggG	14700
atggagGAAG aggGTgAGGT AGGGGGAGCA cggggAACTT gggcAGTgAA aattCTTTGC	14760
aggACACTAq aggAGGATAA ATACCAgTRA ttgcACCCAC tactggACAA ctCCAYyyAA	14820
ttatgCTGGG tGAAAAGAGA aggCCCCAGG tattggCTGC attggCTGCA tttgcgtAAC	14880
atTTTTTAA attgAAAAGA AAAAGATGTA AATCAAGGTT agATGAGTGG ttgCTGTGAG	14940
ctgAGAGCTG gggTgAGTGA gACATgtGGA caACTCCATC AAAAAGCgAC agAAAGAACG	15000
ggCTgtGGGT ACAGTACCT CTAATCTCCA CCTCCGGGAG gtGATCAAGG ttagCCCTCA	15060
gCTAGCCTGT ggtgcATGAG ACCCTGTTTCA AAAAACTTTA ATAAAGAAAT AATGAAAAAA	15120



ctgagaaaaga cacccctca ggtctccat gcacccacac agacacacgg ggggggggta	17340
atgtataaag ctaagaaata atgaggaaaa tgatTTTTg ctaagaaatg aaattctgtg	17400
ttggccgcaa gaagcctggc cagggaaagga actgccttgc acacaccagg ctataagtca	17460
ccatgagttc cctggctaag aatcacatgt aatggagccc aggtccctct tgcctgggt	17520
ttgcctctcc cactggTTTt gaagagaaat tcaagagaga tctccttggc cagaattgtt	17580
ggtgctgagc aatgtggagc tggggtcaat gggattcctt taaaggcattc cttcccagggg	17640
ctgggtcata cttcaatagt aggggtgcttgc acagcaagc gtgagaccct aggttagagt	17700
ccccagaatc tgccccaaac cccccaaaaa ggcatccctc tgcctctggc tgggtggggg	17760
gagcaaacac cttaactaa gaccatttgc tggcagggtt aacaatgac cttggctaga	17820
ggaatttggt caagctggat tccgccttct gttagaagccc cacttggttc ctttgttaag	17880
ctggcccaca gtttggTTTt agaatgcctg agggggccag ggagccagac aattaaaagc	17940
caagctcatt ttgatatatctg aaaaccacag cctgactgccc ctggccgtgg gaggtactgg	18000
gagagctggc tgggtccctg cctcaccaac gcccccccccc ccaacacaca ctccctcggt	18060
cacctggagag gtgcacggc caatttggaa gtttacttgc cttgagaagt cttgggaggg	18120
ctgacgctaa gcacacccct tctccaccccc cccccaccccc acccccgtga ggaggaggg	18180
gaggaaacat gggaccagcc ctgctccagc ccgtccttat tggctggcat gaggcagagg	18240
gggctttaaa aaggcaaccc tatctaggct ggacacttggc gcctgtgcta ccgagtgc	18300
tcctccacctt ggcagcatgc agccctcaact agcccccgtgc ctcatctgccc tacttgtca	18360
cgctgccttc tggctgtgg agggccaggg gtggcaagcc ttcaagatg atgccacaga	18420
ggtcacccca gggcttggag agtacccca gcttccttctt gagaacaacc agaccatgaa	18480
ccggggcggag aatggaggca gaccccccac ccacccctat gacgccaaag gtacggatg	18540
aagaagcaca tttagtggggg ggggggtctt gggaggttgc tgggtgggtt tttagcatctt	18600
tttcagaggt ttgtgtgggt ggctagcctc tgctacatca gggcaggac acatttgctt	18660
ggaagaatac tagcacagca tttagaacctg gagggcagca ttggggggctt ggttagagagc	18720
acccaaggca ggggtggaggt tgaggtcagc cgaagctggc attaacacgg gcatgggctt	18780
gtatgtatgtt ccagagaatc tcctcctaag gatgaggaca caggtcagat ctatgtctg	18840
accagtgggg aagtgtatgt tgaggctgg atgccagatg ccacccatgg ctgtactata	18900
tcccacatga ccaccacatg agttaaagaa ggccccagct tgaagatggc gaaaccgaga	18960
ggctcctgag ataaagtca cttgggatgaa gaagagctga gactggaaagc tggtttgatc	19020
cagatgcaag gcaaccctag atggggTTTt ggtgggaacc tgaagccagg aggaatccct	19080
tttagttccctt cttggggcagg gtctgctcaat tggcccaaga ggggtttttttttaaaaagaaca	19140
gggtttgttag gtggcatgtg acatgagggg cagctgagtg aaatgtcccc tggatgtggca	19200
cagggtggcac cacttgcctt gagcttgcac cctgacccca gcttgcctc attcctgagg	19260
acagcagaaa ctgtggaggc agagccagca cagagagatg cctgggggtgg ggggtgggggt	19320
atcacgcacg gaacttagcag caatgaatgg ggtgggggtgg cagctggagg gacactccag	19380
agaaatgacc ttgtgtggca ccattttgtt gggaggagag ctcattttcc agcttgcac	19440

cacatgctgt ccctccgtc tcctagccag taagggatgt ggaggaaagg gccaccccaa	19500
aggagcatgc aatgcagtca cgaaaaatgc gaggaagtgc ttgacctaag ggcactattc	19560
ttggaaaagcc ccaaaactag tcctccctg ggcaaacagg cctccccac ataccacctc	19620
tgcaggggtg agtaaattaa gccagccaca gaagggtggc aaggcctaca cctccccct	19680
gttgcgtcccc ccccccccccc gtgaagggtgc atcctggct ctgcccctct ggctttggta	19740
ctgggattt tttttccctt ttatgtcata ttgatcctga caccatggaa cttttggagg	19800
tagacaggac ccacacatgg attagttaaa agcctccat ccatactaaac tcatacgtagg	19860
agatagagca tgccaagag aggagggcag gcatcagacc tagaagatat ggctgggcat	19920
ccaaaccaat ctccctcccc ggagaacaga ctctaagtca gatccagcca cccttgagta	19980
accagctcaa ggtacacaga acaagagagt ctggatataca gcaggtgcta aacaaatgct	20040
tgtggtagca aaagctatacg tttttgggc agaactccga cccaaatccgc gatgtggagg	20100
cgaaaggccc tctactcgcc accgccccgc ccccacctgg ggtcctataa cagatcactt	20160
tcacccttgc gggagccaga gagccctggc atccttagta gcccccccg ccccccccccc	20220
gcaaggcagcc cagccctgcc tttggggcaa gttttttct cagcctggac ctgtgataat	20280
gagggggtttgc acggccgcgc ctttggtcgc tttcaagtct aatgaattct tatccctacc	20340
acctgccttcttccatct cccggatac cggccctgtc ccagtggctg gtaaaggagc	20400
tttaggaagga ccagagccag gtgtggctag aggctaccag gcagggtctgg ggatgaggag	20460
ctaaactggaa agagtgtttgc gttagtaggc acaaagcctt gggggggatc cctagttacc	20520
gagaagtgaa gatggggct gagaagttca agaccatcca tccttaacta cacagccagt	20580
ttgaggccag cctgggctac ataaaaaccc aatctaaaaa gctgccaatt ctgattctgt	20640
gccacgttgt gcccgtatgt atagtggatg aagtctgtga atcctggggc aacctat	20700
acagatgtgg ggaaaagcaa cttaagtac cctggccaca gatcacaag aaagtaagt	20760
acagagctcc agtgtttcat ccctgggttc caaggacagg gagagagaag ccagggtggg	20820
atctcactgc tccccgggtc ctcccttcata taatccatac agattcgaaa ggcgcaggc	20880
ggtttggaaa aagagagaag ggtggaaagga gcagaccagt ctggcctagg ctgcagcccc	20940
tcacgcattcc ctctctccgc agatgtgtcc gagtacagct gcccgcgcgt gcactacacc	21100
cgttccatgtc cagacggccc atgcgcgcgc gccaagccgg tcaccgagtt ggtgtgtcc	21160
ggccagtgcg gccccggcg gctgctggcc aacgcctatcg ggccgcgtgaa gtgggtggcg	21220
ccgaacggac cggattcccg ctgcattcccg gategttacc ggcgcgcgc ggtgcagctg	21280
ctgtggcccg gggcgccgc gccgcgcgcg cgcaagggtgc gtctgggtgc ctcgtgcaag	21340
tgcaagcgcc tcaccctgtt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg gcccggagacc	21400
gcccggccgc agaagggtcg caagccgcgg cccggccccc ggggagccaa agccaaaccag	21460
gcccggccgc agaaccgccta ctagagcgag cccgcgccta tgcagcccc ggcgcgtcc	21520
atccgttttc agtgtaaagc ctgcagccca gcccgggggt gccaaacttt ccagaccgtg	21580
tggagttccc agcccaacttag agaccgcagg tccttcgtcc cgctgcgggg gatggggagg	21640

