



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 556**

51 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02751022 .1**
86 Fecha de presentación : **13.06.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1395834**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **Procedimiento de screening empleando BNPI y DNPI.**

30 Prioridad: **13.06.2001 DE 101 28 541**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

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

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

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de screening empleando BNPI y DNPI.

5 La invención se refiere a un procedimiento para encontrar sustancias reguladoras del dolor utilizando BNPI y/o DNPI.

Existen diferentes medicamentos para la terapia del dolor, por ejemplo ácido acetilsalicílico, paracetamol, dipiridona, tramadol, morfina y fentanilo, pero también se utilizan sustancias tales como amitriptilina y cetamina para el tratamiento del dolor en pacientes. Sin embargo, a pesar de que los esquemas terapéuticos son cada vez más refinados, con frecuencia no se puede ofrecer una mejoría duradera a los pacientes, sobre todo en caso de estados de dolor crónico. Una de las causas de ello, entre otras, se basa en las modificaciones permanentes que se producen en las neuronas afectadas en casos de dolor crónico.

15 La investigación del dolor en los últimos años ha aportado el conocimiento básico de que, precisamente tras el desarrollo de estados de dolor crónico, subyacen modificaciones plásticas del sistema nervioso, en particular en las neuronas nociceptivas de los ganglios del asta dorsal y en las neuronas de la región del asta dorsale de la médula espinal (como sinopsis véase: Coderre y col., 1993; Zimmermann & Herdegen, 1996). La plasticidad neuronal va acompañada de modificaciones en la expresión de determinados genes y conduce a una modificación persistente del fenotipo de las neuronas afectadas. Hasta ahora, el concepto de plasticidad neuronal se había aplicado principalmente en procesos de desarrollo, aprendizaje y regeneración, pero los nuevos hallazgos de la investigación del dolor muestran que este concepto también es aplicable en caso de procesos fisiopatológicos (Tölle, 1997).

25 La cronificación del dolor ya se ha caracterizado relativamente bien a nivel fenomenológico mediante la experimentación animal. La inducción de estados de dolor crónico conduce a las siguientes modificaciones:

- Aumento de la sensibilidad y disminución del umbral de estimulación de nociceptores periféricos.
- Activación de los denominados nociceptores silenciosos.
- Reorganización de campos receptores.
- Aumento de la excitabilidad en la médula espinal.

35 Se han descrito estas modificaciones plásticas tanto en el caso de las fibras nerviosas aferentes primarias que se encuentran en los ganglios como en el caso de las neuronas posteriores localizadas en la médula espinal, y se presume que también se producen en regiones supraespinales, por ejemplo en el tálamo. De forma análoga a los mecanismos descritos para los procesos de aprendizaje y la memoria, es de suponer que en las células afectadas se desarrolla un programa genético específico que incluye la regulación coordinada de genes relevantes cuya expresión contribuye después decisivamente a la manifestación fisiopatológica del dolor crónico.

45 Por ello, el punto de partida de la invención consistía en la identificación de este tipo de genes regulados por el dolor, cuya expresión se modifica bajo condiciones de dolor y que, por consiguiente, probablemente intervienen en la generación y el procesamiento de dolores crónicos principalmente, a través de sus relaciones de regulación.

Por ejemplo, el documento WO 98/26054 describe un procedimiento para el tratamiento de un organismo con una enfermedad o un trastorno de la vía de transducción de señales en la que está implicada una proteína PKY2. El documento WO 98/26054 también indica procedimientos para el diagnóstico y el screening de principios activos para el tratamiento de estos trastornos o enfermedades. Los inhibidores de PKY2 identificados a través de un procedimiento de screening de este tipo se pueden utilizar, entre otros fines, para tratar la epilepsia, la esquizofrenia, la hiperactividad extrema en niños, el dolor crónico y agudo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, enfermedades neurodegenerativas y la migraña.

55 El documento WO 96/34288 da a conocer un cotransportador dependiente de Na⁺ y aislado de tejido neuronal para fosfato inorgánico (hBNPI). El documento WO 96/34288 también da a conocer un procedimiento en el que se utiliza hBNPI para el screening de compuestos de ensayo en relación con su eficacia para estimular hBNPI. El documento WO 96/34288 no describe ningún procedimiento para el screening de compuestos relevantes para el dolor.

60 Ya se ha demostrado una regulación en diferentes modelos de dolor para una serie de genes conocidos (véase la Tabla 1), por ejemplo para neurotransmisores (sustancia P, CGRP), receptores (sustancia p-receptor, receptores opiáceos μ , κ , δ , receptor NMDA) y factores de transcripción (cJun, JunB, cFos o Krox24). El hecho de que dichos receptores ya sean utilizados como objetivos moleculares para el desarrollo de nuevos analgésicos (Dickenson, 1995) indica claramente que la identificación de nuevos genes regulados por el dolor también tiene un gran interés para el desarrollo de analgésicos, en particular para los procedimientos de screening correspondientes. La idea central consiste en interrumpir el desarrollo o la persistencia del dolor, principalmente de tipo crónico, influyendo en la función de aquellas proteínas cuya formación aumenta o disminuye en estados de dolor.

TABLA 1

Regulación de genes/productos génicos conocidos en modelos de dolor animal

Gen (producto)	Reg	Tejido/Célula	Modelo	Bibliografía
(a) Neurotransmisores				
CGRP	↑	Asta dorsal ME	Irradiación de la piel con UV	Gillardon F y col. (1992) Ann NY Acad Sci 657: 493-96
Preprotaquiquinina y CGRP-mRNA	↑	DRG	Monoartritis	Donaldson LF y col. (1992) Mol Brain Res 16: 143-49
Preprotaquiquinina-mRNA	↑	Asta dorsal ME	Formalina	Noguchi & Ruda (1992) J Neurosci 12: 2563-72
Prodinorfina-mRNA	↑	Médula espinal	Artritis exp.	Höllt y col. (1987) Neurosci Lett 96: 247-52
Prot. dinorfina	↑	Médula espinal	Formalina	Ruda y col. (1988) PNAS 85: 622-26
Sustancia P	↑	Nociceptores	Artritis exp.	Levine JD y col. (1984) Science 226: 547-49
(b) Neurotrofinas				
BDNF-mRNA e inmunorreactividad	↑	DRG: trkA + células	Iny. NGF i. th.	Michael GC y col. (1997) J Neurosci 17: 8476-90
(c) Receptores				
Unión μ , κ , δ	↓ ↑	Asta dorsal ME	Monoartritis	Besse D y col. (1992) Eur J Pharmacol 223:123-31
Inmunorreactividad de receptor opiáceo μ	↑	DRG	Inflamación ind. por	Ji R-R y col. (1995) J Neurosci 15: 8156-

ES 2 288 556 T3

5	mRNA de receptor opiáceos κ y δ	⇓	DRG	carragenina Inflamación ind. por carragenina	66 Ji R-R y col. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
10	mRNA de receptor opiáceos κ y μ	↑↑	Asta dorsal ME	Monoartritis	Maekawa K y col. (1995) Pain 64:365-71
15	mRNA de receptor - CCK _B	↑↑	DRG	Axotomía	Zhang X y col. (1993) Neuroscience 57: 227-233
20	NMDA-R1-mRNA	⇓	Asta dorsal ME Láminas I y II	Inflamación inducida por CFA	Kus L y col. (1995) Neuroscience 68: 159-65
25	(d) Enzimas Actividad de NADPH-diaforasa	↑↑	Asta dorsal ME	Transección isquiática	Fiallos-Estrada y col. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
30	NADPH-diaforasa	↑↑	Médula espinal	Formalina	Solodkin y col. 1992 Neurosci 51: 495-99
35	mRNA-NO-sintasa	↑↑	DRG	Axotomía	Verge VMK y col. (1992) PNAS 89: 11617-62
40	Proteína NO-sintasa	↑↑	Asta dorsal ME	Formalina	Herdegen y col. (1994) Mol Brain Res 22:245-58
45	Inmunorreactividad de NO-sintetasa	↑↑	DRG	Transección isquiática	Fiallos-Estrada y col. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
50	(e) Cascada de señales mRNA rap1A, rap1B, H-ras	↑↑	Médula espinal	Formalina	Urayama O y col. (1997) Mol Brain Res 45: 331-34
55	Unión PKC	↑↑	Asta dorsal ME	Monoartritis inducida por CFA	Tölle TR et al (82) J Neurol 242(S2): 135
60	(f) F. de transcripción cFOS	↑↑	Médula espinal	Estimulación por noxa	Hunt SP y col. (1987) Nature 328: 632-34
65	cJun, JunB, cFOS Krox24	↑↑	Asta dorsal ME	Formalina	Herdegen y col. (1994) Mol Brain Res 22:245-58

ME = médula espinal; DRG = Dorsal Root Ganglia; CFA = Complete Freund Adjuvans; NGF = Nerve Growth Factor.

Por consiguiente, el objetivo principal de la invención consistía en desarrollar un procedimiento de screening para identificar sustancias relevantes para el dolor, en particular sustancias reguladoras del dolor. En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para descubrir sustancias reguladoras del dolor, que incluye los siguientes pasos:

- (a) incubación de una sustancia a ensayar bajo condiciones adecuadas con una biomolécula del grupo I: proteína BNPI o DNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f), 1h), 2b), 2d) o 2f) y/o una proteína similar a éstas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g), 2a), 2c) o 2e) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g), 2a), 2c) o 2e) o a sus polinucleótidos antisentido, y/o una célula y/o un preparado celular que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas anteriormente mencionadas;
- (b) medida de la unión de la sustancia de ensayo a la proteína o proteína parcial sintetizada por la célula, o medida de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia de ensayo a la proteína, midiendo la regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales de iones y/o enzimas, en particular midiendo la modificación de la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, modificando la actividad enzimática o la concentración del 2° mensajero, o midiendo la unión a través del desplazamiento de un ligando marcado conocido de la proteína y/o a través de la actividad relacionada de una sustancia de ensayo marcada.

Este nuevo procedimiento de screening se basa en la posibilidad de hallar la eficacia potencial contra el dolor de una sustancia a través de su interacción con una estructura de proteína regulada por el dolor, BNPI o DNPI o estructuras derivadas.

En este contexto, el concepto “regulador del dolor” se refiere a una potencial influencia reguladora sobre el dolor fisiológico, en particular a un efecto analgésico. El término “sustancia” incluye cualquier compuesto adecuado como principio activo medicamentoso, es decir, sobre todo principios activos de bajo peso molecular, pero también otros como ácidos nucleicos, grasas, azúcares, péptidos o proteínas como anticuerpos.

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

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

Las proteínas aquí enumeradas se han identificado en el marco de esta invención como proteínas reguladas por el dolor o distribuidas de forma relevante para el dolor mediante el método consistente en provocar dolor en un animal y, después de un tiempo adecuado, mediante cortes en la médula espinal, comparar el patrón de expresión del animal con el de un animal control no sometido a medidas de provocación de dolor. Las proteínas expresadas de forma modificada halladas mediante este procedimiento son BNPI y, en particular, en relación con la distribución relevante para el dolor, DNPI.

La especie de procedencia de estas proteínas carece de importancia para la función del procedimiento, pero es preferible utilizar la variante humana, de ratón o de rata. El BNPI y el DNPI son conocidos en cuanto a la secuencia de DNA codificadora y la secuencia de aminoácidos, y también se ha descrito su función general. El BNPI, el “cotransportador de fosfato inorgánico Na⁺-dependiente cerebral”, se describe en el documento WO 96/34288, y el DNPI, el “cotransportador de fosfato inorgánico Na⁺-dependiente asociado por diferenciación” se ha descrito en Aihara y col. (2000), J. Neurochem. 74, 2622-2625.

Sin embargo, hasta ahora en el estado actual de la técnica ninguno de estos transportadores había sido relacionado con el dolor y en particular con la regulación del dolor. Como la identificación de las proteínas se ha llevado a cabo aquí a través de una modificación de la expresión o de la distribución de la expresión en un modelo de dolor *in vivo*, para los futuros medicamentos producidos con estas proteínas, el procedimiento de screening según la invención derivado

de ellas tiene la notable ventaja de no estar basado exclusivamente en razonamientos teóricos, sino que probablemente posee una gran relevancia *in vivo*. Dado que este procedimiento posibilita la interacción de las sustancias con proteínas y péptidos no utilizados hasta la fecha en el campo del dolor como escala para la localización de sustancias reguladoras del dolor, con este procedimiento probablemente se puedan encontrar ahora sustancias relevantes para el dolor que habrían pasado inadvertidas con los procedimientos conocidos hasta ahora en el estado actual de la técnica con otros péptidos o proteínas. Ésta es otra ventaja considerable del nuevo procedimiento según la invención.

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

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

- *Sustancia*: Este término hace referencia a un compuesto químico. Aquí se trata más concretamente de compuestos que pueden en potencia desarrollar un efecto en el cuerpo, principios activos de bajo peso molecular, ácidos nucleicos, grasas, azúcares, péptidos o proteínas, en este caso sobre todo principios activos de bajo peso molecular.

- *Regulador del dolor*: En el sentido de la invención, “regulador del dolor” significa que la sustancia influye directa o indirectamente en la percepción del dolor, en particular que actúa como analgésico de forma natural.

- *Dolor*: En el sentido de la invención, “dolor” significa principalmente una sensación de dolor, más concretamente dolor agudo, crónico, neuropático e inflamatorio, incluyendo migraña, en particular un dolor perteneciente a los siguientes tipos:

dolor crónico, en particular dolor musculoesquelético; dolor neuropático, en particular dolor alodí-nico, hiperalgesia mecánica o neuropatía diabética; dolor visceral, dolor cerebral, dolor periférico o dolor condicionado por la inflamación, en particular dolor inflamatorio periférico; y también migraña, cefalea agrupada o dolor en casos de neuralgia del trigémino.

- *Incubación*: Por “incubación” se entiende que un objeto de estudio biológico, por ejemplo una célula o una proteína, se introduce y se deja en un medio a temperatura regulada, por ejemplo en una estufa incubadora o sobre un baño de agua. En este contexto, por el concepto “condiciones adecuadas” se entiende una incubación bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo 37°C, pH 7,2) o bajo las condiciones que posibilitan una medida óptima en el procedimiento.

- *Célula*: La célula es un sistema autorregulado, abierto, que se encuentra en un equilibrio dinámico con su entorno mediante intercambio permanente de materiales, con metabolismo propio y capacidad de reproducción. La célula se puede cultivar por separado o formar parte de un tejido, en particular de un órgano, y encontrarse en éste aislada o todavía como una agrupación celular.

- *Preparado celular*: Por este concepto se entienden preparados producidos mediante métodos químicos, biológicos, mecánicos o físicos con modificación de la estructura celular, por ejemplo fragmentos de membrana, compartimentos celulares aislados, citosol aislado o material homogeneizado obtenido de tejido.

- *Péptido*: Compuesto de aminoácidos unidos en cadenas a través de enlaces peptídicos. Un oligopéptido consiste en 2 a 9 aminoácidos, un péptido consiste en 10 a 100 aminoácidos.

- *Proteína*: Compuesto de más de 100 aminoácidos unidos en cadenas mediante enlaces peptídicos, eventualmente con una estructura espacial definida.

- *PIM1-quinasa; PIM3-quinasa*: Un proto-oncogén y una serina-treonina-quinasa.

ES 2 288 556 T3

- *Polinucleótido*: El nucleótido que sirve de base es un componente básico de los ácidos nucleicos, que consiste fundamentalmente en una base de nucleína, pentosa y ácido fosfórico. Corresponde a un polinucleótido de alto peso molecular formado por varios nucleótidos unidos entre sí a través de la esterificación de una ácido fosfórico-pentosa. No obstante, en esta invención dicho concepto también incluye polinucleótidos modificados que, si bien conservan la sucesión de bases, disponen de un esqueleto modificado en lugar de la ácido fosfórico-pentosa.
- *Similar como mínimo en un 90 (95,97)%*: Este concepto significa que la sucesión de bases de la región codificadora de los polinucleótidos incluidos es idéntica a la referencia (figura, etc.) en como mínimo un 90% (95%,97%), y que la sucesión de los aminoácidos de la estructura primaria de los péptidos y proteínas incluidos es idéntica a la referencia en como mínimo un 90% (95%,97%).
- *Gen*: Con el término “gen” se designa una sección de genoma con una secuencia de nucleótidos definida que incluye la información para la síntesis de un mRNA o un pre-mRNA o de un RNA de otro tipo (por ejemplo tRNA, rRNA, snRNA, etc.). Consiste en secciones codificadoras y no codificadoras.
- *Fragmento de gen*: Sección de ácido nucleico que incluye en su sucesión de bases una región parcial de un gen.
- *Unión al péptido o proteína*: Interacción entre la sustancia y el péptido o proteína que conduce a la fijación.
- *Parámetros funcionales*: Por este concepto se entienden magnitudes de medida de un experimento que están en correlación con la función de una proteína (canal iónico, receptor, enzima).
- *Manipulado por ingeniería genética*: Manipulación de células, tejidos u organismos de tal modo que se introduce material genético en los mismos.
- *Expresado de forma endógena*: Expresión de una proteína que presenta una línea celular bajo condiciones de cultivo adecuadas, sin que dicha expresión de la proteína haya sido inducida mediante manipulación por ingeniería genética.
- *Proteína G*: Abreviatura internacional habitual para una proteína que se une a guanosin-trifosfato (GTP), que se activa como proteína de señal a través de receptores acoplados a la proteína G.
- *Gen indicador*: Designación general para genes cuyos productos genéticos se pueden comprobar fácilmente con ayuda de sencillos métodos bioquímicos o histoquímicos, por ejemplo luciferasa, fosfatasa alcalina o *Green Fluorescent Protein* (GFP) (proteína fluorescente verde).
- *Constructo de DNA (recombinante)*: Designación general para todo tipo de moléculas de DNA formadas por ligadura *in vitro* de moléculas de DNA.
- *Vector de clonación*: Designación general para moléculas de ácido nucleico que durante la clonación actúan como portadores de genes extraños o de partes de estos genes.
- *Vector de expresión*: Designación para vectores de clonación contruidos especialmente que, después de introducirlos en una célula huésped adecuada, permiten la transcripción y traducción del gen extraño incorporado por clonación en el vector.
- *Secuencia LTR*: Abreviatura de *long terminal repeat*. Designación general para regiones de secuencia más largas que se encuentran en ambos extremos de un genoma lineal. Estas regiones de secuencia se encuentran por ejemplo en los genomas de retrovirus y en los extremos de transposones eucarióticos.
- *Cola poli-A*: Los restos adenilo (aproximadamente 20-250) fijados mediante poliadenilación en el extremo 3' de los RNA mensajeros.