gggtggggtt cccgcgggccc	aggagagggaa gcttgagtcc	cagactctgc	ctagccccgg	21660		
gtgggatggg ggtcttctca	ccctcgccgg	acctatacag	gacaaggcag	tgttccacc	21720	
ttaaaggaaa	gggagtggtgg	aacgaaagac	ctgggactgg	ttatggacgt	acagtaagat	21780
ctactccttc	cacccaaatg	taaagcctgc	gtgggctaga	tagggttct	gaccctgacc	21840
tggccactga	gtgtgtatgtt	gggctacgtg	gttctctttt	ggtacggtct	tctttgtaaa	21900
atagggaccg	gaactctgt	gagattccaa	ggattgggt	accccggtga	gactggtag	21960
agagaggaga	acaggggagg	ggttagggga	gagattgtgg	tggcaaccg	cctagaagaa	22020
gctgtttgtt	ggctccca	ctcgccgcct	cagaggtttg	gcttccccca	ctccttcctc	22080
tcaaatctgc	cttcaaatacc	atatctggga	taggaaaggc	cagggtccga	gagatggtag	22140
aagggccaga	aatcacactc	ctggcccccc	gaagagcagt	gtcccgcccc	caactgcctt	22200
gtcatattgt	aaagggattt	tctacacaac	agtttaaggt	cgttggagga	aactgggctt	22260
gccagtcacc	tcccatcctt	gtcccttgcc	aggacaccac	ctcctgcctg	ccacccacgg	22320
acacatttct	gtctagaaac	agagcgtcgt	cgtgctgtcc	tctgagacag	catactttac	22380
attaaaaaga	ataatacggg	ggggggggggc	ggagggcgcga	agtgttatac	atatgcttag	22440
aagctgtca	gcccacacgc	accacccaca	atcttttgt	aaatcatttc	cagacacctc	22500
ttactttctg	tgttagatttt	aattgttaaa	aggggaggag	agagagcgtt	tgtaacagaa	22560
gcacatggag	gggggggttag	gggggttgggg	gctggtgagt	ttggcgaact	ttccatgtga	22620
gactcatcca	caaagactga	aagccgcgtt	ttttttttta	agagttcagt	gacatattta	22680
ttttctcatt	taagttattt	atgccaacat	tttttcttg	tagagaaagg	cagtgttaat	22740
atcgctttgt	gaagcacaag	tgtgtgtgg	tttttgtttt	ttgttttttc	cccgaccaga	22800
ggcattgtta	ataaaagacaa	tgaatctcga	gcaggaggct	gtggcttgt	tttgtcaacc	22860
acacacaatg	tctcgccact	gtcatctcac	tccctccct	tggtcacaag	acccaaacct	22920
tgacaacacc	tccgactgct	ctctggtagc	ccttggca	atacgtgtt	ccttgaaaa	22980
gtcacattca	tcccttcctt	tgaaacacgt	gctctcattc	cccagctggg	tcatcgcat	23040
acccctaccc	cagcctccct	ttagctgacc	actctccaca	ctgtttcca	aaagtgcacg	23100
tttcacccgag	ccagttccct	ggtccaggc	atcccattgc	tccctccctgc	tccagaccct	23160
tctcccacaa	agatgttcat	ctcccactcc	atcaagcccc	agtggccctg	cggttatccc	23220
tgtctttca	gttagctgaa	tctacttgct	gacaccacat	gaattccctc	ccctgtctta	23280
aggttcatgg	aactcttgcc	tgcctctgaa	ccttccagga	ctgtcccagc	gtctgtatgt	23340
tcctctctct	tgtaaageccc	caccccaacta	tttgatttttcc	aattcttagat	cttcccttgc	23400
tcattcccttc	acgggatagt	gtctcatctg	gccaaagtcc	gtttgatall	yyyataaaatg	23460
caaagccaag	tacaattttag	gaccagtta	tcattgggccc	aagctttttc	aaaatgtgaa	23520
ttttacaccc	atagaagtgt	aaaagccctc	caaagcagag	gcaatgcctg	gtctttccct	23580
caacatcagg	gtccctgctt	tatgggtctg	gtggggtagt	acattcataa	acccaaacact	23640
aggggtgtga	aagcaagatg	attgggagtt	cgaggccaa	cttggctatg	aggccctgtc	23700
tcaacctctc	ctccctccct	ccagggtttt	gttttgtttt	gttttttga	tttggaaactg	23760

caacacttta aatccagtca agtgcacattc	tgcgtgaggg gaactctatc cctaataaa	23820
gcttccatct tgatttgtt atgtgcacac	tgggggttga acctgggcct ttgtacctgc	23880
cgggcaagct ctctactgct ctaaacccag	ccctcactgg cttctgttt caactccaa	23940
tgaattcccc taaatgaatt atcaatatac	tgtcttgaa aaataccatt gagtgctgct	24000
ggtgtccctg tggttccaga ttccaggaag	gactttcag ggaatccagg catcctgaag	24060
aatgtcttag agcaggaggc catggagacc	ttggccagcc ccacaaggca gtgtggtgca	24120
gagggtgagg atggaggcag gcttgcattt	gaagctgaga cagggtaactc aggattaaaa	24180
agcttccccc aaaacaattc caagatcagt	tcctggtaact tgcacctgtt cagctatgca	24240
gagcccagtg ggcatacggtg aagacaccgg	ttgtactgtc atgtactaac tgtgcttcag	24300
agccggcaga gacaaataat gttatggtga	ccccagggga cagtgattcc agaaggaaca	24360
cagaagagag tgctgctaga ggctgcctga	aggagaaggg gtcccagact ctctaagcaa	24420
tgaggagag actaggttgg gctgtgatcc	cattaccaca aagagggaaa aaacaaaaaa	24480
caaacaaaca aacaaaaaaaaa aacaaaacaa	aacaaaaaaaaa aacccaaaggt ccaaattgtt	24540
ggtcagggtt gagtttattt atggaaagtt	atattctacc tccatgggtt ctacaaggct	24720
ggcgcccatc agaaagaaca aacaacaggc	tgatctggga ggggtggta tctatggcag	24780
ggagcacgtg tgcttgggtt acagccagac	acggggcttg tattaatcac agggcttgc	24840
ttaataggct gagagtcaag cagacagaga	gacagaagga aacacacaca cacacacaca	24900
cacacacaca cacacacaca catgcacaca	ccactcaattt ctcaactcgaa gagccctac	24960
ttacattcta agaacaaacc attcctcctc	ataaaggaga caaagttca gaaacccaaa	25020
agagccacag ggtccccact ctctttgaaa	tgacttgac ttgttgcagg gaagacagag	25080
gggtctgcag aggcttcctg ggtgacccag	agccacagac actgaaatct ggtgctgaga	25140
cctgtataaa ccctttcca caggttccct	gaaaggagcc cacattcccc aaccctgtct	25200
cctgaccact gaggatgaga gcacttgggc	cttccccatt ctggagtgc accctggttt	25260
ccccatctga gggcacatga ggtctcaggt	ttggggaaag ttccacaagt attgaaagtg	25320
ttcttgttt gtttgcatt taatttaggt	gtatgagtgc ttttgcattga atatatgcct	25380
gtgttagcatt tacaaaggcctg gtgcctgagg	agatcagaag atggcatcag ataccctgga	25440
actggacttg cagacagttt tgagccactg	tgtgggtgtt aggaacagaa cctggatcct	25500
ccggaagagc agacagccag cgctttagc	cactaagcca tcactgaggt tctttctgtg	25560
gctaaagaga caggagacaa aggagagttt	cttttagtca ataggaccat gaatgttcc	25620
cgtaacgtga gacttagggca gggtgatccc	ccagtgacac cgtggccct gtgtagttat	25680
tagcagctt agtcttattc ctaataaagt	cccagttgg ggcaggagat atgtattccc	25740
tgctttgaag tggctgaggt ccagttatct	acttccaaagt acttgggttctt ctttctggag	25800
ttggggaaagc tccctgcctg cctgtaaatg	tgtccattct tcaaccttag acaagatcac	25860
		25920