ES 2 288 556 T3

- *Secuencia promotora*: Designación para una región de secuencia de DNA a partir de la cual se controla la transcripción de un gen, es decir, la síntesis de mRNA.
- 5 - *Secuencia ORI*: Abreviatura de *origin of replication*. La secuencia ORI permite que una molécula de DNA se reproduzca como una unidad autónoma en la célula.
- 10 - *Secuencia intensificadora*: Designación para elementos genéticos relativamente cortos, que se presentan en parte en forma de repeticiones y que, en general, refuerzan la expresión de algunos genes en diferente medida.
- 15 - *Factor de transcripción*: Designación para una proteína que influye en la transcripción de un gen a través de una unión a secuencias de DNA específicas.
- *Cultivar*: Mantener células o tejidos bajo condiciones de cultivo adecuadas.
- 20 - *Condiciones que permiten una expresión*: Por este concepto se entiende la selección y aplicación de condiciones de cultivo que permiten una expresión de la proteína de interés, entre las que se encuentran la modificación de la temperatura, el cambio de medio, la adición de sustancias inductoras, la supresión de sustancias inhibidoras.
- 25 - *Tiempo de incubación*: Tiempo durante el cual las células o tejidos son incubados, es decir, sometidos a una temperatura determinada.
- 30 - *Presión de selección*: Aplicación de condiciones de cultivo que proporcionan una ventaja de crecimiento a las células con un producto genético determinado, el denominado marcador de selección.
- 35 - *Célula de anfibio*: Célula de un animal de la clase de los *Amphibia*.
- *Célula bacteriana*: Célula asignable al dominio de las *Eubacterias* o *Archaeobacterias*, o procedente del mismo.
- 40 - *Célula de levadura*: Célula asignable al orden de los *Endomycetales*, o procedente del mismo.
- *Célula de insecto*: Célula asignable al orden de los *Hexapoda*, o procedente del mismo.
- 45 - *Célula de mamífero nativa*: Célula procedente de un mamífero, cuyas características relevantes corresponden a las de la célula que se encuentra en el organismo.
- 50 - *Célula de mamífero inmortalizada*: Célula que, mediante las condiciones de cultivo aplicadas o mediante manipulación por ingeniería genética, ha adquirido la propiedad de dividirse en el cultivo más allá de la frecuencia de división habitual normal (aproximadamente 100).
- 55 - *Marcado*: Hecho accesible mediante modificación o derivación correspondiente para una reacción de comprobación. Por ejemplo, radiactivo, fluorescente o luminiscente.
- 60 - *Ligando*: Sustancia que se une a una molécula que se encuentra en el cuerpo o en una célula, especialmente un receptor.
- *Desplazamiento*: Separación total o parcial de un ligando de su sitio de unión.
- 65 - *Actividad relacionada*: Valor de medida registrado bioquímica o físicamente, que está en correlación con la cantidad de ligando unida a un receptor.

ES 2 288 556 T3

- *Regulación*: La inhibición o activación de un proceso como parte de un proceso de regulación.
- *Inhibición*: Como caso especial de la regulación, el impedimento/reducción de un proceso.
- *Activación*: Como caso especial de la regulación, la intensificación de un proceso.
- *Receptores*: En el sentido más amplio, todas las moléculas presentes en el organismo procariótico o eucariótico a las que se puede unir un principio activo. Más concretamente, proteínas o complejos de varias proteínas unidos a membrana que provocan una modificación en la célula mediante la unión de un principio activo.
- *Canales de iones*: Proteínas o complejos de varias proteínas unidos a la membrana gracias a los cuales la membrana puede ser atravesada por cationes o aniones.
- *Enzimas*: Designación para proteínas o complejos de un componente activador no albuminoide con una proteína que poseen propiedades catalíticas.
- *Expresión genética (expresar/expresable)*: La traducción de la información genética de un gen en RNA (expresión de RNA) o en una proteína (expresión de proteína).
- *Medio iónico*: Concentración de uno o más iones en un compartimento determinado.
- *Potencial de membrana*: Diferencia de tensión a través de una membrana a causa de un exceso de cationes en un lado de la membrana y de aniones en el otro lado.
- *Modificación de la actividad enzimática*: Inhibición o inducción de la actividad catalítica de una enzima.
- *2º mensajero*: Molécula pequeña que se forma en el citosol o penetra en el mismo como respuesta a una señal extracelular y ayuda a transmitir la información al interior de la célula, por ejemplo cAMP, IP₃.
- *Sonda (genética)*: Designación para todo tipo de ácidos nucleicos con cuya ayuda se puede detectar un gen buscado o una secuencia de DNA determinada. Además, mediante derivación de la sonda genética (por ejemplo biotina, perlas magnéticas, digoxinina) se pueden extraer moléculas de DNA de una mezcla. Como sondas se utilizan genes clonados, fragmentos de genes, oligonucleótidos sintetizados químicamente y también RNA, que en la mayoría de los casos está marcado de forma radiactiva.
- *DNA*: Designación internacional para el ácido desoxirribonucleico.
- *DNA genómico*: Designación general para el DNA procedente del núcleo de una célula de organismos eucarióticos.
- *cDNA*: Abreviatura de *complementary DNA*. Designación para la copia de DNA de cadena simple o doble de una molécula de RNA.
- *Banco/librería de cDNA*: Designación para una colección de fragmentos de cDNA clonados de forma arbitraria, que en conjunto representan la totalidad de RNA sintetizados de una célula o un tejido.
- *Clon de cDNA*: Designación para una población de células genéticamente uniformes que se derivan de una única célula, de tal modo que esta célula contiene un fragmento de cDNA incorporado de forma artificial.

ES 2 288 556 T3

- *Hibridación*: Formación de una molécula de ácido nucleico de cadena doble a partir de dos cadenas simples independientes mediante emparejamiento de bases.

- *Condiciones estrictas*: Condiciones bajo las que sólo se forman cadenas de ácido nucleico con un emparejamiento de bases perfecto y que permanecen estables.

- *Aislar*: Localizar y separar de una mezcla una molécula buscada.

- *Secuenciación de DNA*: Determinación de la sucesión de bases en una molécula de DNA.

- *Secuencia de ácido nucleico*: Designación para la estructura primaria de una molécula de DNA, es decir, la sucesión de las bases individuales de las que está compuesto un DNA.

- *Cebador de oligonucleótido específico de gen*: Ácidos oligonucleicos, es decir, fragmentos de ácido nucleico con una longitud de 10-40 bases, que permiten, en su composición de bases, una hibridación estricta en el gen o en el cDNA buscado.

- *Descubrimiento de cebadores de oligonucleótido*: La búsqueda manual o asistida por ordenador de oligonucleótidos para una secuencia de DNA predeterminada que sean óptimamente adecuados para una hibridación y/o una reacción en cadena de la polimerasa.

- *PCR*: Abreviatura de reacción en cadena de polimerasa. Procedimiento *in vitro* para el enriquecimiento selectivo de regiones de ácido nucleico de longitud y secuencia definidas de una mezcla de moléculas de ácido nucleico.

- *DNA-molde*: Molécula de ácido nucleico o mezcla de moléculas de ácido nucleico a partir de las cuales se multiplica una sección de DNA con ayuda de una PCR (véase más arriba).

- *RNA*: Abreviatura internacional usual para los ácidos ribonucleicos.

- *mRNA*: Abreviatura internacional usual para los ácidos ribonucleicos mensajeros, que intervienen en la transferencia de la información genética del núcleo en la célula y que contienen la información para la síntesis de un polipéptido o una proteína.

- *Polinucleótido antisentido*: Molécula consistente en varios ácidos nucleicos naturales o modificados cuya sucesión de bases es complementaria a la sucesión de bases de una región parcial de un RNA presente en la naturaleza.

- *PNA*: Abreviatura internacional usual para los ácidos nucleicos peptídicos. En este contexto, los aminoácidos enlazados peptídicamente forman una cadena, portando los aminoácidos como cadena lateral una base apta para la hibridación con DNA o RNA.

- *Secuencia*: Sucesión de nucleótidos o aminoácidos. En el sentido específico de esta invención, con este término se hace referencia a la secuencia de ácidos nucleicos.

- *Ribozima*: Designación para un ácido ribonucleico catalíticamente activo (por ejemplo ligasa, endonucleasa, polimerasa, exonucleasa).

- *DNA-enzima*: Designación para una molécula de DNA que posee actividad catalítica (por ejemplo ligasa, endonucleasa, polimerasa, exonucleasa).

- *RNA/DNA catalítico*: Designación general para ribozimas o DNA-enzimas (véase más arriba).

ES 2 288 556 T3

- *Adenovirus*: Virus citopatógenos presentes en los vertebrados.
- 5 - *Virus adenoasociado (AAV)*: Forma parte de la familia de los parvovirus. Para lograr una reproducción eficaz del AAV es necesaria una coinfección de las células huésped con virus auxiliares (por ejemplo herpesvirus, virus de la vaccinia o adenovirus). La propiedad del AAV de integrarse de forma estable en el genoma huésped lo hace especialmente interesante como vector de transducción para células de mamíferos.
- 10 - *Herpesvirus*: Patógeno viral de la infección herpes.
- *Modificación postraducciona*l: Modificación en proteínas o polipéptidos realizada después de la traducción, por ejemplo fosforilación, glicosilación, amidación, acetilación o proteólisis.
- 15 - *Glicosilar*: Designación para la adición de moléculas de azúcar individuales o cadenas de azúcar completas a proteínas.
- 20 - *Fosforilar*: Designación para la adición de uno o más restos fosfato a una proteína, preferentemente a los grupos OH de los aminoácidos serina, treonina o tirosina.
- 25 - *Amidar*: Designación para la transformación de una función carboxilo en una función amida, por ejemplo en el resto aminoácido carboxi-terminal de un péptido o proteína.
- 30 - *Proveer de anclaje de membrana*: Modificación postraducciona
- 35 - *Segmentar*: En este caso específico, la segmentación de un péptido o proteína en varias subsecuencias.
- *Acortar*: Acortar en una o varias partes una molécula consistente en varias partes individuales.
- 40 - *Anticuerpos*: Proteínas solubles o unidas a membranas celulares, designadas como inmunoglobulinas, con un sitio de unión específico para antígenos.
- 45 - *Anticuerpos monoclonales*: Anticuerpos con una selectividad extremadamente alta dirigidos contra un único determinante antigénico de un antígeno.
- *Anticuerpos policlonales*: Mezcla de anticuerpos dirigidos contra varios determinantes de un antígeno.
- 50 - *Transgénico*: Modificado genéticamente.
- 55 - *Mamífero no humano*: La totalidad de los mamíferos (clase de los mammalia) excepto la especie humana.
- *Célula germinal*: Célula con genoma haploide que permite la formación de un nuevo organismo mediante fusión con una segunda célula germinal.
- 60 - *Célula somática*: Célula diploide como componente de un organismo.
- *Introducción cromosómica*: Intervención en la secuencia de nucleótidos a nivel cromosómico.
- 65 - *Genoma*: Definición general de la totalidad de todos los genes de un organismo.

ES 2 288 556 T3

- *Ascendiente del animal*: Un animal (el ascendiente) que, por transmisión de su material genético de forma natural o artificial, está emparentado en línea directa con otro animal (el descendiente).

- *Expresable*: Una molécula de ácido nucleico es expresable cuando incluye la información para la síntesis de una proteína o de un polipéptido y está provista de las secuencias reguladoras correspondientes que permiten la síntesis de esta proteína o polipéptido *in vitro* o *in vivo*. Cuando ya no se dan estas condiciones, por ejemplo por intervención en la secuencia codificadora, la molécula de ácido nucleico ya no es expresable.

- *Roedor*: Animal del orden de los *Rodentia*, por ejemplo la rata o el ratón.

- *Identificable como sustancia reguladora del dolor*: Sustancia que al ser incorporada en un organismo vivo produce un cambio de comportamiento que los especialistas designan como inhibidor del dolor (antinoceceptivo, antihiperálgésico o antialodínico). En el caso del procedimiento de screening, este concepto se refiere a que la sustancia, durante el screening, debido a una mayor unión o una provocación de una variación de un parámetro funcional, supera claramente, por ejemplo en un 100%, a la unión o la interacción de la media de las sustancias ensayadas.

- *Compuesto*: Otro nombre para una molécula consistente en varios átomos. En este caso una molécula identificable mediante el procedimiento según la invención.

- *Principio activo*: Un compuesto que al ser administrado a un organismo provoca un cambio en dicho organismo. Por este concepto se entienden principalmente moléculas sintetizadas de forma orgánico-química que tienen un efecto curativo en el organismo. En este caso se trata, en particular, de moléculas que se unen a las proteínas y los péptidos según la invención.

- *De bajo peso molecular*: Molécula con un peso molecular $< 2\text{kDa}$.

- *Medicamento*: Una sustancia correspondiente a la definición del Artículo 1 §2 de la Ley Reguladora del Tráfico de Medicamentos.

- *Diagnóstico*: Compuesto o procedimiento útil para diagnosticar una enfermedad.

- *Tratamiento del dolor*: Procedimiento destinado a mitigar o eliminar dolores, o para inhibir la aparición previsible de dolores (analgesia preventiva).

- *Dolor crónico*: Una sensación de dolor de duración prolongada, frecuentemente caracterizada porque va más allá del momento y el lugar del estímulo inicial y aumenta la sensibilidad del cuerpo al dolor.

- *Terapia genética*: Por “terapia genética” se entienden todos los procedimientos que tienen el objetivo de tratar de forma causal enfermedades genéticas mediante modificaciones adecuadas del genoma.

- *Terapia genética in vivo*: Introducción de material genético en el organismo vivo con el objetivo de la terapia genética. Se puede distinguir entre intervención somática e intervención en la línea germinal, que tienen lugar en un caso en células diploides y en otro caso en células haploides.

- *Terapia genética in vitro*: Introducción de material genético en células fuera del cuerpo humano con el fin de usar éstas posteriormente para la terapia genética introduciéndolas de nuevo en el cuerpo humano.

- *Diagnosis*: Procedimiento para identificar una enfermedad.

- *Análisis de eficacia*: Análisis para examinar la eficacia de un compuesto después de su actuación en un organismo vivo.

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

En otra forma de realización preferente, la célula se manipula por ingeniería genética de tal modo que contenga como mínimo un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g), 2a), 2c) o 2e) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%. De este modo se puede lograr, por ejemplo, que la célula sintetice una proteína que no es expresada de forma endógena en la célula o en el preparado utilizado en el procedimiento. En este contexto es especialmente preferente que el polinucleótido esté contenido en un constructo de DNA recombinante. Por el concepto “constructo de DNA (recombinante)” se entiende una molécula de DNA producida *in vitro*.

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

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

En un método de medida alternativo para determinar la unión de la sustancia a una proteína en el procedimiento según la invención, la medida de la unión tiene lugar a través del desplazamiento de un ligando marcado conocido de la proteína y/o a través de la actividad relacionada de una sustancia de ensayo marcada. El ligando es una molécula que se une con alta especificidad a la proteína y que es desplazada del sitio de unión por una sustancia a ensayar que también se une a la proteína. Por “marcado” se ha de entender una modificación artificial en la molécula que facilita la detección. Los marcados son por ejemplo radiactivos, fluorescentes o luminiscentes.

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

En este o estos procedimientos también está incluida la utilización de proteínas de secuencia y función conocidas, sin que en el estado actual de la técnica se conociera una función de las mismas en el campo del dolor.

Otra forma de realización especialmente preferente consiste en un procedimiento según la invención, en el que un primer procedimiento de los procedimientos según la invención descritos hasta el momento se acopla con un segundo procedimiento de los procedimientos según la invención descritos hasta el momento, de tal modo que los valores de medida y los resultados del primer procedimiento con respecto a la sustancia a medir se comparan con los valores de medida y con los resultados del segundo procedimiento con respecto a la sustancia a medir, caracterizado porque en el paso (a) de uno de los dos procedimientos, denominado en lo sucesivo procedimiento principal, la sustancia a ensayar

se incubaba con una biomolécula del grupo II: proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f) o 1h) y/o una proteína similar a una de estas proteínas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o a su polinucleótido antisentido, y/o una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas anteriormente mencionadas, o

se incubaba con una biomolécula del grupo III: proteína DNPI y/o una proteína según una de las Figuras 2b), 2d) o 2f) y/o una proteína similar a una de estas proteínas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 2a), 2c) o 2e) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 2a), 2c) o 2e) o a su polinucleótido antisentido, y/o una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas anteriormente mencionadas, y

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

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

También es preferente un procedimiento según la invención en el que el dolor regulado por la sustancia a descubrir forma parte del grupo consistente en:

dolor crónico, en particular dolor musculoesquelético; dolor neuropático, en particular dolor alodínico, hiperalgesia mecánica o neuropatía diabética; dolor visceral, dolor cerebral, dolor periférico o dolor condicionado por la inflamación, en particular dolor inflamatorio periférico; y también migraña, cefalea agrupada o dolor en casos de neuralgia del trigémino.

Un compuesto identificable mediante un procedimiento según la invención es una sustancia reguladora del dolor. En este contexto, el término "compuesto" se refiere sobre todo a principios activos de bajo peso molecular, pero también a péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. El término "identificable" significa que el compuesto presenta la característica consistente en que, en lo que respecta a la unión en el procedimiento de screening según la invención, se une de forma claramente más intensa, preferentemente con el doble de intensidad, que la media de las sustancias de ensayo, o que, en lo que respecta a la variación de los parámetros funcionales, se desvía claramente de la media de las sustancias de ensayo. De forma especialmente preferente, el compuesto consiste en un compuesto de bajo peso molecular.