tttccctgag cagtcaaggcc agtccaaagc ccttcattt agcttcata aggaacaccc	25980
cttttgtgg gtggaggttag cacttgctt gaatcccagc attaagaagg cagagacagt	26040
cggatctctg tgagttcaca gccagectgg tctacggagt gagttccaag acagccaggc	26100
ctacacagag aaaccctgtc tcgaaaaaaaaa caaaaacaaa agaaataaaag aaaaagaaaa	26160
caaaaacgaa caaacagaaa aacaagccag agtgtttgtc cccgtatttt attaatcata	26220
tttttgtccc ttgcattt tagactaaaa gactcgggaa agcaggtctc tctctgtttc	26280
tcatccggac acaccagaa ccagatgtat ggaagatggc taatgtgctg cagttgcaca	26340
tctggggctg ggtggattgg ttagatggca tgggctgggt gtggttacga tgactgcagg	26400
agcaaggagt atgtggtgca tagcaaacga ggaagttgc acagaacaac actgtgtgt	26460
ctgatgtgea ggtatggca catgcaagca gaagccaaagg gacagcctta gggtagtgtt	26520
tccacagacc cctccccctt ttaacatgg gcatctctca ttggccttgg gcttgccaac	26580
tgggctgggc tggctagctt gtaggtccca gggatctgca tatctctgcc tccctagtgc	26640
tgggattaca gtcatatatg agcacacctg gctttttat gtgggttctg ggcttgaac	26700
ccagatctga gtgctgcaa gcaatcggt tgaatgactg ctcatctcc ccagaccctg	26760
ggattctact ttctattaaa gtatttctat taaatcaatg agccctgccc cctgcactca	26820
gcagttctta ggcctgctga gagtcaagtg gggagtgaga gcaagcctcg agaccccatc	26880
agcgaagcag aggacaaaga aatgaaaact tgggattcga ggctcggtat atggagatac	26940
agaaagggtc aggaaaggaa atgaaccaga tgaatagagg caggaagggt agggccctgc	27000
atacatggaa cctgggtac atgttatctg catgggttt gcattgcaat ggctttag	27060
caggttcacc acactggaa acagaagcca aaaagaagag taggtggtgt tggagtcaga	27120
tactgtcagt catgcctgaa gaaatggaaag caattaacga tgcgcgc当地 tttaggatatt	27180
agctccctga agaaaggcaa gaagctgggc tggggactt gaagggagct ttgaatgatg	27240
tcacattctc tggatgccta gcagggcagt attggagact gagacttgac ttgtgtgtcc	27300
atatgattcc tcctttccct acagtcatct ggggctctg agttcgtcc ttgtccaaga	27360
acctggagct ggcaatggcc agctgcagt atagatgtct gcaagaaaga tctgaaaaga	27420
gggaggaaga tgaaggaccc agaggaccac cgacctctgc tgcgc当地 agctgcagga	27480
ccagtctctc ctacagatgg gagacagagg cgagagatga atgtcaggg gaggagtcag	27540
agaaaggaga gggtagggca gagaccaaag gagggaaaca ctgtgtct acagctactg	27600
actgagtacc agctgcgtgg cagacagcca atgcaaggc tcgc当地 atggcaccc	27660
gtgggactcc tagccctgt ctggcagagg ggagtgtga atggcataat gtttggatat	27720
gatctqaatq tqqtccaqcc ctatgttccct tccatgtgtt gggataaaagc accctgacca	27780
aagctacttt ttgtttgtt tgggggggtt tgggggggtt tgggggggtt aggcagggtt	27840
tctctgtatc acccttagctg tccgttact cactctgttag accaggctgg cctc当地	27900
agaaatcccc ctgc当地 ctccctgtc ctccctaaatg ctggaaattaa aggctgc当地 caccactgccc	27960
ggcccaaagc tactttaaga gagagagagg aatgtataag tattataatt ccaggttata	28020
gttcattgtt gttagaattgg agtcttcata ttccaggtaa tctccacag acatgccaca	28080

aaacaacctg ttctacgaaa tctctcatgg actcccttcc ccagtaattc taaaactgtgt	28140
caaatctaca agaaatagtg acagtcacag tctctaacct tttgggcatt agtctgaagt	28200
ctcattgcta agtactggaa agatgaaaac tttacctgt gtcagcattt ggagcagagc	28260
ctttgggatt tgagatggc tttgcagag ctccataatgg ctacatggag agagggggcc	28320
tgggagagac ccatacacct tttgctgcct tatgtcacct gacctgctcc ttgggaagct	28380
ctagcaagaa ggccttccct ggatcaccca ccaccttgca cctccagaac tcagagccaa	28440
attaaacttt cttgttactg tcgtcaaagc acagtcggc tgggttgtat cactgtcaat	28500
gggaaacaga cttgcctgga tggataactt gtacattgca taatgtctag aaatgaaaag	28560
tcctatagag aaaaagaaaa ttagctggca cacagataga ggccctggag gaggctggct	28620
ttgtcctccc cgaggaggtg gcgagtaagg tgtaaatgtt catggatgta aatgggccc	28680
tatatgaggg tctgggtaa caagaaggcc tgtgaatata aagcactgaa ggtatgtcta	28740
gtctggagaa ggtcactaca gagagttctc caactcagtg cccatacaca cacacacaca	28800
cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccacaaagaa aaaaaggaag aaaaatctga	28860
gagcaagtac agtacttaaa attgtgtgat tgtgtgtgtg actctgtatg cactgtctca	28920
tcttgcctta tgagttgaaa accaaatggc ccctgagagg cataacaacc acactgttgg	28980
ctgtgtgctc acgttttct taaagcgtct gtctgggtt ctgctagcat cagggcagact	29040
tgcagcagac tacatatgct cagccctgaa gtccttctag ggtgcattgc tcttcagaat	29100
ttcagaaaagt catctgtggc tccaggaccg cctgcactct ccctctgcgg cgaggctgca	29160
gactcttaggc tgggtggaa gcaacgctta cctctggac aagtataaca tggtggctt	29220
tcttcctc tgggtggcc acctggacat aaaatagatg caagctgtgt aataaaatatt	29280
tcctcccgtc cacttagttc tcaacaataa ctactctgag agcacttatt aataggtggc	29340
ttagacataa gctttggctc attcccccac tagctttac ttctttaact ctttcaaacc	29400
attctgtgtc ttccacatgg ttagttacct ctcccttccat cctgggttgc ttcttccttc	29460
gagtcgcctc cagtgtctct aggtgtatgct tgtaagatata tctttctaca aagctgagag	29520
tggtggcact ctgggagttc aaagccagcc tgatctacac agcaagctcc aggatatcca	29580
gggcaatgtt gggaaaacct ttctcaaaca aaaagagggg ttcaagttgtc aggaggagac	29640
ccatgggtta agaagtctag acgagccatg gtgtatgcata ccttcattcc aagcacttag	29700
gaggcaaaga aaggtgaaac tctttgactt tgaggccagc taggttacat agtgcatacc	29760
tgcttagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgttaatt taaaagtcta	29820
aaaatgcatt ctttaaaaaa tatgtataag tatttgccctg cacatatgta tgtatgtatg	29880
tataccatgt gtgtgtctgg tgctgaagga cttagccatg actcccttaga actagagtca	29940
tagacagttg tgacactccc caacccccc ccatgtgggt gcttgaagct aaactcctgt	30000
cctttgtaaa gcagcaggtg tctatgaacc ctgaaccatc tctccagtc ccagatgtgc	30060
attctcaaag aggagtccctt catattccc taaaactgaac atccattatca gtgagcatcc	30120
tcgagtcacc aaagctactg caaacccctct tagggAACAT tcactattca cttctacttg	30180
gctcatgaaa cttaagtaca cacacacaaa cacacacaca cacacaggt catgcactca	30240