Junto con el polinucleótido utilizado en el procedimiento según la invención también se incluyen los propios fragmentos de gen representados, y también un polinucleótido que corresponde por completo o como mínimo a partes de la secuencia codificadora del gen correspondiente al fragmento. En ello también se incluyen polinucleótidos que presentan una coincidencia de como mínimo un 90%, preferentemente de un 95% y en particular de como mínimo un 97%, en la sucesión de bases con la secuencia codificadora de los polinucleótidos representados o de la secuencia codificadora del gen. Además es preferible que el polinucleótido consista en RNA o en DNA de cadena simple o doble, en particular mRNA o cDNA. También es preferible que el polinucleótido consista en un polinucleótido antisentido o PNA que presente una secuencia que se pueda unir específicamente a un polinucleótido según la invención. PNA significa "*peptidic nucleic acid*" (ácido nucleico peptídico) que, si bien porta los pares de bases, su esqueleto está unido peptídicamente. Un polinucleótido antisentido presenta la sucesión de bases complementaria a como mínimo una parte de un ácido nucleico base. También es preferible que el polinucleótido sea parte de un ribozima o de otra enzima de DNA o un RNA o DNA catalítico. Por ribozima se ha de entender un ácido ribonucleico catalíticamente activo, y por enzima de DNA un ácido desoxirribonucleico correspondiente, es decir RNA o DNA catalítico.

En el caso de utilizarse una proteína, es preferible que ésta haya sido sometida a una modificación postraduccional, en particular que haya sido glicosilada, fosforilada, amidada, metilada, acetilada, ADP-ribosilada, hidroxilada, provista de un anclaje de membrana, segmentada o acortada. Las modificaciones postraduccionales se describen, por ejemplo, en Voet/Voet, Biochemistry, 1ª edición, 1990, páginas 935-938.

Los compuestos identificables mediante un procedimiento según la invención se pueden administrar, por ejemplo, en forma de un medicamento.

En suma, un importante fundamento de la invención consiste en la identificación de genes y fragmentos de genes reguladores del dolor. El procedimiento de screening se basa en ello. Pero también se puede utilizar para la diagnosis o la terapia, como ya se ha indicado más arriba. A continuación se explican las posibilidades de aplicación correspondientes y otros ejemplos de realización.

1. Terapia del dolor crónico

Se examinó la expresión de mRNA de las quinasas mediante hibridación *in situ* en tejido de la médula espinal. En la médula espinal, las neuronas sensoriales primarias se proyectan en neuronas del sistema nervioso central posteriores; además de los procesos supraespinales, se trata de la sinapsis central para la información nociceptiva. Numerosos experimentos han demostrado que tras el desarrollo de estados de dolor crónico subyacen modificaciones plásticas del sistema nervioso (para una idea general, véase Corderre y col., 1993; Zimmermann y Herdegen, 1996). En particular se han descrito modificaciones plásticas en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y de la médula espinal, que van acompañadas de una regulación génica relevante para el dolor. Por ejemplo, se ha descrito una regulación de genes en la médula espinal en relación con una serie de neurotransmisores-receptores importantes para la terapia del dolor (véase la Tabla 1). Sobre esta base, las secuencias de cDNA reguladas por el dolor halladas se podrían utilizar para la terapia (terapia genética, antisentido, ribozima) y para la diagnosis de estados de dolor crónicos.

1.1. Estrategias antisentido

En este caso se producen constructos que pueden reducir el mRNA o la concentración de proteínas y que se derivan de la secuencia de ácido nucleico del cDNA completo o de regiones parciales. Estos constructos pueden consistir, por ejemplo, en oligonucleótidos antisentido (DNA o RNA), los cuales, dado el caso utilizando componentes de nucleótido modificados (por ejemplo O-alilribosa), presentan una estabilidad elevada frente a las nucleasas. También es concebible la utilización de ribozimas que, como moléculas de RNA enzimáticamente activas, catalicen una segmentación específica del RNA. Además se podrían utilizar vectores que expresen las secuencias aquí utilizadas o regiones parciales de dichas secuencias de nucleótidos bajo el control de un promotor adecuado y que, en consecuencia, sean adecuados para una terapia *in vivo* o *ex vivo*. Adicionalmente, también son posibles constructos antisentido que, mediante sustitución del esqueleto fosfato de las secuencias de nucleótidos (por ejemplo PNA, es decir, ácidos nucleicos peptídicos) o utilizando bases no tradicionales como inosina, queosina o wybutosina y también formas de adenina, citidina, guanosina y timidina y uridina modificadas por acetilo, metilo, tio y similares, no puedan ser descompuestas por nucleasas endógenas o sólo puedan serlo en escasa medida.

1.2. Antagonistas/agonistas o inhibidores/activadores de los productos genéticos utilizados en el procedimiento de screening

Aquí se incluyen aquellas sustancias que al unirse al producto genético modifican la función del mismo. Éstas pueden ser:

- 1.2.1. Moléculas orgánico-químicas halladas en el marco de un screening de principios activos utilizando los productos genéticos de los cDNA utilizados según la invención como pareja de unión.
- 1.2.2. Anticuerpos, ya sean policlonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos F_{ab} o fragmentos de bancos de fago, que influyen específicamente en la función de los productos génicos, preferentemente como anticuerpos neutralizantes, a través de una unión.
- 1.2.3. Aptámeros, es decir, ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos con propiedades de unión a proteínas. También pertenecen a este grupo los llamados “especulómeros”, que representan oligonucleótidos inversos y, por consiguiente estables, obtenidos por evolución especular, los cuales se pueden unir con una alta afinidad y especificidad a una molécula diana (Klussmann y col., 1996).

1.3. Terapia genética

Las secuencias descritas se pueden utilizar para la terapia de enfermedades neurológicas, en particular de estados de dolor crónicos, empleándola, después de una clonación en vectores adecuados (por ejemplo vectores de adenovirus o vectores de virus adenoasociados), para la terapia *in vivo* o *ex vivo*, con el fin de contrarrestar una sobreexpresión o subexpresión del producto genético endógeno, corregir la secuencia del producto genético defectuoso (por ejemplo mediante transegmentación con el constructo exógeno) o poner a disposición un producto genético funcional.

2. Diagnosis

Algunas secuencias de polinucleótidos (oligonucleótidos, moléculas de DNA y RNA antisentido, PNA) derivadas de las secuencias de nucleótidos utilizadas en el procedimiento de screening, etc., se podrían utilizar para la diagnosis de estados o enfermedades asociados con la expresión de dichas secuencias genéticas. Los ejemplos de estos estados o enfermedades comprenden enfermedades neurológicas, incluyendo dolores crónicos o dolores neuropáticos (provocados por ejemplo por diabetes, cáncer o SIDA), o enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, corea de Huntington, Creutzfeld-Jacob, esclerosis lateral amiotrófica y demencias. Las secuencias de nucleótidos pueden servir de múltiples modos (Northern Blot, Southern Blot, análisis FISH, análisis PRINS, PCR) bien para identificar

5 productos genéticos o productos genéticos anormales relevantes para la diagnosis, bien para cuantificar el producto genético. Además del diagnóstico por ácido nucleico, para el diagnóstico también se pueden emplear anticuerpos o aptámeros contra la proteína codificada por los ácidos nucleicos utilizados según la invención (por ejemplo mediante ELISA, RIA, procedimientos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos), con el fin de identificar la proteína o sus formas anormales y cuantificar la proteína.

En lo que respecta a un diagnóstico genético se podrían emplear sondas de ácido nucleico derivadas de las secuencias de nucleótidos utilizadas según la invención para determinar el locus del gen (por ejemplo mediante FISH, FACS, cromosomas artificiales como YAC, BAC o constructos P1).

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

Figuras y ejemplos

15 Figuras

- Figura 1a) Secuencia de cDNA de BNPI, humano; AN: NM_020309.
- Figura 1b) Secuencia de aminoácidos de BNPI, humano; AN: NM_020309.
- 20 Figura 1c) Secuencia de cDNA de BNPI, humano; N°: AAT42064 del documento WO96/34288.
- Figura 1d) Secuencia de aminoácidos de BNPI, humano; N°: AAT42064 del documento WO96/34288.
- 25 Figura 1e) Secuencia de cDNA de BNPI, rata; AN: U07609.
- Figura 1f) Secuencia de aminoácidos de BNPI, rata; AN: U07609.
- Figura 1g) Secuencia de cDNA de BNPI, ratón; AN: XM_133432.
- 30 Figura 1h) Secuencia de aminoácidos de BNPI, ratón; AN: XM_133432.
- Figura 2a) Secuencia de cDNA de DNPI, humano; AN: AB032435.
- 35 Figura 2b) Secuencia de aminoácidos de DNPI, humano; AN: AB032435.
- Figura 2c) Secuencia de cDNA de DNPI, rata; AN: AF271235.
- Figura 2d) Secuencia de aminoácidos de DNPI, rata; AN: AF271235.
- 40 Figura 2e) Secuencia de cDNA de DNPI, ratón; AN: NM_080853.
- Figura 2f) Secuencia de aminoácidos de DNPI, ratón; AN: NM_080853.
- 45 Figura 3) Separación de fragmentos de RFDD-PCR marcados de forma radiactiva en un gel PAA desnaturalizado al 6% (véase el Ejemplo 1).
- Figura 4) Regulación en sentido ascendente de la expresión de proteínas DNPI y BNPI en neuronas DRG sensoriales primarias de rata y en fibras después de una artritis inducida por colágeno (véase el Ejemplo 2).
- 50 Figura 5) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en la sinapsis de la transmisión del dolor y en áreas motoras de la médula espinal lumbar de la rata (véase el Ejemplo 3a).
- Figura 6) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en la sinapsis de las áreas de transmisión del dolor del asta dorsal de la médula espinal lumbar de la rata (véase el Ejemplo 3b).
- 55 Figura 7) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en la sinapsis de la transmisión del dolor de la médula espinal sacra de la rata (véase el Ejemplo 3c).
- 60 Figura 8) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en la sinapsis de la transmisión del dolor médulo-cervicoespinal del nervio trigémino de la rata (véase el Ejemplo 3d).
- Figura 9) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor en la rata (véase el Ejemplo 3e).
- 65 Figura 10) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor en la rata (véase el Ejemplo 3f).

Figura 11) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor en la rata (véase el Ejemplo 3g).

Figura 12) Expresión diferencial de DNPI y BNPI en regiones cerebrales relevantes para el dolor en la rata (véase el Ejemplo 3h).

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de genes reguladores del dolor mediante RFDD-PCR

A) Procedimiento

Se eligió el siguiente procedimiento:

Como punto de partida para el aislamiento de genes reguladores del dolor se eligió la artritis inducida por CFA en la rata, inyectándose el adyuvante completo de Freund en la base de la cola. El tejido diana en el que se demostró la expresión reguladora del dolor de los genes utilizados según la invención consistía en los ganglios de la raíz dorsal del quinto segmento lumbar. Existen cuatro métodos para el aislamiento de genes regulados de forma diferencial:

- cDNA-RDA (cDNA-representational difference analysis; Hubank & Schatz, 1994).
- DDRT-PCR (Differential Display RT-PCR; Liang & Pardee 1992, Bauer y col., 1994). Actualmente existen modificaciones mejoradas de este método, como la denominada "Restriction-fragment-differential-display-PCR" (RFDD-PCR), que permite una reacción reproducible mediante fragmentación de restricción adicional del cDNA junto con una amplificación por PCR optimizada, y además presenta un incremento de la detección de fragmentos en la región codificadora (Ivanova y col., 1995).
- Hibridación sustractiva (Watson & Margulies, 1993).
- SAGE (Serial Analysis of Gene Expression, Velculescu y col., 1995).

Una evaluación comparativa de los métodos mencionados condujo a la selección de la RFDD-PCR, dado que este método, a diferencia de la hibridación sustractiva y el SAGE, puede registrar genes regulados tanto en sentido ascendente como en sentido descendente y también transcripciones excepcionales, y además proporciona abundantes resultados en cortos periodos de tiempo.

B) Materiales y métodos

Aislamiento y caracterización de secuencias de cDNA reguladoras del dolor

Modelo animal: Poliartritis inducida por CFA

La Artritis Adyuvante (AA) es una forma inducida de artritis (sub)crónica. Se induce en ratas mediante inmunización con una suspensión oleosa de micobacterias. La enfermedad generada con ello consiste en una artritis autoinmune mediada por células T que, dado que en la inducción no se utiliza ningún autoantígeno definido, corresponde a una artritis espontánea en humanos. Con frecuencia se emplea la AA para investigar aspectos inmunológicos de la artritis reumatoide. Además, este método se utiliza para ensayar sustancias antiinflamatorias y analgésicas. La AA es una forma bastante agresiva de artritis. Si bien el proceso inflamatorio de la AA se cura de forma espontánea, siempre quedan modificaciones graves en las articulaciones. La gravedad de la enfermedad se puede cuantificar estableciendo un índice de artritis. Para ello, las cuatro patas se examinan en cuanto a la presencia de enrojecimientos, hinchazones y deformaciones de las articulaciones. Además, el desarrollo de la enfermedad se puede caracterizar más detalladamente mediante la determinación del peso corporal, la hinchazón de las patas por pletismografía y también mediante exámenes histológicos de las articulaciones.

La artritis se induce por inyección intracutánea de CFA (100 μ l de la solución madre 5 mg/ml) en la base de la cola (dorsal). El nivel de gravedad de la artritis se determina por un índice de puntuación mediante la observación diaria de los animales en cuanto a su movilidad, enrojecimientos de la piel, hinchazón de las articulaciones tarsiana y carpiana. El principio de una inflamación visible de las articulaciones tarsiana o carpiana comienza aproximadamente el día 10 después de la inmunización. La gravedad de la enfermedad aumenta a lo largo de un período de 10-14 días, llega a un nivel máximo que se mantiene durante aproximadamente 6-7 días, para después atenuarse. En las ratas inmunizadas únicamente con IFA no se provocó ninguna artritis.

Toma de muestras de tejido. Se decapitan los animales, se extraen los ganglios de la raíz dorsal después de una lubalectomía y se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido.

Aislamiento de RNA. El RNA total de las muestras de tejido se aisló con el kit Trizol (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA se cuantificó por espectrometría UV (extinción a 260 nm) y su integridad se comprobó mediante electroforesis desnaturante en un gel de formaldehído-agarosa (Sambrook y col., 1989).

5 *Digestión por DNasa.* Antes de su utilización en la DDRT-PCR, se eliminan posibles trazas de DNA genómico mediante digestión con DNasa. Aquí se incubaron en cada caso 6 µg de RNA en un volumen total de 100 µl en un tampón 1X First-Strand (Life Techn.) y 10 unidades de DNasaI libre de RNasa (Boehringer Mannheim) durante 15 minutos a 37°C. Después de extracción con fenol-cloroformo, el RNA precipita por adición de 1/10 vol acetato de sodio, pH 5,2, y 2,5 vol de etanol, se disolvió en DEPC-agua, se cuantificó por espectrometría UV y se caracterizó
10 mediante una nueva electroforesis en gel de formaldehído-agarosa.

Transcripción inversa. En cada caso, 1 µg de RNA digerido con DNasaI se sometió a transcripción inversa con ayuda del Kit displayProfile (firma Display Systems Biotech, Vista, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se generó un cDNA de cadena doble. Después de purificar el cDNA mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación en etanol, se comprobó la eficiencia de la síntesis de cDNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

20 *Digestión de restricción con TaqI.* En cada caso, 10 µl del cDNA de cadena doble se sometieron a digestión con la enzima de restricción TaqI. Esto también se llevó a cabo con el Kit displayProfile (firma Display Systems Biotech, Vista, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Partiendo de esta carga se ligan los adaptadores al cDNA digerido.

25 *Reacción de marcado final con P³³.* Para la detección posterior de los fragmentos, uno de los dos cebadores (denominado cebador de extensión-O) se marcó de forma radiactiva mediante una reacción de marcado final con T4-polinucleótido-quinasa y [γ^{33} P]ATP. Esto también se realizó con el Kit displayProfile (firma Display Systems Biotech, Vista, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 *Amplificación por PCR de los cDNA.* Después de la ligadura se preparan cargas de reacción paralelas donde, en cada caso, 0,2 µl del cDNA se amplifican con el cebador de extensión-o marcado y uno de los cebadores 64 Eu y las cargas de reacción se separan por electroforesis en un gel de tris-aurina-EDTA-poliacrilamida al 6%. El gel se secó a continuación durante una hora a 80°C y se expuso durante una noche a un screening BASIII-Detektionscreen (firma Fuji). Para la evaluación se empleó el STORM-Phosphor-Imager (firma Molecular Dynamics) utilizando el *software* ImageQuant. Los datos de autorradiografía se imprimieron en la misma escala sobre una lámina, la cual se utilizó después para recortar los fragmentos.

35 *Reamplificación de los fragmentos de DDRT-PCR.* Las bandas de PCR reguladas de forma diferencial se recortaron del gel con un escalpelo, se eluyeron de la pieza de gel mediante 15 minutos de cocción en 50 µl de tampón Tris-EDTA y se reamplificaron por PCR con ayuda del Kit displayProfile (firma Display Systems Biotech, Vista, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El perfil de temperaturas correspondía a la reacción PCR original (véase más arriba). A continuación, las cargas de PCR se mezclaron con 10 µl del tampón de muestra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol FF, 30% de glicerina) y se separaron por electroforesis en un gel de TAE-agarosa al 3% con 10 µg/ml de bromuro de etidio. Después se recortaron del gel productos de PCR del tamaño previsto.

45 *Clonación en vectores de clonación TA.* Los fragmentos recortados se purificaron con el kit Qiaquick-Gel-Extraktions (firma Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se concentraron hasta sequedad y se recogieron en 5 µl de agua bidestilada. A continuación, se ligaron en el vector pCRII-TOPO con el kit TOPO TA Cloning (firma Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se transformaron en células de TOP10F⁻-*E.coli*. La carga de transformación se distribuyó sobre placas de LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina que previamente habían sido tratadas con 50 µl de X-Gal al 2% (firma Sigma) y 50 µl de isopropiltiogalactósido (firma Sigma). Los clones bacterianos blancos obtenidos después de 15 horas de incubación a 37°C se trasladaron a 5 ml de medio líquido LB con 100 µg/ml de ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37°C bajo agitación. De estos cultivos se aisló el DNA de plásmido utilizando el kit Qiagen-Spin-Miniprep (firma Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, en cada caso, se caracterizaron 5 µl del DNA de plásmido mediante digestión de restricción EcoRI y
55 posterior electroforesis en gel de TAE-agarosa.