caaaagcatg catgtacacc attcttatta gactatgctt tgctaaaaga ctttcctaga 30300  
tactttaaaa catcaacttct gcctttggc gggcagggttc caagattggc actggcgta 30360  
tggaaactga acaaggtaga gatctagaaa tcacagcagg tcagaagggc cagccgtac 30420  
aagagagagt tccacacctt ccaggaacac tgagcagggg gctggaccc tgcctcttag 30480  
cccaagaaac tagtgcgtt cctgtatgca tgcctcttag agattccata agatctgcct 30540  
tctgccataa gattccctgc atccagacaa gccttagggg agttgagagg ctgcctgagt 30600  
ctctccaca ggcgccttct tgccctggcag tatttttta tctggaggag aggaatcagg 30660  
gtgggaatga tcaaatacaa ttatcaagga aaaagtaaaa aacatatata tatatatatt 30720  
aactgatcta gggagctggc tcagcagtttta agagttctgg ctgccttgc ttcaagatctt 30780  
gccttgattt ccagcacccca catgatggct ttcaactgtt tgcctgttcc cagggatcc 30840  
aacagcctct tctgacctcc atagacaaga cctagtcctc tgcaagagca ccaaattgtc 30900  
ttatctgttg atccatctct ctagcctcat gccagatcat taaaactac tggacactgt 30960  
cccattttac gaagatgtca ctgcgcagtc atttgcctat agtggatatt tgcattctt 31020  
ctatgtctc acccttgcaa ttatataagaa agatatctgc atttgcctcc tgagagaaca 31080  
aagggtggag ggctacttag atggctcttag gggtaaaaggt gcttgcacaca aaatctgaca 31140  
acttaagttt ggtcttgaa tccacatggt ggagagagag aagagattcc cgtaagttgt 31200  
cctcaaaactt cccacacatg tgctgtggct tatgtgtAAC cccaaataagt aaagatagtt 31260  
ttaaacacta cataaggtag ggtttttca tgaccccaag gaatgatgcc cctgatagag 31320  
cttatgctga aaccccatct ccattgtgcc atctggaaag agacaattgc atcccgaaa 31380  
cagaatctt atgaatggat taatgagcta ttaagaaaagt ggcttggta ttgcacatgc 31440  
tggcggcgta atgacctcca ccatgatgtt atccagcatg aaggctctca ccagaagtca 31500  
tacaaatctt ctttaggttcc cagagtcgtg agcaaaaaaa gcacacctct aaataaatta 31560  
actagcctca ggttagttAAC caccgaaaaat gaaccaaggc agttctaata caaaaccact 31620  
tcccttccct gttcaaaacca cagtgccttta ttatctaaaa gataaaacttc aagccaagct 31680  
tttaggttgc cagtagtttat gtaacaacaa ggcccggttga cacacatctg taactcctag 31740  
tactggcctt caggggcaga gacaggttggc gcccggagt ttgaattcca ggttctgtga 31800  
gaaactctgt ctgaaaagac aatatggtga gtgacccggg aggatatctg atattgactt 31860  
ctggccaaaca cacagccatc tctgcacatc tgttagttgc agcctttgc actaagtttgc 31920  
gccagagtca gagtttgcaa gtgtttgtgg actgaatgca cgtgttgcgt gtgatctaca 31980  
aagtccacccct cttctcaag ctagcagcac tggcttcggc cagctgtca ttcaagcctc 32040  
tttgcagagt catcarggggg atggggggggc agggccccctc octagaacac caagccgttg 32100  
gttggttatt caggacatta ttggggggcca agatgacaga taactctatc acttggccaa 32160  
cagtcgggtg ttgcgggttt aggttatttc tgtgtctgc gaaaacagtg caacccggac 32220  
aaaagaaaata aatgatataca tttttcatttc aggcaacttag attccgtggt acaaaaaggct 32280  
ccctggggaa cgaggccggg acagcgcggc tcctgagtcg ctatitccgt ctgtcaactt 32340  
ctctaatctc ttgatttccct cccctgttct gtttcccttc ttttgcgtggg gcccagtqqa 32400

gtctgtgtac tcacaggag gagggtggca aagccctggt cctctacggg ctgggggaag	32460
gggggaagct gtcggcccag tgacttttc ccctttctct ttttcttaga aaccagtctc	32520
aatthaagat aatgagtcctc ctcatcactg tgtgctcaact attcataggg acttatccac	32580
ccccggccctg tcaatctggc taagtaagac aagtcaaatt taaaaggaa cggtttctaa	32640
aaaatgtggc tggaccgtgt gccggcacga aaccagggat ggcggctaa gttacatgt	32700
ctctgccagc cccgggtgcct ttccctttcg gaaaggagac ccggaggtaa aacgaagttg	32760
ccaacttttg atgatggtgt gcgccgggtg actctttaaa atgtcatcca tacctggat	32820
agggaaaggct ctccaggag tcatctagcc ctcccttcag gaaaagattc cacttccgg	32880
ttagtttagct tccacctggt cccttatccg ctgtctctgc ccactagtc tcatccatcc	32940
ggtttccgccc ctcatccacc ttgccctttt agttcctaga aagcagcaccc gtagtcttgg	33000
caggtgggccc attggtcaact ccgctaccac tgttaccatg gccaccaagg tgtcatttaa	33060
atatgagctc actgagtcct gcgggatggc ttgggtggta atatgcttgc tgcaaaatcg	33120
tgagaactgg agttcaattc ccagcacatg gatgtatcc cagcacctgg aaggcaggga	33180
gcagagatct taaagctcct ggccagacag cccagctaa ttagtaatca gtgagagacc	33240
ctgtctcaag aaacaagatg gaacatcaaa ggtcaacctc ttgtctccac acacacaaat	33300
acacacatgc acatacatcc acacacaggc aaacacatgc acacacctga acaccctcca	33360
caaatacata cataaaaaaa taaatacata cacacataca tacatacacc aacattccct	33420
ctccttagtc tcctggctac gctcttgc tcccccactaa ggcttcaact tcttctattt	33480
cttcatcttg actcctctgt actttgcattg cttttccag caaaggcttt tctttaatc	33540
tccgtcattc ataaactccc tctaaatttc ttcccctgcc ctttcttcc tctctaggga	33600
gataaaagaca cacactacaa agtcaccgtg ggaccagtt attcacccac ccaccctgc	33660
ttctgttcat ccggccagct aagttagtcca acctctctgg tgctgtaccc tggaccctgg	33720
tttcaccaca gtcctccat gtcacccagc cctgcaaaacc ttcaagcttag cctctgggtc	33780
tccaaaccagc acaggcccag tctggcttct atgtcctaga aatctccttc attctctcca	33840
tttccctccct gaatctacca cttctttct cccttctccct gacctctaatt gtcttggtca	33900
aacgattaca aggaagccaa taaaatttgc agtttgggtt acctcagagt cagcagggga	33960
gctggatgtt attcacattt ccaggccctt gctttgtcc ccgattctg acaggcagtt	34020
ccgaagctga gtccaggaag ctgaatttaa aatcacactc cagctgggtt ctgaggcagc	34080
cctaccacat cagctggccc tgactgagct gtgtctgggtt ggcaagttggc ctgggtggc	34140
tgggtgggtc ggtgggtgtt gttgggtggg tgggtgggtt ggtgggtgg tttgtgtgt	34200
ttttctgttt ttacaaaact ttcttaattt ttatataaaag gacaaatctg cctcatatag	34260
gcagaaagat gacttatgcc tatataagat ataaagatga ctttatgcc cttattagca	34320
atagttactg tcaaaaagtaa ttcttattt acacccttat acatggatt gctttgtt	34380
gagactctaa aatccagatt atgtatttaa aaaaaattt cccagtcctt aaaaggtgaa	34440
aatggacccc agatagaagg tcacggcacaa agtatggagt cggagtgtgg agtctgc	34500
atggtctgga cagaagcatc cagagagggt ccaagacaaa tgccctgcct cctaaggaac	34560

actggcagcc ctgatgagggt accagagatt gctaagtggaa ggaatacagg atcagaccca	34620
tggagggct taaagcgtga ctgttagcagc cctccgctga ggggctccag gtgggcgccc	34680
aagggtgctgc agtgggagcc acatgagagg tgatgtcttg gagtacaccctc gggtaaccatt	34740
gttttagggag gtggggattt gtgggtgtggaa gacaggcagc ctcaggatg cttttcaaca	34800
atggttgatg agtttggaaact aaaacagggg ccatcacact ggctccctata gctctggct	34860
tgccagcttc cacatctgcc ccccccccccc tgtctggcac cagctcaagc tctgtgattc	34920
tacacatcca aaagaggaag agtagcctac tgggcattgcc acctttctg gaccatcagg	34980
tgagagtgtg gcaagcccta ggctcctgtc caggatgcag ggctgccaga taggatgctc	35040
agctatctcc tgagctggaa ctattttagg aataaggatt atgcccggcc ggggttggcc	35100
agcacccttccag cagccctgtgc ttgcgtaaaa gcaagtgtcg ttgatttatac taaaaacaga	35160
gccgtggacc caccacagg acaagtatgt atgcattctgt ttcatgtatc tgaaaagcga	35220
cacaaccatt tttcacatca tggcatcttc ctaaccccca ttcttttttgc ttttgtttt	35280
ttgagacagg gtttctctgt gtatgcctgg ctgtccctggaa actcaactttg tagaccaggc	35340
tggcctcgaa cttagaaatc ctgggattaa aggtgtgtgc caccacgccc ggccctaaacc	35400
cccattttta atgggtatcc agtgggttggaa atttcgggccc acacacatgt ccatttaggg	35460
ttagctgctg tcttctgagc tacctggtac aatctttatac ccctggggcc tgggctcctg	35520
atccccctact cggggcccgat caagtccagt tcctggggccc gatcaagtcc agttcctggg	35580
cccgaaacaag tccagtcctt agtcgtatc gtcatttcgt gtccttcggc ctgttcttac	35640
ttacactctt ccccttgctc tggacttggtt gctttttta ctcaagttgt ctgccacagt	35700
ccctaagCCA cctctgtaaAG acaactaaga taatacttcc ctcaaggacgg gaaagtccctg	35760
agtccaccaca ccctctggag gtgtgtggac acatgttcat gcgtgtggtt gcgcttacgt	35820
acgtgtgc	35828

<210> 18

<211> 9301

5 <212> ADN

<213> Homo sapien

<400> 18

gaccaaaggat atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggtttttaga	480
aacttctctt tgggaggcctt ggaagactgg ggttagaccca gtgaagattg ctggcctctg	540
ccagcaactgg tcgaggaaca gtcttgctg gaggtgggggg aagaatggct cgctggtgca	600
cccttcaaata tcaggtgcag aggcatgagg caacagacgc tggtagagac ccagggcagg	660
gaggacgctg gggtggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag	720
aaaagaaaaag gtttcaaaga atctcctcctt gggaaatatag gagccacgac cagctgctgg	780
taccactggg aagggaaaca ggtaaaggag cctcccattcc acagaacagc acctgtgggg	840
caccggacac tctatgctgg tggtagctgt cccccaccaca cagaccaccata tcatggaatc	900
cccaaggaggt gaaccccccag ctcgaagggg aagaaacagg ttccaggcac tcagtaactt	960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gttttagcca actgcaagat agccctggtg	1020
tgtgggggggg tgggggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca	1080
cccccgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcaacttggaa ggaatgggg	1140
ttttcgccac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggagggggag	1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtccctca gcagccaccc cagtcacccac	1260
cttgcctcat tccaggggg ggagaaggaa gaggaaccctt gggttctgg tcaggcctgc	1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcacatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc	1380
atggggggcgt ctgaaatgac acitcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc	1440
aggtggcaga gaagtccact gcccaggctc ctggacccca gcccctcccg ctcacacacc	1500
tgttgggact atgggggtgt aaaaagggca actgcattggg agggcagcca ggaccctccg	1560
tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc	1620
tgggctccag cgactgcctg aagggtgtta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc	1680
tggactccca cgagaggcca cagccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga	1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggcg ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct	1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag ccctgcagag gtgaggatgc	1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctccctgc	1920
tgtgcttgct tttagtgc ggggtgggggg gtggccttct ctgtcccttc tctggtttgg	1980
tcttaagact atttttcatt ctttcttgct acatttggaaat tatccccatg aaacctttgg	2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccaggc tatTTaaaaa gctccaccc atctaagtcc	2100
accataggag acatggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc	2160
tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgcccatca gataacacag aacaagaaat	2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgttaggt tttgggtcag	2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc	2340
cccaaggccag cctccatgg atgctcgaac gcagggctc cactcttgcg ggagccaaaa	2400
ggtgctggga cccccaggaa gtggagtcgg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc	2460
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggtggac acactgcctt	2520
tgattccttt caagtctaattt gaattcctgt cctgatcacc tcccttcag tccctcgcc	2580

ccacagcagc tgccctgatt tattaccttc aattaacctc tactcctttc tccatccccct	2640
gtccacccct cccaaagtggc tgaaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcaagg	2700
tgtgctgagt acttacccctg cccaggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaatc	2760
ataagaagac cccagaagag aaatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct	2820
atatgtgcc aatggtattt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg	2880
ggcggcccat tttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacttgccc aagatgacac	2940
ctgcagttag cgatggagcc ctgggtttt aaccccgca gtcatttggc tccgagggga	3000
cagggtgcgc aggagagctt tccaccagct ctagagcatc tggcaccttc ctgcaataga	3060
tgttcagggg caaaaagcctc tggagacagg ctggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga	3120
gacggggccgg tccagggcag ggggtggccag gcggggcgcc accctcacgc gcgccctctct	3180
ccacagacgt gtcccgagtac agctgcccgc agctgcaccc caccgcgtac gtgaccgatg	3240
ggccgtgccc cagcgc当地 cccggccaccg agctgggtgt ctccggccag tgcggcccccgg	3300
cgcgcctgct gccccacgc atcggccgcg gcaagtgggtg ggcacccgt gggcccccact	3360
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccgggtggtg	3420
aggcgccgcg cgcgccgc当地 gtgcgcctgg tggcctcgta caagtgc当地 cgcctcaccc	3480
gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg cgc当地agg	3540
gccggaagcc gcggcccccgc gcccggagcg cccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg	3600
cctactagag cccgcccgc当地 cccctccccca cccggccggcg ccccgccct gaaccgc当地	3660
cccacatttc tgtcctctgc gctgggtttt attgtttata tttcattgt aatgcctgc当地	3720
acccagggca gggggctgag accttccagg ccctgaggaa tcccccgc当地 cggcaaggcc	3780
cccctcagcc cgccagctga ggggtcccac ggggc当地gggg agggaaattga gagtcacaga	3840
cactgagcca cgc当地cccg cctctggggc cgc当地ccctt tgctggccc当地 acttcagagg	3900
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgc当地 ggggttttaa gggagcggtg tgggagtg	3960
aaagtccagg gactggtaa gaaagttgga taagattccc ccttc当地ccct cgctgccc当地	4020
cagaaagcc gaggcgtgcc cagagcacaa gactggggc aactgttagat gtggtttcta	4080
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct cttc当地ggac	4140
ctcaatttcc actttgtaaa atgagggtgg aggtggaaat aggatctcg a gggactatt	4200
ggcatatgat tccaaggact ccagtgc当地 ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga	4260
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattt attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca	4320
gagttgtgat gctctttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa	4380
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgc当地aaatc cccy当地yaaat gctatgc当地	4440
ttcccagcc ggcttccccc当地 gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa	4500
catcatccat tgggttagaa aaggagaggg tccgagggtg gtgggagggg tagaaatcac	4560
atccgccccca acttccaaa gagcagcatc cctccccc当地 cccatagccca tgttt当地aaag	4620
tcacccctccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca	4680
gccatcacaa actcacagac cagcacatcc ctttgc当地ac accgc当地cttct gcccaccact	4740