60 *Análisis de secuencias.* Aquí se secuenciaron en cada caso 500 ng del DNA de plásmido con el cebador T7-PCR utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing (firma Perkin-Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las reacciones se analizaron mediante el Sequencer ABI 370 automático (firma Applied Biosystems Inc.). Las secuencias de DNA se compararon con los bancos de datos genéticos utilizando el *software* bioSCOUT (firma LION, Heidelberg).

C) Resultados

65 La Figura 3 muestra el autorradiograma correspondiente. El autorradiograma muestra la separación de los fragmentos PCR formados mediante amplificación de diferentes cDNAs. Los cDNAs se sintetizaron mediante transcripción inversa de RNA total a partir de ganglios espinales L5. El RNA total había sido aislado de animales control (-) y de animales tratados con CFA (+). Una flecha señala el fragmento ab50-24, que presenta una regulación en sentido

ascendente, tal como se demuestra mediante el método RFDD. El fragmento ab50-24 presenta una homología muy significativa con la secuencia de cDNA AC-Nº AAT42064 de hBNPI (véase la Figura 1c). De este modo se demuestra que la expresión de BNPI es más fuerte bajo una condición de tratamiento con CFA.

5 Ejemplo 2

Identificación de genes regulados por el dolor mediante tinción inmunocitoquímica

Se eligió el siguiente procedimiento:

10

Como punto de partida para el aislamiento de genes regulados por el dolor se eligió el llamado modelo "CIA" (artritis inducida por colágeno) en ratas, donde se inyecta colágeno para provocar una artritis en la rata.

15 El procedimiento se correspondía con aquel descrito por Persson S., Schäfer MK-H., Nohr D., Ekström G., Post C., Nyberg F. y Weihe E. (1994), *Neuroscience* 63; 313-326 o Nohr D., Schäfer MK-H., Romeo H., Persson S., Nyberg F., Post C. y Weihe E. (1999), *Neuroscience* 93; 759-773.

20 Para la tinción inmunohistoquímica se utilizaron antisueros de conejo policlonales contra la proteína de fusión de DNPI o BNPI recombinante. En la Figura 4 se comprueba que la intensidad de la inmunotinción de DNPI y BNPI en el ganglio de la raíz dorsal lumbar de la rata artrítica (B y D/CIA) aumenta en comparación con los animales control (A y C/CTLR). Se ha de tener en cuenta tanto el aumento en los cuerpos celulares como la tinción de fibras en B en comparación con A y en C en comparación con D.

Ejemplo 3

25

Observación diferencial de la expresión entre DNPI y BNPI mediante tinción inmunocitoquímica

30 Para la tinción inmunohistoquímica se utilizaron antisueros de conejo policlonales contra la proteína de fusión de DNPI o BNPI recombinante. En general, se aplicaron secciones de diferentes regiones del SNC y la expresión de DNPI se comparó con la expresión de BNPI.

Ejemplo 3a

Con referencia a la Figura 5)

35

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

40

A = anti-DNPI;

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

C = anti-BNPI;

45

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

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

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

60

Ejemplo 3b

Con referencia a la Figura 6)

65

Se puede ver la distribución diferencial de la inmunorreactividad de BNPI y DNPI en la médula espinal lumbar dorsal superficial lateral izquierda (*left lateral superficial dorsal lumbar spinal cord*) de la rata. A y B, teñidas respectivamente para BNPI (A) y DNPI (B), muestran muchas tinciones punteadas para DNPI, que están concentradas

en la lámina I y en la sustancia gelatinosa, donde el BNPI falta prácticamente por completo. También se pueden ver complejos densos de puntos positivos de DNPI en el núcleo espinal lateral, donde el BNPI falta prácticamente por completo. También se pueden encontrar puntos positivos de DNPI finos en el asta dorsal profunda, aunque con menor densidad.

Ejemplo 3c

Con referencia a la Figura 7)

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

Ejemplo 3d

Con referencia a la Figura 8)

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

Ejemplo 3e

Con referencia a la Figura 9)

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

Tálamo = Th

Cuerpo amigdalino = Amyg

Hipocampo = Hip

Córtex cingular = Cg

Hipotálamo = Hy

Córtex parietal = PC

Ejemplo 3f

Con referencia a la Figura 10)

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

Ejemplo 3g

Con referencia a la Figura 11)

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

Ejemplo 3h

Con referencia a la Figura 12)

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

Análisis con respecto al ejemplo 3 en general

La distribución diferencial de BNPI y DNPI sináptica del sistema nociceptivo aferente primario, trigeminal espinal y supraespinal es una fuerte evidencia de la posibilidad de influir selectivamente en funciones nociceptivas mediante la modulación selectiva del transporte de glutamato por medio de DNPI o BNPI. La distribución de BNPI en el asta dorsal profunda es una indicación de una función preferente del BNPI en caso de dolores neuropáticos excitados por glutamato.

La distribución preferente de DNPI en la lámina 1 y en la sustancia gelatinosa del sistema nociceptivo espinal y trigeminal indica una función primaria y preferente del DNPI en el dolor inflamatorio. Dado que también hay sinapsis de DNPI en el asta dorsal profunda, el DNPI también es un candidato en caso de dolor neuropático.

El BNPI es un candidato preferente para la alodinia y la hiperalgesia mecánica en caso de dolor inflamatorio. Una entrada A β mediada por glutamato convergente en neuronas de proyección nociceptivas espinales podría ser un mecanismo esencial para el dolor musculoesquelético profundo crónico, un problema principal del dolor crónico.

La presencia en aferencias sacras viscerales señala una indicación en caso de dolor visceral.

Aferencia trigeminal: migraña, cefalea agrupada, neuralgia del trigémino.

Ejemplo 4

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

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

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

Ejemplo 5

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

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

Ejemplo 6

Realización del procedimiento de screening según la invención con DNPI y medida de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia

El procedimiento se lleva a cabo tal como se describe en el Ejemplo 5, excepto que en lugar de utilizar una sección de ácido nucleico que codifica BNPI se utiliza una sección de ácido nucleico que codifica DNPI.

Ejemplo 7

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

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

■ *Compresión directa*

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

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

■ *Granulación en seco*

5	Por ejemplo, por pastilla:	25 mg	Compuesto identificado mediante un procedimiento según la invención
		166 mg	Celulosa microcristalina
10		80 mg	Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (I-HPC LH 11™)
		5 mg	Dióxido de silicio altamente disperso
15		4 mg	Estearato de magnesio
		280 mg	Total

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

■ *Granulación en húmedo*

25	Por ejemplo, por pastilla:	25 mg	Compuesto identificado mediante un procedimiento según la invención
		205 mg	Celulosa microcristalina
30		6 mg	Povidona K30
		10 mg	Crospovidona
35		4 mg	Estearato de magnesio
		250 mg	Total

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

Ejemplo 8

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

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

Bibliografía

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

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

Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K eds.(1190) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.

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

Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) *Nucl Acids Res* 21: 4272-4280.

Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung. *Biochem Biophys Res Comm* 234: 190-193.

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

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

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

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

Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 231: 651-654.

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

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

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

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

Klußmann S et al., 1996: *Nature Biotechnology* 14: 1112-1115.

Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599-602.

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

Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I(1997): A novel G Protein-coupled receptorwith homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336-342.

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

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

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

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

Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. *Neureport* 7: 1382-1384.

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

U.S.Patent 5.262.311

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

Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs *Nature Biotech* 14:1685-1691.

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

ES 2 288 556 T3

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

WO96/34288

5

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

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

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para descubrir sustancias reguladoras del dolor, que incluye los siguientes pasos:

- (a) incubación de una sustancia a ensayar, bajo condiciones adecuadas, con una biomolécula del grupo I: proteína BNPI o DNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f), 1h), 2b), 2d) o 2f) y/o una proteína similar a éstas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g), 2a), 2c) o 2e) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e), 1g), 2a), 2c) o 2e) o a sus polinucleótidos antisentido, y/o una célula y/o un preparado celular que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas anteriormente mencionadas;
- (b) medida de la unión de la sustancia de ensayo a la proteína sintetizada por la célula, o medida de como mínimo uno de los parámetros funcionales modificados por la unión de la sustancia de ensayo a la proteína, mediante la medida de la regulación, inhibición y/o activación de receptores, canales de iones y/o enzimas, en particular mediante la medida de la modificación de la expresión genética, el medio iónico, el pH o el potencial de membrana, mediante la modificación de la actividad enzimática o de la concentración del 2º mensajero, o mediante la medida de la unión a través del desplazamiento de un ligando marcado conocido de la proteína y/o a través de la actividad relacionada de una sustancia de ensayo marcada.

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

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

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

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

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

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

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

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

se incuba con una biomolécula del grupo II: proteína BNPI y/o una proteína según una de las Figuras 1b), 1d), 1f) o 1h) y/o una proteína similar a una de éstas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 1a), 1c), 1e) o 1g) o a su polinucleótido antisentido, y/o una célula y/o un preparado celular de este tipo que ha sintetizado como mínimo una de las proteínas anteriormente mencionadas,

o

se incuba con una biomolécula del grupo III: proteína DNPI y/o una proteína según una de las Figuras 2b), 2d) o 2f) y/o una proteína similar a una de éstas en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un polinucleótido según una de las Figuras 2a), 2c) o 2e) o un polinucleótido similar a éstos en como mínimo un 90%, y/o una proteína codificada por un ácido nucleico que se une bajo condiciones estrictas a un polinucleótido según una de las Figuras 2a), 2c) o 2e) o a su polinucleótido antisentido, y/o una célula

ES 2 288 556 T3

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

y

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

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el dolor regulado por la sustancia a descubrir forma parte del grupo consistente en:

dolor crónico, en particular dolor musculoesquelético; dolor neuropático, en particular dolor alodínico, hiperalgesia mecánica o neuropatía diabética; dolor visceral, dolor cerebral, dolor periférico o dolor condicionado por la inflamación, en particular dolor inflamatorio periférico; y también migraña, cefalea agrupada o dolor en casos de neuralgia del trigémino.

Fig. 1a)

```

ccggcgccag gagccgccac catggagttc cgccaggagg agtttcggaa gctagcgggt 60
cgtgctctcg ggaagctgca ccgccttctg gagaagcggc aggaaggcgc ggagacgctg 120
gagctgagtg cggatgggcg cccggtgacc acgcagaccc gggaccgcgc ggtggtggac 180
tgcacctgct tcggcctccc tcgcccctac attatcgcca tcatgagtgg tctgggcttc 240
tgcacagctc ttggcatccg ctgcaacctg ggcgtggcca tcgtctccat ggtcaataac 300
agcacgaccc accgcggggg ccacgtggtg gtgcagaaag cccagttcag ctgggatcca 360
gagactgtcg gcctcataca cggctccttt ttctggggct acattgtcac tcagattcca 420
ggaggattta tctgtcaaaa atttgacgcc aacagagttt tcggctttgc tattgtggca 480
acatccactc taaacatgct gatccctca gctgcccgcg tccactatgg ctgtgtcatc 540
ttcgtgagga tcctgcaggg gttggtagag ggggtcacat accccgcctg ccatgggatc 600
tggagcaaat gggccccacc cttagaacgg agtcgcctgg cgacgacagc cttttgtggt 660
tcctatgctg gggcgggtgg ctgcgatgcc ctgcgcgggg tccttgtgca gtactcagga 720
tggagctctg ttttctacgt ctacggcagc ttccgggattc tctggtacct gttctggctg 780
ctcgtctcct acgagtcctc cgcgtgcac cccagcatct cggaggagga gcgcaagtac 840
atcgaggacg ccatcgagga gagcgcgaaa ctcatgaacc cctcaccgaa gtttagcact 900
ccctggcggc gcttcttcac gtctatgcca gtctatgcca tcatcgtggc caacttctgc 960
cgagctgga cgttctacct gctgctcctc tcccagcccc cctacttcga agaagtgttc 1020
ggcttcgaga tcagcaagggt aggcctggtg tccgcgctgc cccacctggt catgaccatc 1080
atcgtgcccc tcggcgccca gatcgcgga gaactcgga ggcttcggga tgggaagccac gctgctgttg 1200
accaacgtgc gcaagtgtat gaactcgga ggcttcggga tgggaagccac gctgctgttg 1200
gtggtcggct actcgactc caagggcggt gccatctcct tcctgggtcct agccgtgggg 1260
ttcagcggct tcgccatctc tgggttcaac gtgaaccacc tggacatagc cccgcgctac 1320
gccagcatcc tcatgggcat ctccaacggc gtgggcacac tgcgggcat ggtgtgcccc 1380
atcatcgtgg gggccatgac taagcacaaag actcgggagg agtggcagta cgtgttccta 1440
attgcctccc tgggtgacta tggaggatg agcgaggaga agtgtggctt cgttggccat 1560
aagcagccgt gggcagagcc tgaggagatg agcgaggaga agtgtggctt cgttggccat 1560
gaccagctgg ctggcagtga cgacagcgaa atggaggatg aggetgagcc cccgggggca 1620
ccccctgcac ccccgccctc ctatggggcc acacacagca catttcagcc cccagggccc 1680
ccacccccct tcggggacta ctgaccatgt gcctccact gaatggcagt ttccaggacc 1740
tccattccac tcatctctgg cctgagtga agtgtcaagg aacctgctc ctctctgtcc 1800
tgctcaggc ctaagaagca ctctcccttg tcccgagtgc tgtcaaatec tctttccttc 1860
ccaattgcct ctcaggggta gtgaagctgc agactgacag tttcaaggat acccaaattc 1920
ccctaaagggt tccctctcca cccgttctgc ctcaagtgtt tcaaattctc cctttcaggg 1980
ctttatttga atggacagtt cgacctctta ctctctcttg tggttttgag gcacccacac 2040
ccccgccttt cctttatctc cagggactct caggctaacc tttgagatca ctcagctccc 2100
atctcctttc agaaaaattc aaggtcctcc tctagaagtt tcaaattctc cccaactctg 2160
ttctgcatct tccagattgg ttaaccaat tactcgtccc cgccattcca gggattgatt 2220
ctcaccagcg tttctgatgg aaaatggcgg tttcaagtcc ccgattccgt gcccacttca 2280
catctccctc accagcagat tctgcgaaag caccaaattt ctcaagaccc tcttctccct 2340
agcttagcat aatgtctggg gaaaca

```

Fig. 1b)

```

1    MEFRQBEFRK LAGRALGKLH RLLEKRQEGA ETLELSADGR PVTQTQTRDPP
51   VVDCTCFGLP RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG
101  HVVVQKAQFS WDPETVGLIH GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA
151  IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP
201  LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV YGSFGIFWYL
251  FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPLTK FSTPWRRFFT
301  SMPVYAIIVA NFCRSWTFYL LLISQPAYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV
351  MTIIVPIGGQ IADFLRSRRI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS
401  KGV AISFLVL AVGFSGFAIS GFNVNHL DIA PRYASILMGI SNGVGTLSGM
451  VCP IIVGAMT KHKTRBEWQY VFLIASLVHY GGVIFYGVFA SGEKQPWAEP
501  EEMSEEKCGF VGHDQLAGSD DSEMEDEAEP PGAPPAPPPS YGATHSTFQP
551  PRPPPPVRDY

```

Fig. 1c)

```

cgataagett gatatcgaat tccggactct tgctcgggcg ccttaacccg gcgttcgggtt 60
catcccgcag cgccagttct gcttaccaaa agtggcccac taggcactcg cattccacgc 120
cgggtccac gccagcgagc cgggcttctt acccatttaa agtttgagaa taggttgaga 180
tcgtttcggc cccaagacct ctaatcattc gctttaccgg ataaaaactgc gtggcggggg 240
tgcgtcgggt ctgcgagagc gccagctatc ctgagggaaa cttcggaggg aaccagctac 300
tagatgggtc gattagtctt tcgcccctat acccaggctc gacgaccgat ttgcacgtca 360
ggaccgctac ggacctccac cagagtttcc tctggcttcg ccctgcccag gcgatcggcg 420
ggggggaccc gcgggggtgac cggcggcagg agccgccacc atggagtctc gccaggagga 480
gtttcgggaag ctagcgggtc gtgctctcgg gaagctgcac cgccttctgg agaagcggca 540
ggaaggcgcg gagacgctgg agctgagtgc ggatggcgcg ccggtgacca cgagacccc 600
ggaccgcgcg gtggtggact gcacctgctt cggcctccct cgcgcctaca ttatcgccat 660
catgagtggc ctgggcttct gcacagctt tggcatcgc tgcaacctgg gcgtggccat 720
cgtctccatg gtcaataaca gcacgaccca ccgcgggggc cacgtgggtg tgcagaaagc 780
ccagttcagc tgggatccag agactgtcgg cctcatcac ggctcctttt tctggggcta 840
cattgtcact cagattccag gaggatttat ctgtcaaaaa tttgcagcca acagagtttt 900
cggttttgct attgtggcaa catccactct aaacatgctg atcccctcag ctgcccgcgt 960
ccactatggc tgtgtcatct tcgtgaggat cctgcagggg ttggtagagg gggtcacata 1020
ccccgcctgc catgggatct ggagcaaatg ggccccacce ttagaacgga gtgcctggc 1080
gacgacagcc ttttgtggtt cctatgctgg ggcgggtggtc gcgatgcccc tcgcccgggt 1140
ccttgtgcag tactcaggat ggagctctgt tttctacgtc tacggcagct tcgggatctt 1200
ctggtacctg ttctggctgc tcgtctccta cgagtccccc gcgctgcacc ccagcatctc 1260
ggaggaggag cgcaagtaca tcgaggacgc catcgagag agcgcgaaac tcatgaacce 1320
cctcacgaag tttagcactc cctggcggcg cttcttcacg tctatgccag tctatgccat 1380
catcgtggcc aacttctgcc gcagctggac gttctacctg ctgctcatct ccagcccga 1440
ctacttcgaa gaagtgttcg gcttcgagat cagcaaggta ggctgggtgt ccgcgctgcc 1500
ccacctggtc atgaccatca tcgtgcccct cggcggccag atcgcggact tcctgcggag 1560
ccgcgcgcat atgtccacca ccaacgtgcg caagttgatg aactgcggag gcttcggcat 1620
ggaagccacg ctgctgttgg tggtcggcta ctgcactcc aagggcgtgg ccatctcctt 1680
cctggctcta gccgtgggtt tcagcggctt cgccatctct gggttcaacg tgaaccacct 1740
ggacatagcc ccgcgctacg ccagcactct catgggcate tccaacggcg tgggcacact 1800
gtcggggcatg gtgtgcccc aatcgtggg ggccatgact aagcacaaga ctcgggagga 1860
gtggcagtac gtgttcttaa ttgcctccct ggtgcactat ggaggtgtca tcttctacgg 1920
ggtctttgct tctggagaga agcagccgtg ggcagagcct gaggagatga gcgaggagaa 1980
gtgtggcttc gttggccatg accagctggc tggcagtga gacagcgaaa tggaggatga 2040
ggctgagccc ccgggggcac cccctgcacc cccgccctcc tatggggcca cacacagcac 2100
atcttcagccc ccagggccc caccctctgt ccgggactac tgaccatgtg cctcccactg 2160
aatggcagtt tccaggacct ccattccact catctctggc ctgagtgaac gtgtcaagga 2220
accctgctcc tctctgtcct gcctcaggcc taagaagcac tctcccttgt tccagtgct 2280
gtcaaatcct ctttccctcc caattgcctc tcaggggtag tgaagctgca gactgacagt 2340
ttcaaggata cccaaattcc cctaaagggt cctctccac ccgttctgcc tcagtgggtt 2400
caaactctct ctttcagggg tttatttgaa tggacagttc gacctcttac tctctcttgt 2460
ggttttgagg caccacacc ccccgcttc ctttatctcc agggactctc aggttaacct 2520
ttgagatcac tcagctccca tctcctttca gaaaaattca aggtcctcct ctagaagttt 2580
caaactctct ccaactctgt tctgcatctt ccagattggg ttaaccaatt actcgtcccc 2640
gccattccag ggattgattc tcaccagcgt ttctgatgga aaatggcggg aattcctgca 2700
gcccggggga tccact
2716