cacggacaca	tttctgccta	gaaaacagct	tcttactgct	cttacatgtg	atggcatatc	4800
ttacactaaa	agaatattat	tggggaaaa	actacaagtg	ctgtacatat	gctgagaaac	4860
tgcagagcat	aatagctgcc	acccaaaaat	cttttgaaa	atcatttcca	gacaacctct	4920
tactttctgt	gtagtttta	attgtaaaa	aaaaaaaaagtt	ttaaacagaa	gcacatgaca	4980
tatgaaagcc	tgcaggactg	gtcgaaaa	tggcaattct	tccacgtggg	acttgtccac	5040
aagaatgaaa	gtagtggtt	ttaaagagtt	aagttacata	tttattttct	cacttaagtt	5100
atttatgcaa	aagttttct	tgttagagaat	gacaatgtt	atattgctt	atgaattaac	5160
agtctgttct	tccagagtcc	agagacattg	ttaataaaga	caatgaatca	tgaccgaaag	5220
gatgtggtct	cattttgtca	accacacatg	acgtcatttc	tgtcaaagtt	gacacccttc	5280
tcttggtcac	tagagctcca	accttggaca	cacccttgc	tgcctctgg	tggcccttgt	5340
ggcaattatg	tcttccttt	aaaagtcatg	tttattccct	ccttccaaa	cccagaccgc	5400
atttcttcac	ccagggcatg	gtaataaacct	cagccttgc	tccttttagc	agcctcccc	5460
ccatgctggc	ttccaaaatg	ctgttctcat	tgtatca	ccctgctcaa	aagccttcca	5520
tagctcccc	ttgcccagga	tcaagtgcag	tttccctatc	tgacatggg	ggccttctct	5580
gcttgactcc	caccccccac	tccaccaagc	ttcctactga	ctccaaatgg	tcatgcagat	5640
ccctgcttcc	ttagttgcc	atccacactt	agcacccca	ataactaatc	ctctttcttt	5700
aggattcaca	ttacttgc	tctctccccc	taaccttcca	gagatgttcc	aatctcccat	5760
gatccctctc	tcctctgagg	ttccagcccc	ttttgtctac	accactactt	tggttctaa	5820
ttctgtttt	catttgcac	tcattcatgg	aggaccagcc	tggccaagtc	ctgcttagta	5880
ctggcataga	caacacaaag	ccaagtacaa	ttcaggacca	gctcacagga	aacttcatct	5940
tcttcgaagt	gtggatttga	tgcctctgg	gtagaaatgt	aggatctca	aaagtgggccc	6000
agcctctgc	acttctctca	aagtctcgcc	tcccaaggt	gtcttaatag	tgctggatgc	6060
tagctgagtt	agcatctca	gatgaagagt	aaccctaaag	ttactctca	gttgcctcaa	6120
ggtgggatgg	tcaactggaa	agctttaaat	taagtccagc	ctaccttggg	ggaacccacc	6180
cccacaaaaga	aagctgaggt	ccctcctgat	gacttgcag	tttaactacc	aataacccac	6240
ttgaattaat	catcatcatc	aagtcttgc	taggtgttag	tgggtatcag	tggccggtcc	6300
cttccctgggg	ctccagcccc	cgaggaggcc	tcagtgcag	cctgcagaaa	atccatgcat	6360
catgagtgtc	tcagggccca	gaatatgaga	gcaggttagga	aacagagaca	tcttccatcc	6420
ctgagaggca	gtgcggtcca	gtgggtgggg	acacgggctc	tgggtcaggt	ttgtgttgg	6480
tgtttgttt	ttttgagaca	gagtctcgct	ctattgc	ggctggagtg	cagtgtcaca	6540
atctcggctt	actgcaactt	ctgccttccc	ggattcaagt	gattctcctg	cctcagcctc	6600
cagagtagct	gggattacag	gtgcgtgcca	ccacgcctgg	ctaaattttt	tatTTTGT	6660
agagacgggg	tttcaccatg	ttggccaggg	tagtctcgaa	ctcttgacct	caagtgtatct	6720
gcctgcctcg	gcctccaaa	gtgctgggat	tacaggcgtg	agccaccaca	cccagcccc	6780
ggttggtgtt	tgaatctgag	gagactgaag	caccaagggg	ttaaatgttt	tgcccacagc	6840
catacttggg	ctcagttcc	tgccttaccc	ctcacttgc	ctgcttagaa	cctgggtggc	6900

acatgggcaa	taaccaggc	acactgttt	gtaccaagt	ttatggaa	ccaagatagg	6960
agtaatttgc	tctgtggagg	ggatgaggga	tagtggttag	ggaaagcttc	acaaagtggg	7020
tgttgcttag	agatttcca	ggtggagaag	ggggcttcta	ggcagaaggc	atagcccaag	7080
caaagactgc	aagtgcatt	ctgctcatgg	gtagaagaga	atccaccatt	cctcaacatg	7140
taccgagtcc	ttgccatgt	caaggcaaca	tggggtacc	aggaattcca	agcaatgtcc	7200
aaaccttaggg	tctgcttct	gggacctgaa	gatacaggat	ggatcagccc	aggctgcaat	7260
cccattacca	cgagggggaa	aaaaaacctga	aggctaaatt	gtagtcggg	ttagaggtt	7320
tttatggaaa	gttatattct	acctacatgg	ggtctataag	cctggcgcca	atcagaaaag	7380
gaacaaacaa	cagaccttagc	tgggggggc	agcatttgt	tgtagggggc	ggggcacatg	7440
ttctgggggt	acagccagac	tcagggcttg	tattaatagt	ctgagagtaa	gacagacaga	7500
gggatagaag	gaaataggc	ccttctctc	tctctctc	tctctctc	actctctctc	7560
tctctcacac	acacacacag	acacacacac	acgctctgta	ggggctact	tatgctccaa	7620
gtacaaatca	ggccacattt	acacaaggag	gtaaaggaaa	agaacgttgg	aggagccaca	7680
ggacccaaa	attccctgtt	ttccttgaat	caggcaggac	ttacgcagct	gggaggggtgg	7740
agagcctgca	gaagccacct	gcgagtaagc	caagttcaga	gtcacagaca	ccaaaagctg	7800
gtgccatgtc	ccacacccgc	ccacctccca	cctgctcctt	gacacagccc	tgtgctccac	7860
aacccggctc	ccagatcatt	gattatagct	ctggggcctg	caccgtcctt	cctgccacat	7920
ccccacccca	ttcttggAAC	ctgcccctg	tcttctccct	tgtccaaggg	caggcaaggg	7980
ctcagctatt	gggcagctt	gaccaacagc	tgaggctct	tttgtggctg	gagatgcagg	8040
aggcagggga	atattcctct	tagtcaatgc	gaccatgtgc	ctggttgcc	cagggtggc	8100
tcgtttacac	ctgttaggcca	agcgtat	ttaacagctc	ccacttctac	tctaaaaat	8160
gaccaatct	gggcagtaaa	ttatatggtg	cccatgtat	taagagctgc	aacttgctgg	8220
gcgtgggtggc	tcacacctgt	aatcccagta	ctttggacg	tcaaggcggg	tggatcacct	8280
gaggtcacga	gttagagact	ggcctggcca	gcatggcaaa	acccatctt	tactaaaaat	8340
acaaaaatta	gcaaggcatg	gtggcatgca	cctgtaatcc	caggtactcg	ggaggctgag	8400
acaggagaat	ggcttgaacc	caggaggcag	agggtgcagt	gagccaagat	tgtgccactg	8460
ccctccagcc	ctggcaacag	agcaagactt	catctcaaaa	aaaaaggat	actgtcaatc	8520
actgcaggaa	gaacccaggt	aatgaatgag	gagaagagag	gggctgagtc	accatagtgg	8580
cagcaccgac	tcctgcagga	qaggcgagac	actgggtcat	gggtactgaa	gggtgcctc	8640
aatgacgttc	tgcttttagag	accgaacctg	agccctgaaa	gtgcatgcct	gttcatgggt	8700
gagagactaa	attcatcatt	cottggcagg	tactgaatcc	tttcttacgg	ctgcccctcca	8760
atgccaatt	tccctacaat	tgtctgggt	gcctaagctt	ctgcccacca	agagggccag	8820
agctggcagc	gagcagctgc	aggtaggaga	gataggtacc	cataaggag	gtgggaaaga	8880
gagatggaag	gagaggggtg	cagagcacac	accccccctg	cctgacaact	tcctgagggc	8940
tggtcatgcc	agcagattt	aggcggaggc	aggggagatg	ggcggggaga	ggaagtgaaa	9000
aaggagaggg	tggggatgga	gaggaagaga	gggtgatcat	tcattcattc	cattgctact	9060

- 179 -

	gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt	9120
	ggagcctcat ggagctcaca gggagtgcgt gcaaggagat ggataatgga cgataacaa	9180
	ataaacattt agtacaatgt ccggaaatgg aaagttctcg aaagaaaaat aaagctggtg	9240
	agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag	9300
	c	9301
	<210> 19	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
10	 	
	<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	

- 180 -

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

- 181 -

<210> 25  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador para PCR  
  
<400> 25  
10 **gcactggccg gagcacacc** 19  
  
<210> 26  
<211> 39  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador para PCR  
  
20 <400> 26  
      **gtcgtcggat ccatgggtg gcaggcgttc aagaatgt** 39  
  
<210> 27  
<211> 57  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador para PCR  
30 <400> 27  
      **gtcgtaaagc ttctacttgt catcgccctt gtatcgtag gcgttctcca gtcggc** 57  
<210> 28  
<211> 29  
35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

5 <400> 28  
gacttggatc ccaggggtgg caggcgttc 29

<210> 29

<211> 29

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

15 <400> 29  
agcataagct tctatgttaggc gttctccag 29

<210> 30

<211> 29

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

25 <400> 30  
gacttggatc cgaagggaaa aagaaagg 29

<210> 31

<211> 29

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

- 183 -

<223> Cebador para PCR

<400> 31  
agcataagct ttaatccaa atcgatgga 29

5 <210> 32  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador para PCR

15 <400> 32  
actacgagct cggccccacc acccatcaac aag 33

<210> 33  
<211> 34  
<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador para PCR

25 <400> 33  
acttagaagc tttagtccct cagccccctc ttcc 34

<210> 34  
<211> 66

30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador para PCR

35

- 184 -

<400> 34  
aatctggatc cataacttcg tatacgatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg 60  
gccccct 66

.

5 <210> 35  
<211> 82  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador para PCR

<400> 35  
aatctgaatt ccacccgtgt taatcaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta 60  
tagatctaga gtcaggttct ga 82

15 <210> 36  
<211> 62  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador para PCR

<400> 36  
at taggtga cactatagaa ctgcgcgcgc tgaagcttaa ccacatggtg gtcacaacc 60  
at 62

25 <210> 37  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador para PCR

<400> 37

	aacgacggcc	agtgaatccg	taatcatggc	catgctgcc	ggtggaggag	ggca	54
	<210>	38					
	<211>	31					
5	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia Artificial					
	<220>						
	<223>	Cebador para PCR					
10							
	<400>	38					
	attaccacccg	gtgacacccg	cttcctgaca	g	.	.	31
	<210>	39					
	<211>	61					
15	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia Artificial					
	<220>						
	<223>	Cebador para PCR					
20							
	<400>	39					
	attacttaat	taaacatggc	gcccataatg	gccggccct	aattgcggcg	catcgtaat	60
	t						61
	<210>	40					
25	<211>	34					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia Artificial					
	<220>						
30	<223>	Cebador para PCR					
	<400>	40					
	attacggccg	gccgcaaagg	aattcaagat	ctga	.	.	34

- 186 -

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

5

<220>  
<223> Cebador para PCR

<400> 41

10

attacggcgc gccccctcaca 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, 5 o 15 con una  $K_a$  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, 10 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 15 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, 20 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 25 cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a dicha proteína con una  $K_a$  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 30  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$ , o  $Fv$ .

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 reivindicación 9, que es ratón o humano.  
5
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 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es policlonal.  
10
13. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo o fragmento de clase IgG.
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
15. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento IgE, IgM o IgA.  
20
16. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está conjugado a una molécula efectora o informadora.
17. El anticuerpo de la reivindicación 16 donde el anticuerpo o fragmento está conjugado a un polímero.  
25
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 anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.  
30

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 5 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 10 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 15 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 20 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 30 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.

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 distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria u osteomalacia.

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

32. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la  
25 reivindicacion 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.

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

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

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 une 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 AEGKKKGSGQ		
human_cerberus.pro	EEKPDLFVAV PHLVAT.SPA GEGQRQREKM LSRFGRFWKK PEREMHPSRD		
human_dan.pro	-----		-----
human_beer.pro	-----		-MQLPLA LCLVCLLVHT
	101		150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ HNDSEQTQSP QQPGSRNRGR GQGRGTAMPG EEVLESSQEA		
human_cerberus.pro	SDSEPFPPGT QSLIQPID.G MKMEKSPLE EAKKFWHFM FRKTPASQGV		
human_dan.pro	-----		MLRVLVGAVL PAMLLAAPPP
human_beer.pro	AFRVVEGQGW QAFKNDATEI 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 AKPVTELVCs GQCGPARLLP		
		↓	
	201	↓	250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ SCSF...CKP KKFTTMMVTL NCPELQPPTK K.KRVTRVKQ		
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT SCSH...CLP AKFTTMHLPL NCTELSSVIK V...VMLVEE		
human_dan.pro	TFPQSTESLV HCDS...CMP AQSMWEIVTL ECPGHEEVPR VDKLVEKILH		
human_beer.pro	NAIGRGKWWR PSGPDFRCIP DRYRAQRVQL LCPGGEAPRA RKVRLVAS..		
		↓	
	251	↓	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 PRPRARSABA 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

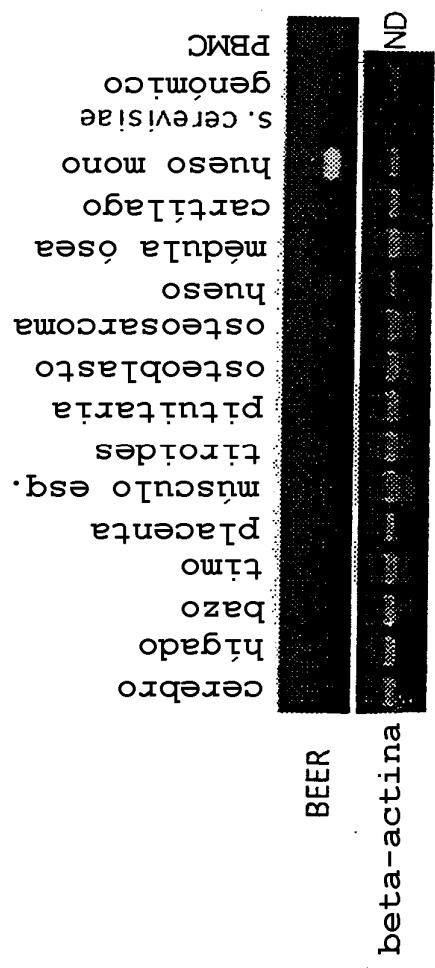
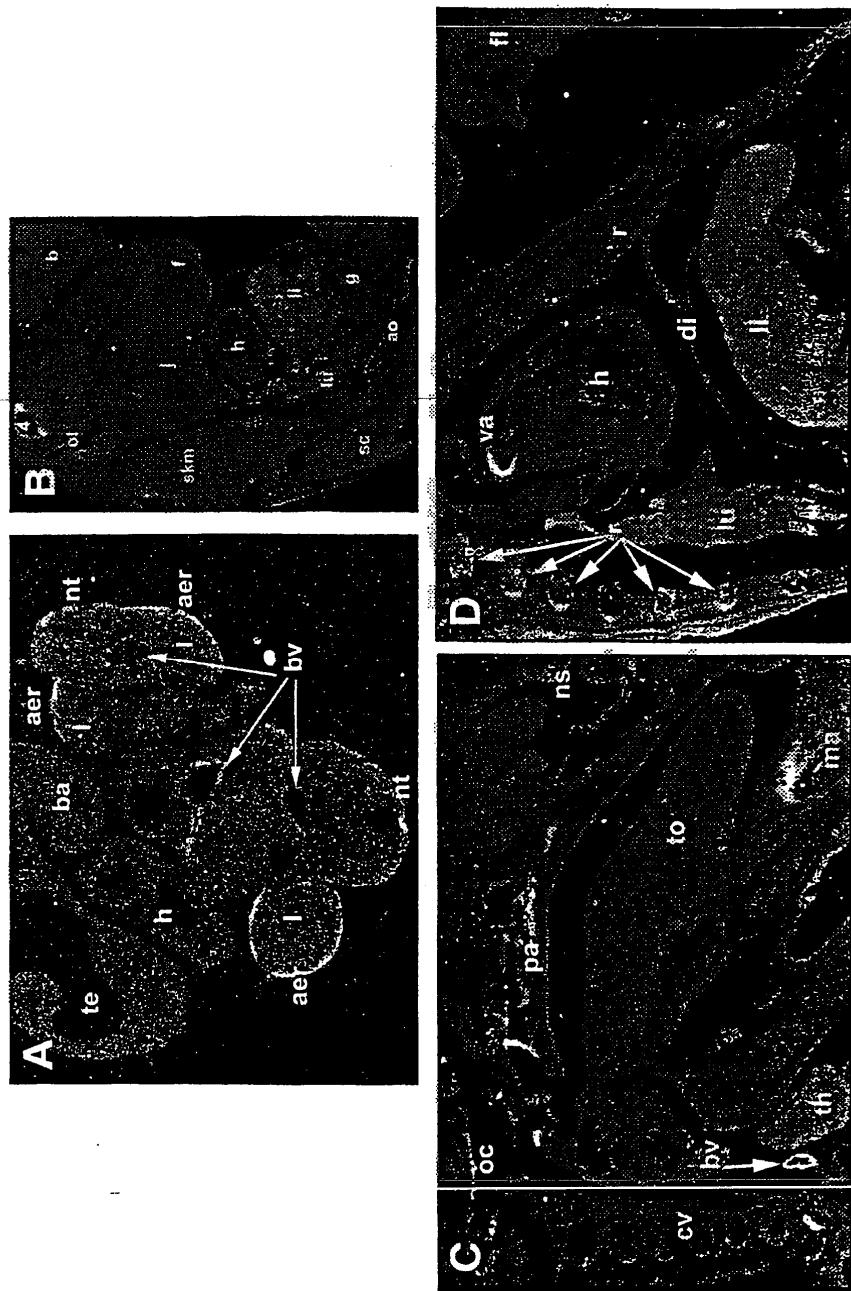