```

Fig. 1d)

```

1   MEFRQEEFRK LAGRALGKLH RLLEKRQEGA ETLELSADGR PVTQTTRDPP
51  VVDCTCFGLP RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG
101 HVVVQKAQFS WDPETVGLIH GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA
151 IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG LVEGVTPAC HGIWSKWAPP
201 LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV YGSFGIFWYL
251 FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPLTK FSTPWRRFFT
301 SMPVYAIIVA NFCRSWTFYL LLISQPDYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV
351 MTIIVPIGGQ IADFLRSRRI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS
401 KGVAISFLVL AVGFSGFAIS GFNVNHLDA PRYASILMGI SNGVGTLSGM
451 VCPPIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY GGVIFYGVFA SGEKQPWAEF
501 EEMSEKCGF VGHDLQAGSD DSEMEDEAEP PGAPPAPPPS YGATHSTFQP
551 PRPPPPVRDY

```

Fig. 1e)

```

gaattcggca cgagcgggagc tgcgggggccc ggccggggccc gggcgggaccc cgggatccc 60
gacgcggccc cccggggccc cgggcggggg gattggcagg ggaccgcgct gggcacagcc 120
accatggagt tccggcagga ggagtttcgg aagctggcgg ggcgcgcctt ggggaggctg 180
caccggttac tggagaagcg gcaggaaggg gcggagacat tggagctgag cgccgacggg 240
cgcccatgta ccacacacac gccggacccc ccggtgggtg actgcacttg ctttggcctc 300
cctcgccgct acatcatcgc gatcatgagc ggtctgggtt tctgcatcag ctttggcctc 360
cgctgcaacc tgggcgtggc catcgtatcc atggtcaaca acagtacaac ccacgtggg 420
ggccacgtgg tggcgagaa agcccagttc aactgggata cagagactgt cggcctcata 480
catggctcct ttttctgggg gtacattgtc actcagattc ctggaggatt tatctgcca 540
aaattcgag ccaacagggg ctttggcctt gccattgtgg ctacctccac cctaaatatg 600
ttgatccctt cagcagcccg tgttcaactat ggcctgtgtca tcttcgtgag gatccttcag 660
ggattgggtg aggggggtcac atacctgct tggcatggca tctggagcaa atggggccct 720
cccttagaac ggagtcgggtt ggcgaacgaca gcccttttgcg gttcctatgc cggggcagtg 780
gttgccatgc ctctggctgg ggtcctggta cagtattcag gatggagttc tgtcttctat 840
gtctatggca gcttcgggat ctttgggtac ctggtctggt tgcctgtctc ctacgagtc 900
cctgcaacta accccagcat ctccgaggag gaggcgaat acattgagga tgccatcgga 960
gaaagcgcca agctcatgaa cctgtttacg aagtttaaca caccctggag gcgcttctt 1020
acctccatgc cgggtctatgc catcattgtc gccactttt gccgcagctg gacttctac 1080
ctgctcctca tctcccagcc cgcctacttt gaagaagtgt tcggctttga gatcagcaag 1140
gtgggactgg tgcgggcact gctcacctt gtcattgacta tcatcgtacc catcggaggc 1200
cagatcgccg acttctctgc cagtcgtcat ataattgtcc cgaccaatgt gcgaaagctg 1260
atgaactgcg ggggtttcgg gatggaagct acgctgctgc tgggtggtcg atactcacac 1320
tccaagggcg tggccatctc ctctctggtc ctggctgtgg gcttcagtg ctttgcctac 1380
tctgggttta acgtgaacca cttggacatc gccctcgtat atgccagcat cttgatgggc 1440
atttccaatg gcgtgggcac actgtctggg atggtgtgcc ccatcatcgt ggggtgcaatg 1500
accaagcaca agacgcggga ggagtggcag tacgtgttcc tcatagcctc cctggtgcac 1560
tatggaggtg tcatcttcta tgggtctttt gcttcgggag agaaacagcc gtgggcagag 1620
ccggaggaga tgagcgagga gaagtgtggc tttgttggcc acgaccagct ggctggcagt 1680
gacgaaagtg aaatggaaga cgaggttgag ccccgggggg cccccccgc acctccgct 1740
tcctacgggg ccacacacag cacagttcag cctccaaggc cccaccccc tgtccgggac 1800
tactgaccac gtgcctccca ctggtgggca gtttccagga cctccactcg atacacctc 1860
agcctaaacg gcagtgtcga ggaacccac tctctctctg cctcaggctt aagatgcaag 1920
tcttccttg tgcacagtc tgtccgacca gccctctctc cttctcaact gcctcttgca 1980
ggggtgaagc tgcacactag cagtttcaag ctctgcccga attc

```

Fig. 1f)

```

1    MEFRQEEFRK LAGRALGRLH RLLEKROEGA ETLELSADGR PVTTHTRDPP VVDCTCFGLP
51   RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG HVVVQKAQFN WDPETVGLIH
101  GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG
151  LVEGVYTPAC HGIWSKWAPP LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV
201  YGSFGIFWYL FWLLVSYESP ALHPSISEEE RKYIEDAIGE SAKLMNPVTK FNTPWRRFFT
251  SMPVYAIIVA NFCRSWTFYL LLISQPAYFE EVFGFEISKV GLVSALPHLV MTIIVPIGGQ
301  IADFLRSRHI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS KGVAISFLVL AVGFSGFAIS
351  GFNVNHLDLA PRYASILMGI SNGVGTLSGM VCPPIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY
401  GGVIFYGVFA SGEKQFWAEP EEMSEKCGF VGHDQLAGSD ESEMEDEVEP PGAPPAPPPS
451  YGATHSTVQP PRPPFPVRDY

```

Fig. 1g)

```

1      cggccgcccc ggccccgcggg cgggggggatt ggcagggggac ccgcgtgggc acagccacca
61     tggagttccg gcaggaggag ttctcggaagc tggcggggcg cgccttgggg aggcctgcacc
121    ggttactgga gaagcggcag gaaggcgcgg agacactgga gctgagtgcc gacgggcggc
181    cagtgaccac gcacactcgg gaccgcctg tgggtggactg cacctgcttt ggccctccctc
241    gtcgctacat catcgccatc atgagcggtc tgggtttctg tatcagcttt ggcattccgct
301    gcaacctggg cgtggccatc gtgtccatgg tcaacaacag cacaaccac cgtggggggcc
361    acgtgggtgg gcagaaagcc cagttcaact gggatccaga gactgtcggc ctcatatcg
421    gctccttttt ctggggctac attgtcactc agattcctgg aggatattatc tgccaaaaat
481    tcgcagccaa cagggctctt ggctttgcca ttgtggctac ctccacccta aacatgttga
541    tcccttcagc agcccgctt cactatggct gtgtcatctt cgtgaggatc cttcagggat
601    tgggtggaggg ggtcacatac cctgcttgc atggcatctg gagcaaatgg gccctccctc
661    tagaacggag tcggctggca acgacagcct ttgcggttc ctatgctggg cgggtggttg
721    ccatgccctt ggctgggttc cttgtgcagt attcaggatg gaggttctgtc ttctatgtct
781    atggcagctt cgggatcttt tggtaacctg tctgggttgc tgtctcctat gagtcccg
841    cactgcacc cagcatctct gaggaggagc gcaaatatcat tgaggatgcc atcggggaga
901    gcgccaagct catgaacctt gttacgaagt ttaacacacc ctggaggcgc ttctttacgt
961    ccatgccctg ctatgccatc atcgttgcga acttttgccg cagctggacc ttctacctgc
1021   tctcatctc tcagcccgcc tactttgaag aagtgttcgg ctttgagatc agcaagggtg
1081   ggctgggtgtc ggcgctgcct cactttgtca tgaccatcat cgtacccatt ggaggccaga
1141   tcgctgactt ttgctgcagt cgtcacataa tgtccactac caacgtgcga aagctcatga
1201   actgccccgg tttcgggatg gaagccacgc tgcgtcgtgg ggtcggatac tcgcactcca
1261   agggcggtgg catctccttc ctggtcctgg ctgtgggctt cagtggcttt gccatctctg
1321   ggtttaacgt gaaccacttg gacatcgccc ctgctatgc cagcatcttg atgggcattt
1381   ccaatggcgt gggcacactg tctgggatgg tgtgccccat catcgtgggt gcaatgacca
1441   agcacagag acgggaggag tggcagtagc tgttcctcat agcctccctg gtgcactacg
1501   gcggtgtcat cttctatggg gtctttgctt cgggagagaa gcagccgtgg gcagagccgg
1561   aggagatgag cgaggagaag tgtggctttg ttggccacga ccagctggct ggcagtgcg
1621   aaagtgaat ggaggacgag gctgagcccc caggggcgcc ccccgcccg cctccgtcct
1681   acggggccac acacagcaca gtgcagcttc cgaggccccc gccccctgtc cgggactact
1741   gaccacgggc cteccactgt ggggcagttt ccaggacttc cactccatac acctctagcc
1801   tgagcggcag tgtcgaggaa cccactcct cccctgcctc aggcctaaga tgcaagtcct
1861   cccttgttcc cagtgtgtc cgaccagccc tctttccctc tcaactgcct cctgccccgg
1921   gtgaagctgc aactagcag tttcaaggat acccagactc cctgaaagt cgttctccgc
1981   ttgtttctgc ctgtgtggg tcaaatctcc cctttgaggg ctttatttgg agggacagtt
2041   caacctcttc ctctcttgtg gttttgaggt ttacccctt ccccaagac cccagggatt
2101   ctcaggctac cccgagatta ttcaggtagt cccctactca gaagacttca tggctcgtcct
2161   ctattagttt caaggctgc ctaaccaatt ctacattttt ccaagctggg ttaacctaac
2221   caccaatgcc gccgttccca ggactgattc tcaccagcgt ttctgaggga aaatggcggt
2281   ttcaagtccc cccaccccc ttttcttccc tcgtccctc accagcacac tttgccccgc
2341   cttgacctta gcttagtaca atcattgtcc agggaaatgg ccaaatggc tctgctcacc
2401   ccgtgtcttt tttctgactc agttttcagg tctcagtagt ggctgcccc aactattaat
2461   tcagcggctc gaggccacct ctctctcccc gtgggtgggtt caggatcccc ctccccccc
2521   ccccccaaaa tcttgcact ttattctcct ggggtgggttc aggcgcctc cgggtttctca
2581   gtggccattt gttgtgtgtc cctcaggggc taaatgatcc caaatctggg gtgcttcccc
2641   tcatagacac cctctctca acgtagaaat ctgggtgggg gtgagggtgt tgagagaagt
2701   tacagaatcc caggaaagg agcggggctg ggaggagagg gttgttctc gggcagggtc
2761   gtgtcttggg gtctgtctct gtgacgtaaa tctgcccctg cccacccca ctcccaataa
2821   acgtctcggg gtacgg

```

Fig. 1h)

```

1    MEFRQEEFRK LAGRALGRLH RLLEKRQEGA ETLELSADGR PVTTHTRDPP VVDCTCFGLP
61   RRYIIAIMSG LGFCISFGIR CNLGVAIVSM VNNSTTHRGG HVVVQKAQFN WDPETVGLIH
121  GSFFWGYIVT QIPGGFICQK FAANRVFGFA IVATSTLNML IPSAARVHYG CVIFVRILQG
181  LVEGVITYPAC HGIWSKWAPP LERSRLATTA FCGSYAGAVV AMPLAGVLVQ YSGWSSVFYV
241  YGSFGIFWYL FWLLVSYESP ALHPSISEEB RKYIEDAIGE SAKLMNPVTK FNTPNRRFFT
301  SMPVYAIIVA NFCSRWTFFL LLISQPAYFE EVFGFRISKV GLVSALPHLV MTIIVPIGGQ
361  IADFLRSRHI MSTTNVRKLM NCGGFGMEAT LLLVVGYSHS KGV AISFLVL AVGFSGFAIS
421  GFNVNHL DIA PRYASILMGI SNGVGTLSGM VCP IIVGAMT KHKTREEWQY VFLIASLVHY
481  GGVIFYGVFA SGEKQPWAEP EEMSEKCGF VGHDQLAGSD ESEMEDKAEP PGAPPAPPPS
541  YGATHSTVQP PRPPPPVRDY

```

Fig. 2a)

```

cgtttaaaag ccatcagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgcgct ctttgccacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaaac ccgtgggttg catgcagcta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct cccttctctc actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgcac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tctctgcctt 360
tcttagcaat cactatttta atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaattggaat 420
ccgtaaaaca aaggattttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatttt gctggaaaat 480
cactcggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc 540
tgacggagga tgggaagccc cttagagggtc ccgagaggaa ggccgctg tgccactgca 600
cgtgcttcgg cctgccccgc cgtacatta tgcctcat gagcggcctg ggcttctgca 660
tctccttcgg tatccgctgc aacctgggct tggcattgt ggacatggct aacaacagca 720
ccatccaccg cgggggcaag gtcatcaagg agaaagccaa attcaactgg gaccgggaaa 780
ccgtagggga gatccacggg tcttcttttt ggggtacat catcactcag attccgggag 840
gctaccatgc gtctcggctg gcagccaaca gggtttctgg agctgccata cttcttacct 900
ctaccctaaa tatgctaatt ccatcagcag ccagagtga ttatggatgt gtcattcttg 960
tcagaatact gcagggaactt gttgaggggtg tgacctacc agcatgtcat gggatatgga 1020
gcaaattggc cccacctcta gagaggagta gactggcaac cacctctttt tgtggttcct 1080
atgccggagc tgtgattgca atgcttttag ctggcattct tgtgcagtac actggctggg 1140
cttcagtgtt ttatgtctac ggaagctttg gaattggtct gtacatgttt tggcttttgg 1200
tgtcttatga aagtcctgca aagcatccta ctattacaga tgaagaacgt aggtacatag 1260
aagaaagcat tggagagagt gcaaactctt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat 1320
ggaggaagtt ttttacatcc atgccagtct atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa 1380
gctggacttt ttatttattg cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat 1440
ttgaaattag caagggttgg atgtatctct ctgtgccaca cttagtaatg acaattattg 1500
tgctatttgg gggacaaatt gcagattttc taagaagcaa gcagattctt tcaactacga 1560
cagtgaagaa gatcatgaat tgtggtggtt ttggcatgga agccacactg ctctggtctg 1620
ttggctattc tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1680
gtggatttgc tatactctgg ttcaatgtta accacttgga tatcgctcca agatatgcca 1740
gtatcttaat gggcatttct aatggtgttg gcacattgtc aggaatgggt tgcctatca 1800
ttgttggtgc aatgacaaaag aataagtcac gtgaagagtg gcagtatgtc ttctgatcg 1860
ctgccctagt ccatatgggt ggagttatat tttatgcaat atttgctca ggagagaaac 1920
aaccctgggc agaccgggag gaaacaagtg aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg 1980
aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatggg accaccaagt 2040
cttatgggtc cacaacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaaagagg 2100
aatgtgtaca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat 2160
aacaaaacta attactggat ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac 2220
aaaaatttta aaaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgctg 2280
taaaaatgaa aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taaaattgtg 2340
aagttccatc atttccattc aagtcaccca ttcttgcaat tgtgacttaa aggttgactg 2400
gtcaaaattg tagaaacaag tagttaccca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
atttactaaa gcacaacatc tcattctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
gcaaaatgca ctatatatt tgttactctg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
aagaaataca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
aatgtgagat attttggttag tctcaaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcacg 2820
ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca tttcaataaa atcaaacctt 2880
tcatgtagcg tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaatgt 2940
attttttatt acaactttgt actggttgta acttgcatca gaaaaaaaag agagatatat 3000
aaaccacaaa gaacttaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
taagaacaaa gaaatagaaa atggtttaga tatctttctt ccttcataat taaatactat 3120
atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatatattg 3180
taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaaat atttgtctta aatatatagg 3240

```

ES 2 288 556 T3

```

acaatacatt atattaaaat ggtctctctc tatatatatc tgtatatctt atacatgtcc 3300
atacacagaa acataataaa caatcttcac acgaaaccaa aaatagcata cacctaattgt 3360
tgggtaggg aattgcaatt tctactttca tagagtcata gaattttagg tggggaagag 3420
gcattttgct tgtcatttct taatataact caacaagaat tgcaacattt gtgtaccaag 3480
caataagtgc aatgcataaa atttctgtc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag 3540
ctgtttgggt ggttggaata attttatttt tcttttaaaa aagctaacat cagacccctt 3600
tataatgtcc taaaattatg ataatacatt tcccaattca actcaaaata ttattggtgt 3660
atattgtcta ttctggatat ttgatctgtt taatgtactg tgctagtgcac tggaggccct 3720
gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt ttaaaaaaat gcaaatcatt ctttacctta 3780
agaaaaaaaa aatacccttt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt 3840
gttggttga atgaaaatat gtggactgtc attttgttgc agcaaaaaag tgtaataaaa 3900
atgctctatt tatccttttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Fig. 2 b)