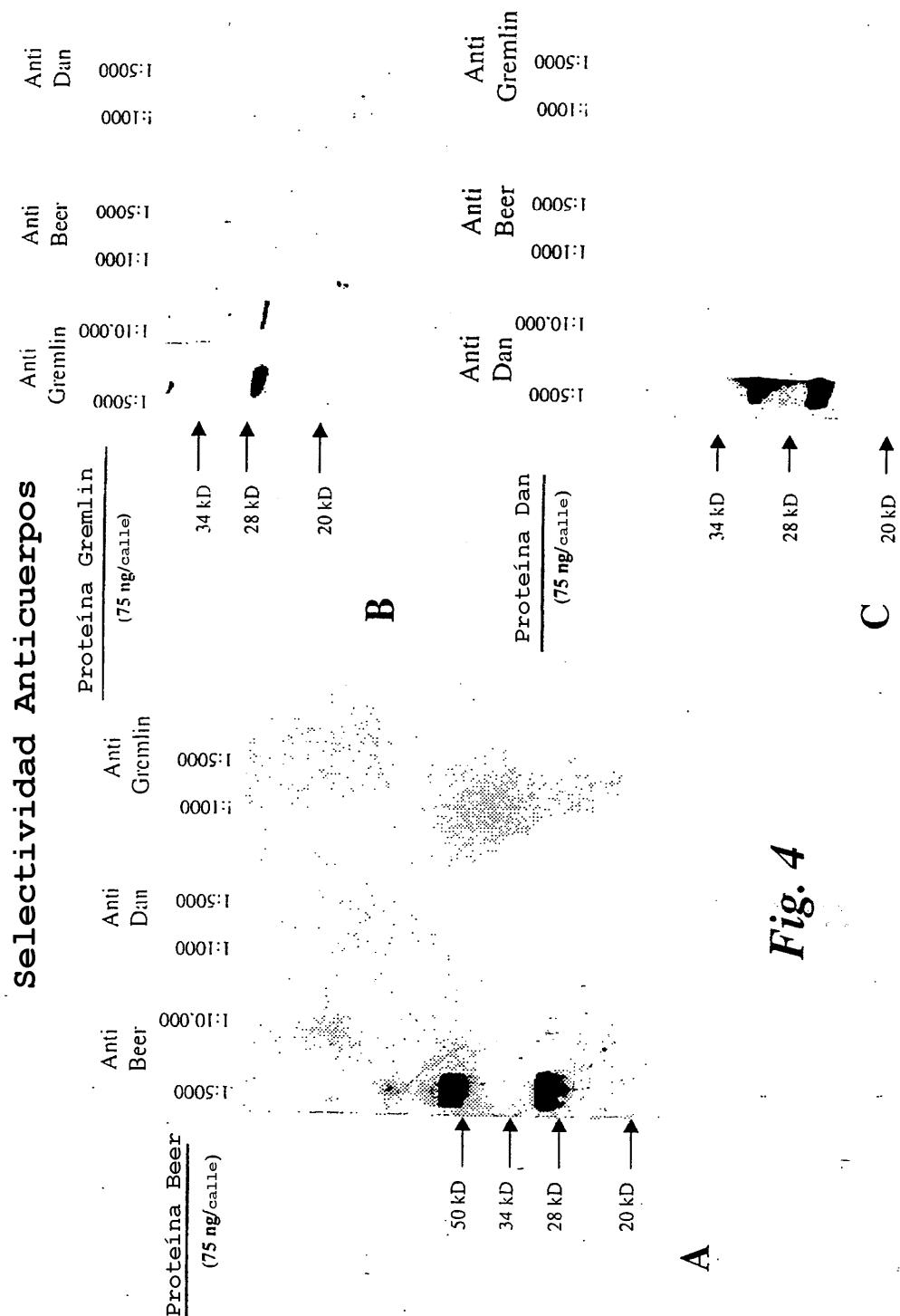
Fig. 2

Hibridación In Situ de ARN de Secciones de Embrión de Ratón

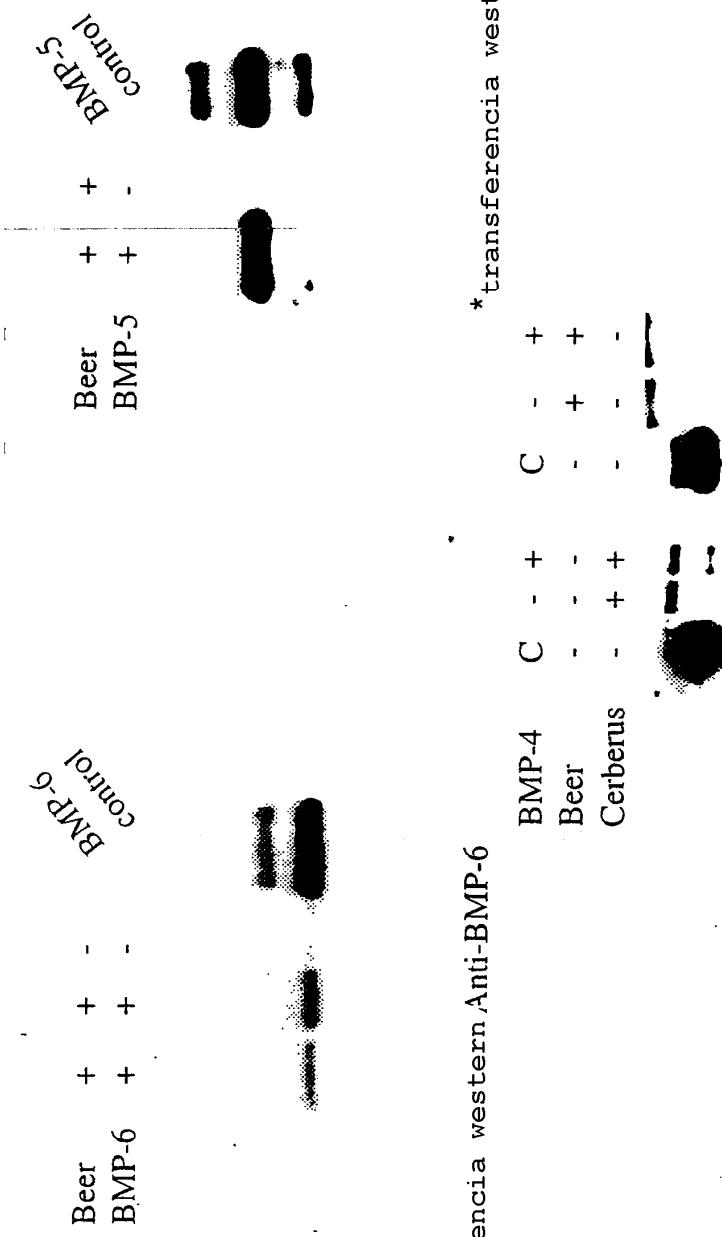


*Fig. 3*

- 195 -

**Fig. 4**

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



\*transferencia western Anti-BMP-6

\*transferencia western Anti-BMP-5

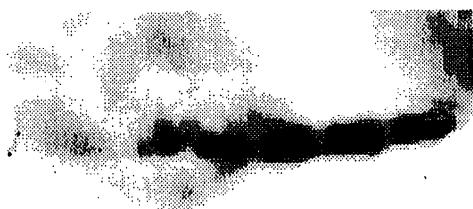
\*transferencia western Anti-BMP-4

**Fig. 5**

- 197 -

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

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



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

## Desorganización Iónica de la Unión BMP-5/Beer

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



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

*Fig. 6*