```

1    MESVKQRILA PGKEGLKNFA GKSLGQIYRV LEKKQDTGET IELTEDGKPL EVPERKAPLC
61   DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISFGIRCN LGVAIVDMVN NSTIHRGGKV IKEKAKFNWD
121  PETVGMIHGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA ANRVFGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV
181  IFVRILQGLV EGVTPACHG IWSKWAPPLE RSRLATTSFC GSYAGAVIAM PLAGILVQYT
241  GWSSVFYVYG SFGMVWYMFV LLVSYESPAK HPTITDEERR YIEESIGESA NLLGAMEKFK
301  TPWRKFFTSM PVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFEEV FGFEISKVGM LSAVPHLVMT
361  IIVPIGGQIA DFLRSKQILS TTTVRKIMNC GGFGMEATLL LVVGYSHTRG VAISFLVLAV
421  GFSGFAISGF NVNHLDIAPR YASILMGISN GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREEWQYVF
481  LIAALVHYGG VIFYAIFASG EKQPWADPEZ TSEEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT
541  TKSYGATTQA NGGWPSGWEX KEEFVQGEVQ DSHSYKDRVD YS

```

Fig. 2c)

```

agacagtaag gttcttttgc ttttttccct tacacaagga ttcgatgacg tttttgggtca 60
atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gtttaagactt caaaaccggg aattttacgtt 120
gtttttcggg gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgcgcca aataccacgg 180
cactgcgcgc gccctcggcc accggtacct ccccttccaa tgagactttg tgactgtgtg 240
taccaattct cctatttagga aaccgtggg ctgaatgcag ctattccgtt gtactctctt 300
tctcgctctc cctccccctt ccaactcaca gccttgctga aaagctcatc tctgctgaga 360
agaaaaacgtt ctaccttaac ctattaagac tatgcgcaga actcgccttt catagccatc 420
acaatttaaa tctggtaagg ctggacacga gtctttacaa gaatggagtc ggtaaaacaa 480
aggatttttg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc cctcggacag 540
atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccatcgagct gacagaggac 600
ggcaagcccc tggaggtgcc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtgcttcggc 660
ctgcgcgcgc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcac ctcccttggg 720
atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatggtca acaacagcac catccaccgg 780
ggtggcaaaag ttatcaagga gaaagccaa ttttaactggg acccgagac tgtggggatg 840
attcacgggt cgttcttctg gggctatata atcacgcaga ttccgggagg atacatcgca 900
tcgcgactgg ctgctaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttacctc taccctcaat 960
atgctgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcatctttgt tagaataattg 1020
caaggacttg tggagggcgt cacctaccca gcctgtcacg ggatatggag caagtgggccc 1080
cctcctttgg agaggagtag gttggctacc acctccttct gtggttctta tgcctggagca 1140
gtcattgcaa tgcccttagc tggatctctg gtgcagtaca ctggatggtc ttcagtattt 1200
tacgtatatg gaagctttgg tatggtctgg tatatgttct ggcttctggg gtcttacgag 1260
agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc 1320
ggggagagcg caaatctgtt agggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagttt 1380
ttcacatcca tgcccgctca tgcgataatt gttgcaaact tctgcaggag ttggactttt 1440
tatttactgc tcatcagtea accagcttat ttcgaggagg tttttggatt tgaaatcagc 1500
aaggttggca tgttgtctgc ggtccacac ctggtcatga caatcattgt gcctatcggg 1560
gggcaaattg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaag 1620
atcatgaact gcggggggtt tggcatggaa gccacactgc ttctggttgt tggctactct 1680
catactagag ggggtggccat ctccctcttg gtgcttgacg tgggattcag tggatttgc 1740
atctctggtt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatatgccag tatcttaatg 1800
ggcatttcaa atggtgttg caagctgtcg ggaatggctt gccgatcat tgttgggtgca 1860
atgacgaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggtc 1920
cactatgggt gagtcatatt ttatgcacta ttgacctcag gagagaagca accttgggca 1980
gacctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa 2040
gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccaccaatc ctacggcgcc 2100
acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggcggggaga aaaaggaaga atttgtgcaa 2160
gaaagtgcgc aagacgcgta ctccataaag gaccgagatg attattcata accgaagctag 2220
ttgctggatt cctttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgattgcaca aaatcatttt 2280
aagaaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttgctg ttcaaaaaat 2340
aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtcccat caagtgcaat ctgtggcgcc 2400
agtcacgtga cgccatttcc attcaggcca ttcgtccttt tctgttgtga tttaaagggt 2460
tcctgtagaa ataagtaggt attcgttggg tccatcacca cgttagagag tacaactaca 2520
acagttggca catgtcatcc tacggaagtt aggaagccaa agctactgga ttatgtgaac 2580
tgcatttatt tatttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga 2640
catagtagaa ctggaaagat ggctagattg ggtactgacg ataactattg tgtgtatatc 2700
atggagtggc tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg 2760
aattattact aggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat ctccaaaag cttatcttgc 2820
agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg 2880
gaggagtatg ctccatgctc tccattcac tacctgacag tatcaaacct tcacatttca 2940
atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaatataaga 3000
agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg 3060
aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat 3120
agcccttaa atgcaatatt aacaacaaaa atatataaga aatttagata atcttcttgg 3180

```

ES 2 288 556 T3

```

ataactagag actatatgga actcacacca caaagctata tataatatga aaagataaac 3240
aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaatgt cccattttaag aggtatttgt 3300
cttgagtata tagtacaaag tatattaaaa ttatatctac atccctgtat atctttataca 3360
tatccactca cacaaacata acaaatactt ttcacacaga accaaaaaca agcatacacc 3420
taatgttggg tttggggatt gcaattttcta ctttcataga gtcatagaat tttagatggg 3480
aaaaaaaaag gcatttttgc cgtcattttct taatataatt aattcaacag gaactgcaac 3540
atgtgtgtac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gtgtgtaaac tatccccata 3600
ctgcttgtgg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcggag ctctttacaa 3660
tgttttgcgc tgataagaat gcacatccca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgttt 3720
acctgtctgt tttgggtatt tggctctgtt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggccctg 3780
ctactgcgaa tataaaacgt gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga 3840
aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgaccat aacccttgc 3900
gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttgctgc gaagcaagtg ttaataaaat 3960
gttctattta aaaaaaaaaa aa

```

Fig. 2d)

```

1   MESVKQRILA PGKEGIKNFA GKSLGQIYRV LEKKQDNRET IELTEDGKPL
51  EVPEKKAPLC DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISFGIRC� LGVAIVDMVN
101 NSTIHRGGKV IKEKAKFNWD PETVGMIHGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA
151 ANRVFGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV IFVRILQGLV EGVTPACHG
201 IWSKWAPPLE RSRLATTSFC GSYAGAVIAM PLAGILVQYT GWSSVIFYVYG
251 SFGMVWYMFV LLVSYESPAC HPTITDEERR YIEESIGESA NLLGAMEKFK
301 TPWRKFFTSM PVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFEEV FGFEISKVGM
351 LSAVPHLVMT IIVPIGGQIA DFLRSKQILS TTTVRKIMNC GGFGMEATLL
401 LVVGYSHTRG VAISFLVLAV GFSGFAISGF NVNHLDIAPR YASILMGISN
451 GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREEWQYVF LIAALVHYGG VIFYALFASG
501 EKQPWADPEE TSEEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT TKSYGATSQE
551 NGGWPNGWEK KEEFVQESAQ DAYSYKDRDD YS

```

Fig. 2e)

```

1      ggcaagagggc tcagtccttaa ttccactctg ccactctgcc gcagagcaca attacgccgg
61     cgcgatggga ggagaccatg ttaaggcagg aagctaacag cagccgctca cctgaggcct
121    aggaagctcc caagggttct gagagctatg agctctgatc agcaaagtca ccattttaga
181    cagtaggggtt cttttgcttt ttcccttaca caagggttcg atgacgtttc tggccaatct
241    gattaaaaga cageggattt gattgcgata agacttcaaa accgggaatt tacgttgttt
301    ttcgggtgagg tgacttccag aacagggact catcagcacc cgcccaaata ccacggcact
361    gcgcgcgccc tcggccaccg gatcctcccc ttccaatgag actttgtgac tttgtgtacc
421    aattctctta ttaggaaacc cgtgggctgc atgcagctat tctgttgtag tctctttctc
481    gccctccctc ccctctccaa ctccacgcct tgctggaaag ctccactctg ctgagaagaa
541    aaagctctac cttaaccaac taagactatg cgcagaatcc gtctttcata gccacaacaa
601    tttaaatctg gtaaggctgg acaccagtct ttacaagaat ggagtcggta aaacaaagga
661    ttttggcccc ggggaaagag gggataaaga attttgcctg aaaatccctc ggacagatct
721    acagggtgct ggagaagaag caggacaacc gagagaccat cgagctgaca gaggacggta
781    agcccttgga ggtgcctgag aagaaggctc cgctatgcga ctgcacgtgc ttcggcctgc
841    cgcgcgccta catcatagcc atcatgagcg gcctcggctt ctgcatatcc ttcggcatcc
901    gctgtaacct gggcgtggcc atcgtggaca tggccaacaa cagcactatc caccgcggag
961    gcaaagtatt caaggagaaa gccaaattta actgggaccc cgagaccgtg gggatgatcc
1021   acggatcggt cttctggggc tatacatca cccagattcc aggaggatat atcgcatcgc
1081   ggctggctgc taaccgggtc tttggggctg cgatactgct cacctctacc ctcaatatgc
1141   tgatcccatc tgcagccaga gtgcattatg gatgtgtcat ctttgttagg atattgcaag
1201   gacttgtgga ggggtgtcacc taccagcct gtcattggat atggagcaag tgggccccctc
1261   ccttggaagag gtagtggtt gctacaacct ccttttctgg ttctatgct ggagcagtca
1321   ttgcaatgcc cttagctggt atccttctgc agtacactgg atggtcgtca gtattttatg
1381   tgtatggaag ctttggcatg gtctggtaca tgttctggct tctggtgtct tatgagagcc
1441   ctgcaaagca tctaccatt acagatgaag aacgtaggta catagaggag agcattggag
1501   agagcgcaaa tctgctaggt gcaatggaaa aatttaagac cccatggagg aagtttttca
1561   catccatgcc cgtctacgcg ataattgttg ccaactctg caggagctgg actttttatt
1621   tactgctcat cagtcagcca gcttattttg aggaggtttt tggatttgaa atcagcaagg
1681   ttggcatggt gtctgcagtc cctcaccttg tcatgacaat cattgtgcct atcggggggc
1741   aaattgcaga tttcctaagg agcaagcaaa ttctctcaac aactacagtg agaaagatca
1801   tgaattgtgg ggggttttggc atggaagcca cgctgcttct ggttgttggc tactctcata
1861   ctgagggggg gggcatctcc ttcttggtgc ttgcagtagg attcagtgga tttgctatct
1921   ctggtttcaa tgttaatcac ttggatattg ctccaagata tgccagtatc ttaatgggca
1981   tttcaaatgg cgttggcacg ctgtcgggga tggtttgccc tatcattgtt ggtgcaatga
2041   caaagaataa gtcccgtgaa gaatggcagt atgtcttctt cattgctgca ctcgccact
2101   atggtggagt catattttat gcactatttg cctcaggaga gaaacaacct tgggcagacc
2161   ctgaggaaac aagcgaagaa aaatgtggct tcattcacga agatgaactg gatgaagaaa
2221   cgggggacat cactcagaat tacataaatt acggtaccac caaatcttac ggtgctacct
2281   cacaggagaa tggaggctgg cctaaccggc gggagaaaaa ggaagaattt gtgcaagaag
2341   gtgcgcaaga cgcgtacacc tataaggacc gagatgatta ttcataacga tgctagtgtc
2401   tggattcatt tgtagtgtt gtgaatcaat taattgtgat tgcacaaaaa taatttttaa
2461   aatgtggtgt gaacatgtaa acatatcaac caagcaagtc ttgctgttca aaaaaaaaaa
2521   aaaaaaaaaa

```

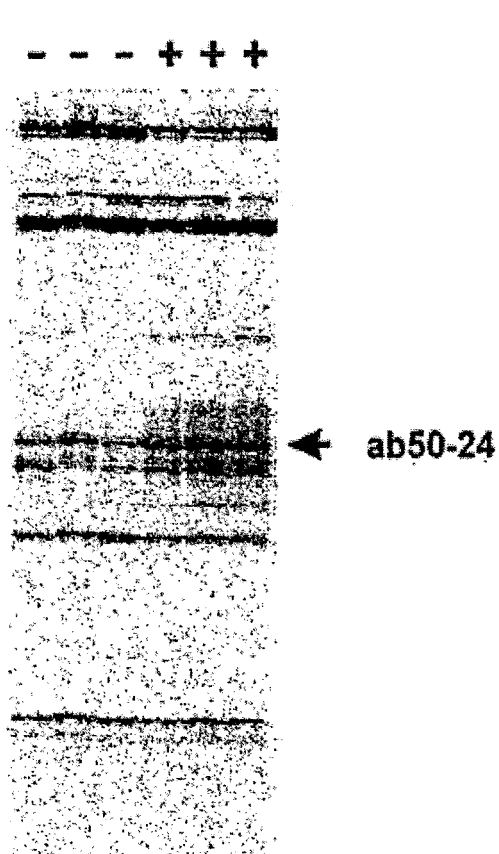
Fig. 2f)

```

1   MESVKQRILA PGKEGIXNFA GKSLGQIYRV LEKKQDNRET IELTEDGKPL EVPEKKAPLC
61  DCTCFGLPRR YIIAIMSGLG FCISFGIRCN LGVAIVDMVN NSTIHRGGKV IKEKAKFNWD
121 PETVGMIHGS FFWGYIITQI PGGYIASRLA ANRVFGAAIL LTSTLNMLIP SAARVHYGCV
181 IFVRILQGLV EGVTPACHG INSKWAPPLE RSRLATTSPC GSYAGAVIAM PLAGILVQYT
241 GWSSVFYVYG SFGMVWYMFV LLVSYESPAK HPTITDEERR YIEESIGESA NLLGAMEKFK
301 TPWRKFFTSM PVYAIIVANF CRSWTFYLLL ISQPAYFREV PGFEISKVGM LSAVPHLVMT
361 IIVPIGGQIA DFLRSKQILS TTTVRKIMNC GGFGMEATLL LVVGYSHTRG VAISFLVLAV
421 GFSGFAISGF NVNHLDIAPR YASILMGISN GVGTLSGMVC PIIVGAMTKN KSREEWQYVF
481 LIAALVHYGG VIFYALFASG EKQPWADPEE TSEEKCGFIH EDELDEETGD ITQNYINYGT
541 TKSYGATSQE NGGWPNWWEK KEFVQEGAQ DAYTYKDRDD YS

```

FIG 3)



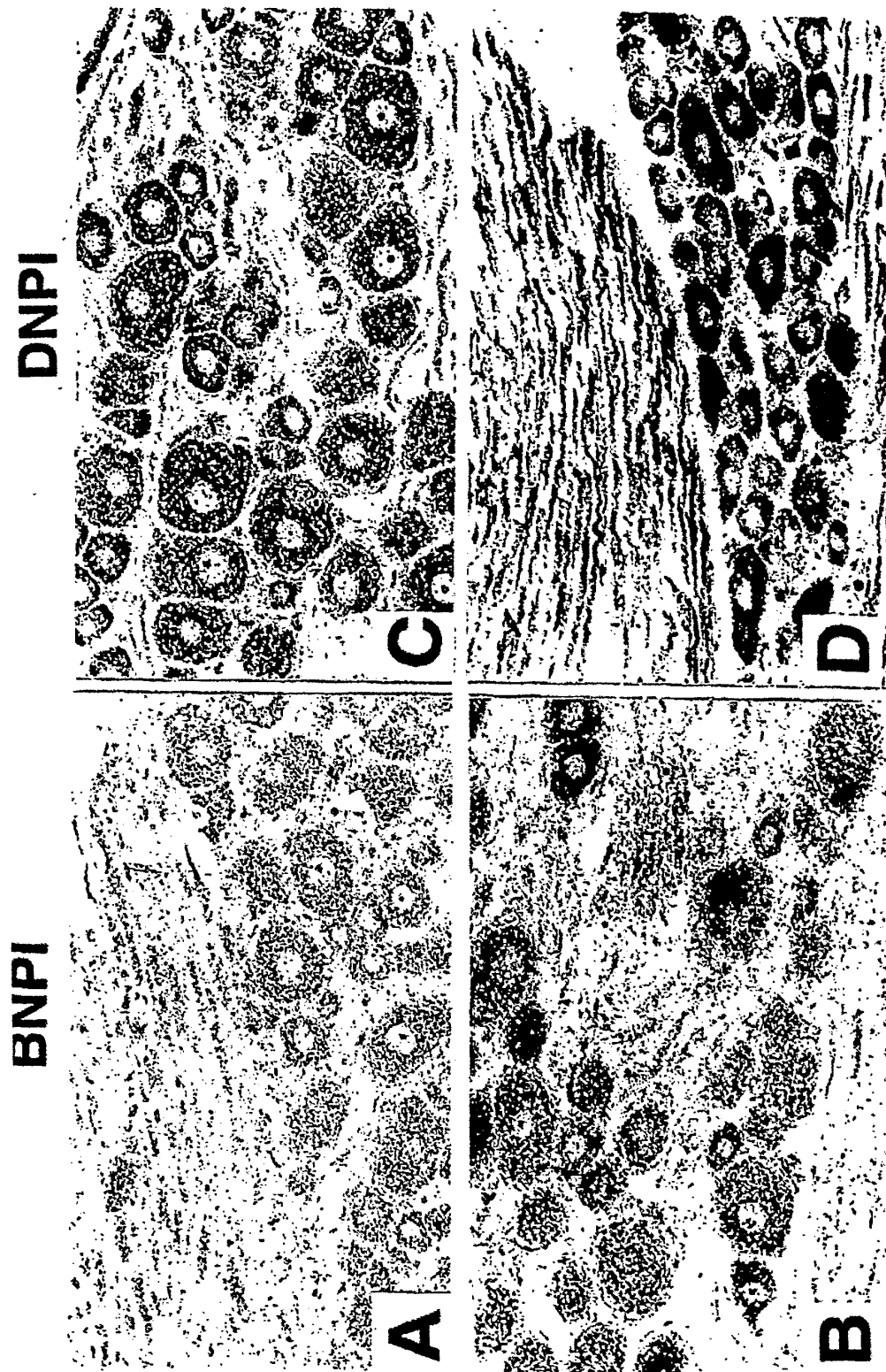


FIG 4)

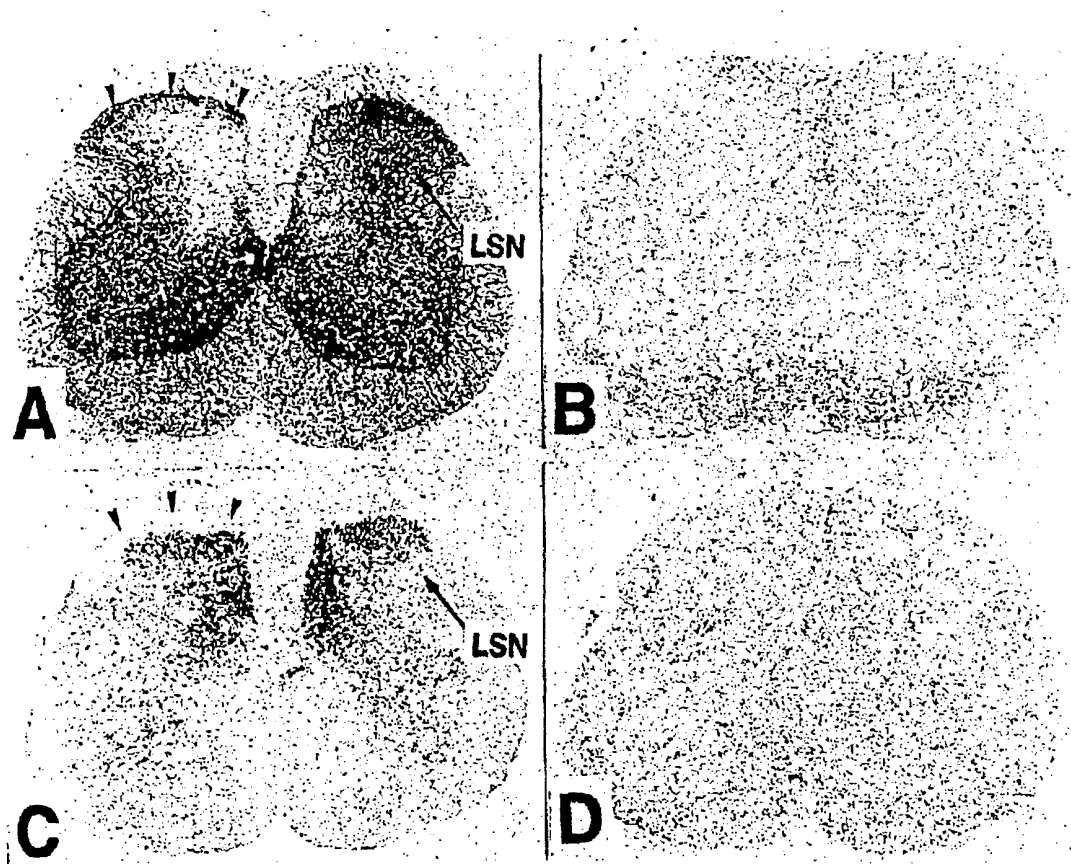


FIG 5)

FIG 6)

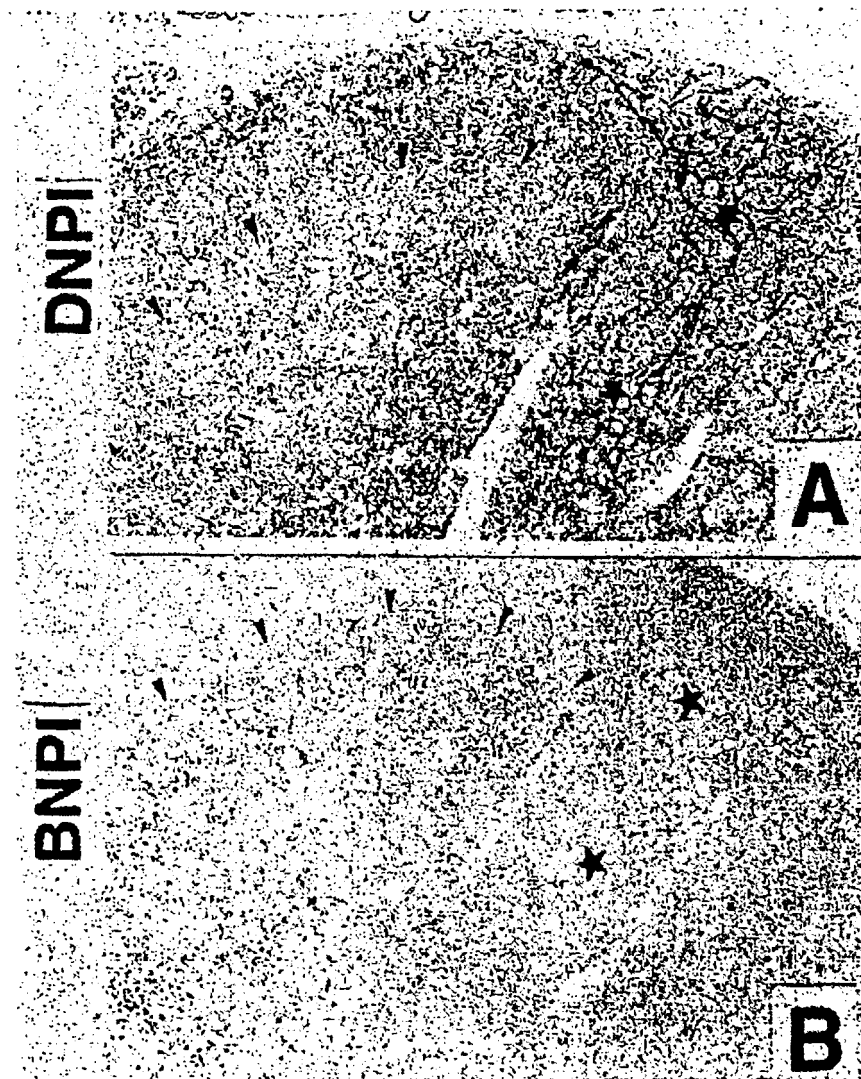


FIG 7)

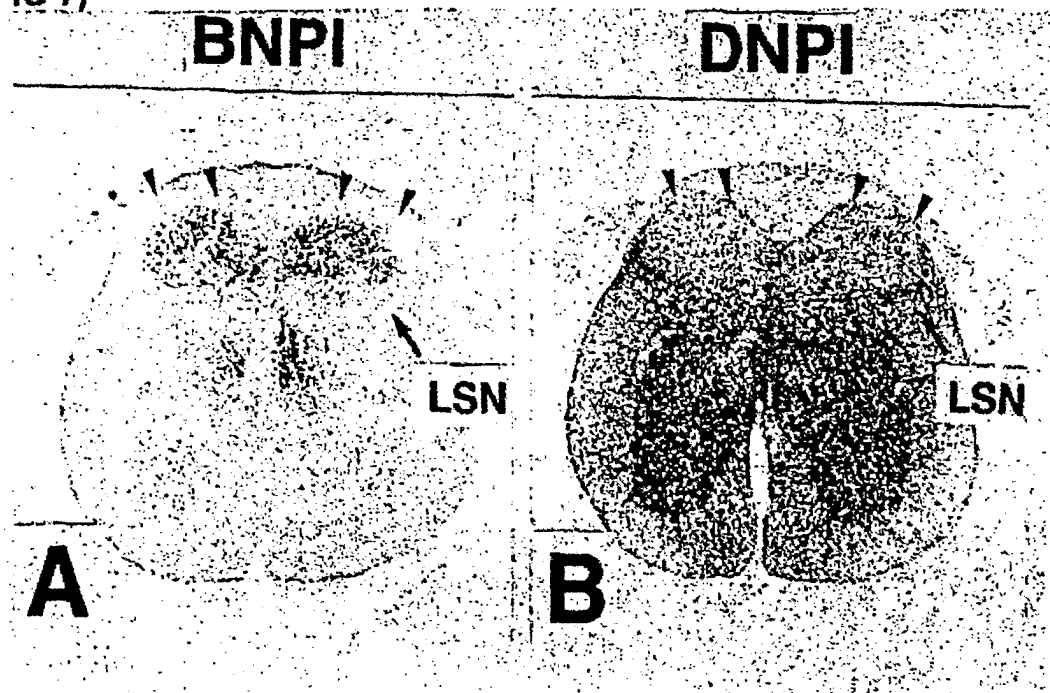


FIG 8)

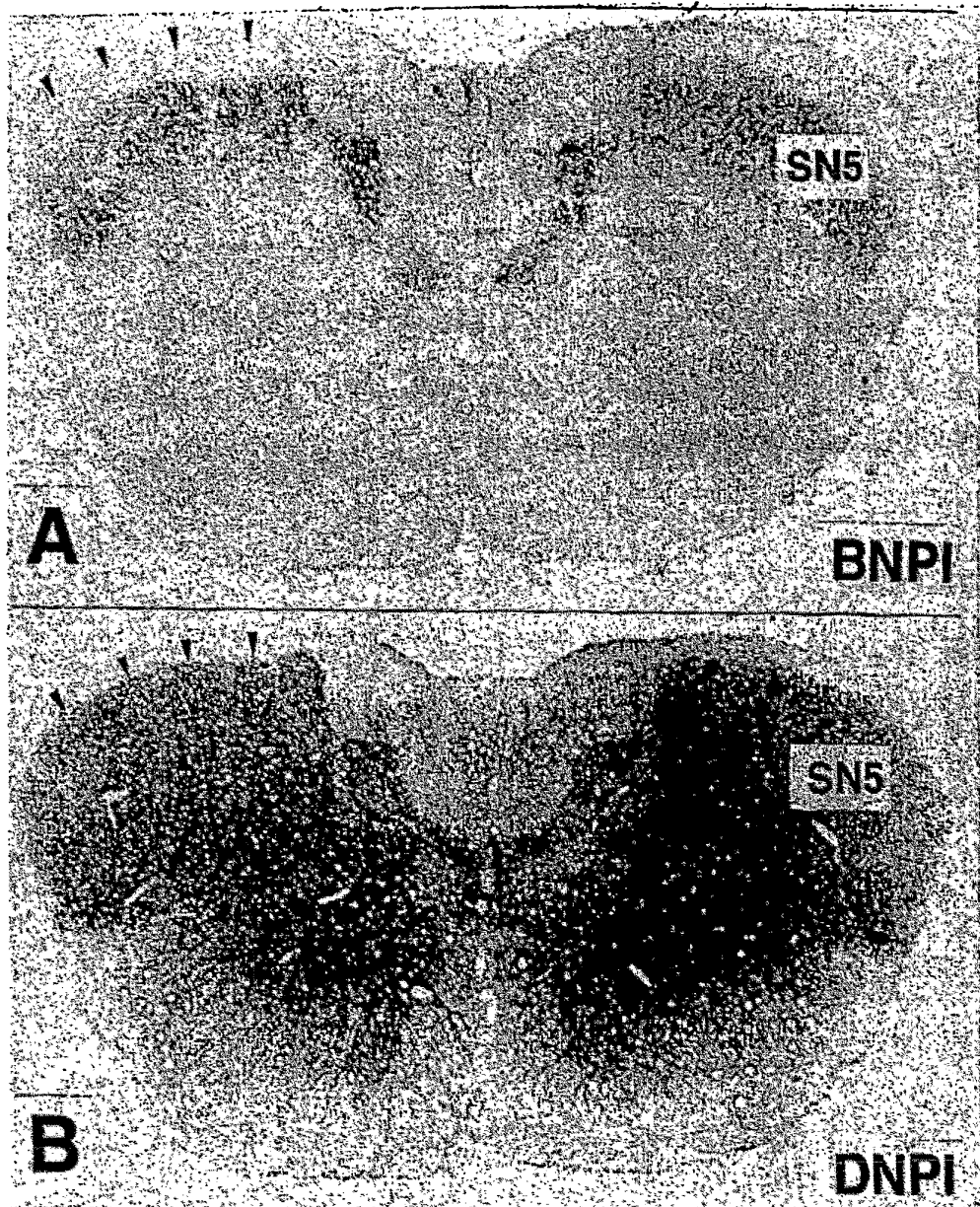


FIG 9)

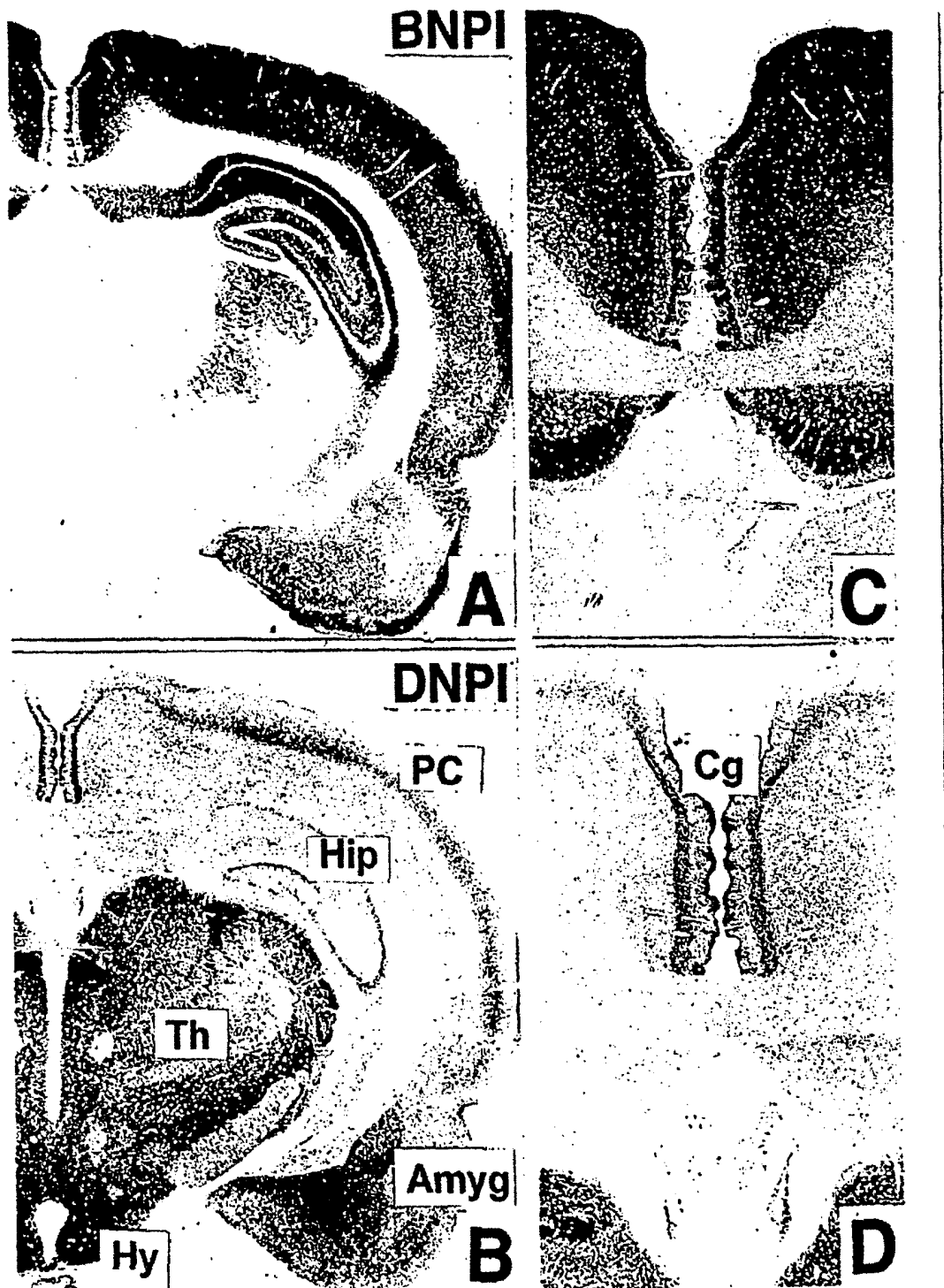
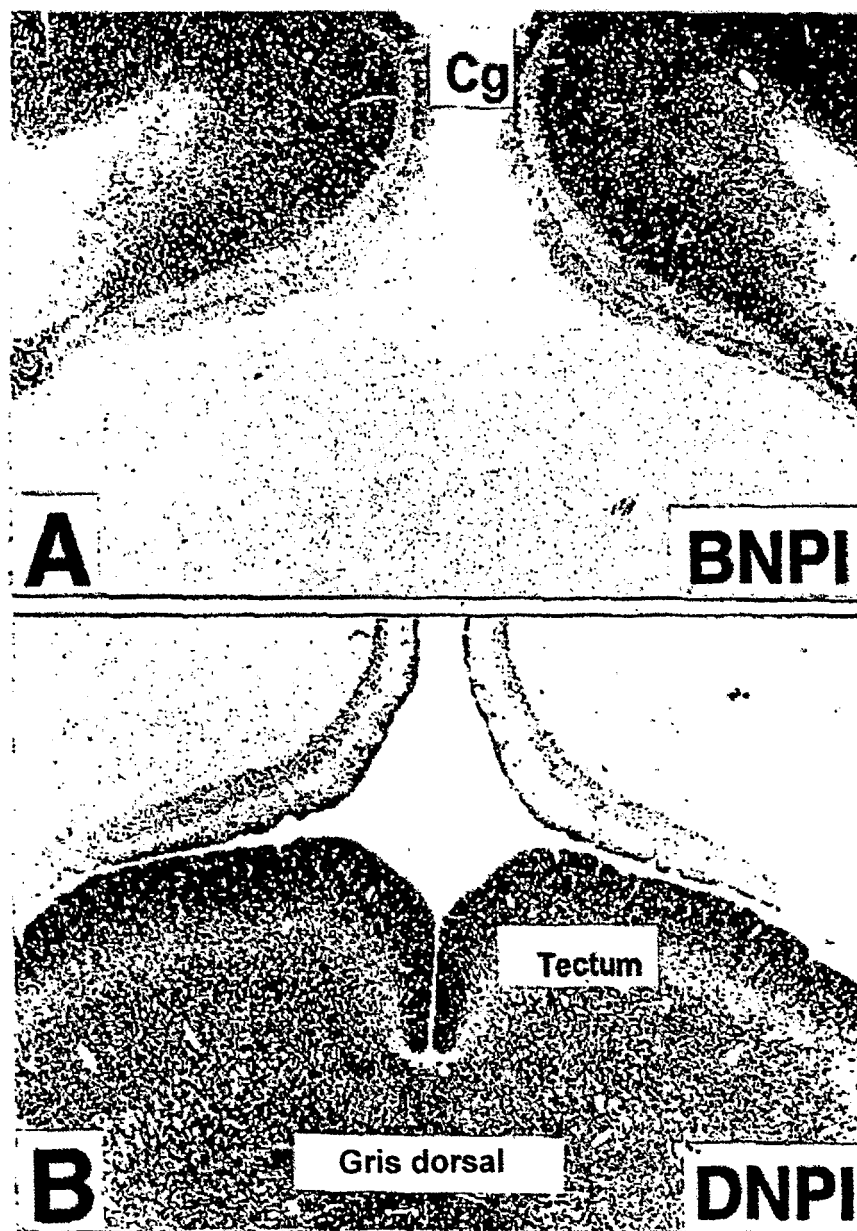


FIG 10)



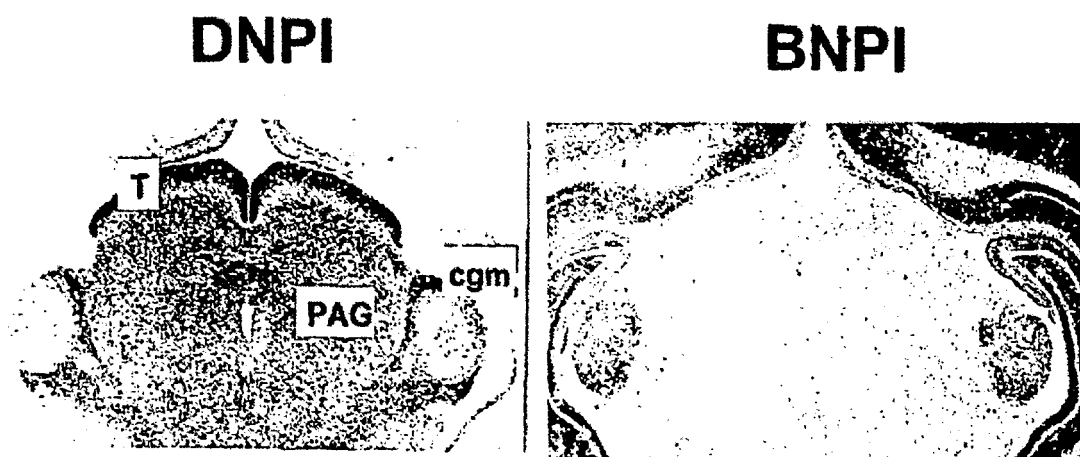
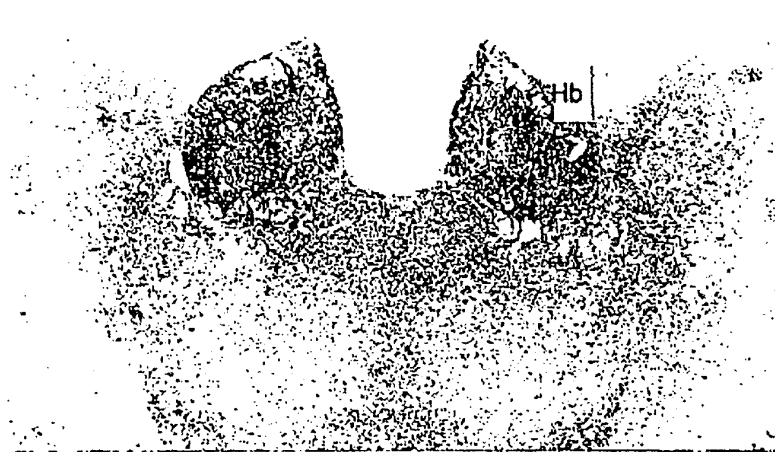


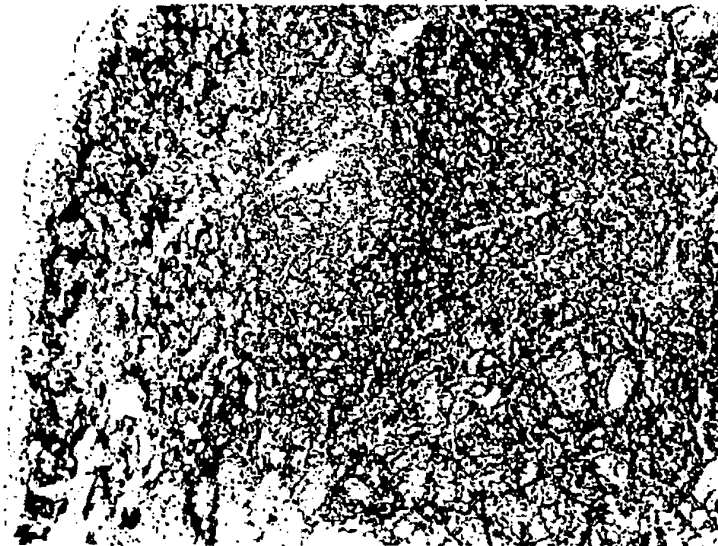
FIG 11)

FIG 12)

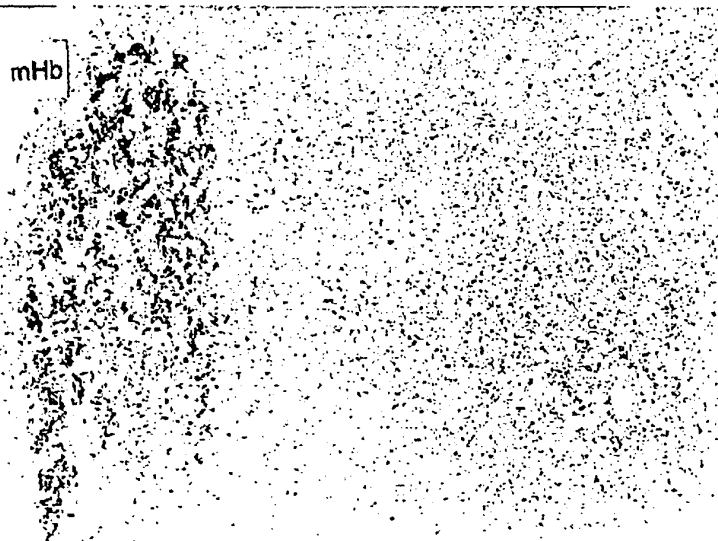
DNPI



DNPI



BNPI



ES 2 288 556 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GRÜNENTHAL GmbH
 5 <120> Procedimiento de screening con BNPI y DNPI
 <130> GRA 3069-PCT
 10 <140> PCT/EP 02/06484
 <141> 2002-06-13
 15 <150> DE10128541.8
 <151> 2001-06-13
 <160> 14
 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 2366
 25 <212> DNA
 <213> *Homo Sapiens*
 30 <400> 1
 ccggcgccag gagccgccac catggagtcc cgccaggagg agtttcggaa gctagcgggt 60
 cgtgctctcg ggaagctgca ccgccttctg gagaagcggc aggaaggcgc ggagacgctg 120
 35 gagctgagtg cggatgggag cccggtagcc acgcagaccc gggacccgcc ggtgggtggac 180
 tgcacctgct tcggcctccc tcgcgcgtac attatcgcca tcatgagtgg tctgggcttc 240
 tgcctcagct ttggcatccg ctgcaacctg ggcgtggcca tcgtctccat ggtcaataac 300
 agcacgaccc accgcggggg ccacgtgggtg gtgcagaaag cccagttcag ctgggatcca 360
 40 gagactgtcg gcctcataca cggtcccttt ttctggggct acattgtcac tcagattcca 420
 ggaggattta tctgtcaaaa atttgagacc aacagagttt tcggctttgc tattgtggca 480
 acatccactc taaacatgct gatccctcca gctgcccgcg tccactatgg ctgtgtcacc 540
 ttcgtgagga tcctgcaggg gttggtagag ggggtcacat acccgcctg ccatgggac 600
 45 tggagcaaat gggccccacc cttagaacgg agtcgcctgg cgacgacagc cttttgtggt 660
 tcctatgctg gggcgggtgg cgcgatgcc ctcgcgggg tecttgtgca gtactcagga 720
 tggagctctg ttttctacgt ctacggcagc ttcgggatct tctggtacct gttctggctg 780
 50 ctgctctctc acgagtcctc cgcgctgcac cccagcatct cggaggagga gcgcaagtac 840
 atcgaggacg ccatcggaga gagcgcgaaa ctcatgaacc ccttcacgaa gtttagcact 900
 ccctggcggc gcttcttcac gtctatgcca gtctatgcca tcatcgtggc caacttctgc 960
 cgcagctgga cgttctacct gctgtctatc tcccagcccg cctacttcga agaagtgttc 1020
 55 ggcttcgaga tcagcaaggt aggcctgggtg tcgcgcgtgc cccacctggg catgaccatc 1080
 atcgtgcccc tcggcgggca gatcgcgga ttcctgcgga gccgcgcgat catgtccacc 1140
 accaacgtgc gcaagttgat gaactgcgga ggcttcggca tggaaagccac gctgctgttg 1200
 gtggctgggt actcgcactc caaggcggtg gccatctcct tcctggtcct agcgtgggac 1260
 60 ttcagcgggt tcgccatctc tgggttcaac gtgaaccacc tggacatagc cccgcgtac 1320
 gccagcatcc tcatgggcat ctccaacggc gtgggcacac tgtcgggcat ggtgtgcccc 1380
 atcatcgtgg gggccatgac taagcacaag actcgggagg agtggcagta cgtgttccca 1440
 65

ES 2 288 556 T3

attgcctccc tgggtgacta tggagggtgc atcttctacg ggggtctttgc ttctggagag 1500
 aagcagccgt gggcagagcc tgaggagatg agcgaggaga agtgtggctt cgttggccat 1560
 gaccagctgg ctggcagtga cgacagcgaa atggaggatg aggtgagcc cccgggggca 1620
 cccctgcac ccccgccctc etatggggcc acacacagca catttcagcc ccccaggccc 1680
 ccacccctg tccgggacta ctgacatgt gcctccact gaatggcagt ttccaggacc 1740
 tccattccac tcatctctgg cctgagtgc agtgtcaagg aacctgctc ctctctgtcc 1800
 tgectcaggc ctaagaagca ctctcccttg ttccagtgcc tgtcaaatac tctttccttc 1860
 ccaattgcct ctcaggggta gtgaagctgc agactgacag tttcaaggat acccaaattc 1920
 ccctaaaggc tccctctcca cccgttctgc ctcagtgggt tcaaatactc cctttcaggg 1980
 ctttatttga atggacagtt cgacctctta ctctctcttg tggttttgag gcacccacac 2040
 ccccgcttt cctttatctc cagggactct caggctaacc ttgagatca ctcagctccc 2100
 atctccttcc agaaaaattc aaggctctcc tctagaagtt tcaaatactc cccaactctg 2160
 ttctgcatct tccagattgg ttttaaccaat tactcgtccc cgccattcca gggattgatt 2220
 ctcaccagcg tttctgatgg aaaatggcgg ttccaagtcc ccgattccgt gcccaactca 2280
 catctccct accagcagat tctgcgaaag caccaaattt ctcaagacct tcttctccct 2340
 agcttagcat aatgtctggg gaaaca 2366

<210> 2
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 2

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

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 2716

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

cgataagctt gatatcgaat tccggactct tgctcgggcg ccttaaccgc gcgttcggtt 60
catcccgag cgcagttct gcttaccaa agtggccac taggcactcg cattccacgc 120
ccggctccac gccagcgagc cgggcttctt acccatttaa agtttgagaa taggttgaga 180
tcgtttcggc cccaagacct ctaatcattc gctttaccgg ataaaactgc gtggcggggg 240

ES 2 288 556 T3

5 tgcgtcgggt ctgcgagagc gccagctatc ctgagggaaa cttcggaggg aaccagctac 300
 tagatgggtc gatttagctct tgcgccctat acccaggtcg gacgaccgat ttgcacgtca 360
 ggaccgctac ggacctccac cagagtttcc tctggcttcg ccctgcccag gcgatcggcg 420
 ggggggaccc gcggggtgac cggcggcagg agccgccacc atggaggtcc gccaggagga 480
 gtttcggaa gtagcgggtc gtgctctcgg gaagctgcac cgccttctgg agaagcggca 540
 ggaaggcgcg gagacgctgg agctgagtgc ggatgggcgc ccggtgacca cgcagaccgc 600
 10 ggaccgcgcg gtggtggact gcacctgctt cggcctccct cgcgctaca ttatcgccat 660
 catgagtggc ctgggcttct gcatcagctt tggcatccgc tgcaacctgg gcgtggccat 720
 cgtctccatg gtcaataaca gcacgaccca ccgcgggggc cagtggtggg tgcaaaagc 780
 ccagttcagc tgggatccag agactgtcgg cctcatcacac ggctcccttt tctggggcta 840
 15 cattgtcact cagattccag gaggatttat ctgtcaaaaa ttgacagcca acagagtttt 900
 cggctttgct attgtggcaa catccactct aaacatgctg atccccctag ctgcccgcgt 960
 ccactatggc tgtgtcatct tcgtgaggat cctgcagggg ttggtagagg gggtcacata 1020
 cccgcctgc catgggatct ggagcaaatg ggcgccacc ttagaacgga gtcgcctggc 1080
 20 gacgacagcc ttttgtggtt cctatgctgg ggcggtggc gcgatgcccc tcgcgggggt 1140
 ccttgtgcag tactcaggat ggagctctgt tttctacgtc tacggcagct tcgggatctt 1200
 ctggtacctg ttctggctgc tcgtctctca cgagtcccc gcgtgcacc ccagcatctc 1260
 25 ggaggaggag cgcaagtaca tcgaggacgc catcgagag agcgcgaaac tcatgaaccc 1320
 cctcacgaag tttagcactc cctggcggcg ctctctcacg tctatgccag tctatgccat 1380
 categtggcc aacttctgce gcagctggac gtctctacgt ctgctcatct ccagcccca 1440
 ctacttcgaa gaagtgttcg gcttcgagat cagcaaggta ggcctgggtg ccgcgctgcc 1500
 30 ccacctggtc atgaccatca tcgtgcccct cggcggccag atcgcggaact tcctgcggag 1560
 ccgcgcgcatc atgtccacca ccaacgtgcy caagttgatg aactgcggag gcttggcat 1620
 ggaagccacg ctgctgttgg tggcggcta ctgcactcc aaggcggtg ccactcctt 1680
 cctggtccta gccgtgggtc tcagcggctt cgccatctct gggttcaacg tgaaccacct 1740
 35 ggacatagcc ccgcgctacg ccagcatcct catgggcatc tccaacggcg tgggcacact 1800
 gtcgggcatg gtgtgcccc tcatcgtggg ggccatgact aagcacaaga ctggggagga 1860
 gtggcagtag gtgttcctaa ttgcctccct ggtgcactat ggaggtgtca tcttctacgg 1920
 40 ggtcctttgt tctggagaga agcagccgtg ggcagagcct gaggagatga gcgaggagaa 1980
 gtgtggcttc gttggccatg accagctggc tggcagtgc gacagcgaaa tggaggatga 2040
 ggctgagccc ccgggggcac cccctgcacc ccgcctctc tatggggcca cacacagcac 2100
 atttcagccc ccagggcccc caacccctgt ccgggactac tgaccatgtg cctccactg 2160
 45 aatggcagtt tccaggacct ccattccact catctctggc ctgagtgaca gtgtcaagga 2220
 accctgctcc tctctgtcct gcctcaggcc taagaagcac tctcccttgt tcccagtgt 2280
 gtcaaatcct ctttccctcc caattgcctc tcaggggtag tgaagctgca gactgacagt 2340
 ttcaaggata ccaaatcc cctaaagggt ccctctccac ccgttctgce tcagtgggtt 2400
 50 caaatctctc ctttcagggc tttatttgaa tggacagttc gacctcttac tctctcttgt 2460
 ggttttgagg caccacacac cccgcttct ctttatctcc agggactctc aggetaacct 2520
 ttgagatcac tcagctccca tctcctttca gaaaaattca aggtcctcct ctagaagttt 2580
 55 caaatctctc ccaactctgt tctgcactct ccagattggt ttaaccaatt actcgtcccc 2640
 gccattccag ggattgatcc tcaccagcgt ttctgatgga aaatggcggg aattcctgca 2700
 gcccggggga tccact 2716

60 <210> 4
 <211> 560
 <212> PTR
 <213> *Homo Sapiens*
 65

ES 2 288 556 T3

<400> 4

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

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

	500	505	510
5	His Asp Gln Leu Ala Gly Ser Asp Asp Ser Glu Met Glu Asp Glu Ala		
	515	520	525
10	Glu Pro Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Thr		
	530	535	540
15	His Ser Thr Phe Gln Pro Pro Arg Pro Pro Pro Pro Val Arg Asp Tyr		
	545	550	555 560

<210> 5
 <211> 2024
 <212> DNA
 <213> *Rattus Norvegicus*

<400> 5

```

25      gaattcggca cgagcggagc tgcggggccg ggccggggccg gggcggaccc cgggatcccg 60
      gacgcggccg cccggggccc cgggcggggg gattggcagg ggacccgcgt gggcacagcc 120
      accatggagt tccggcagga ggagtttcgg aagctggcgg ggcgcgccct ggggagggctg 180
30      caccggttac tggagaagcg gcaggaaggc gcggagacat tggagctgag cgcgcacggg 240
      cgcccagtga ccacacacac gcgggacccg ccgggtgggtg actgcacttg ctttggcctc 300
      cctcgcgcgt acatcatcgc gatcatgagc ggtctggggt tctgcateag ctttggcate 360
      cgctgcaacc tgggcgtggc catcgtatcc atggtcaaca acagtacaac ccaccgtggg 420
35      ggccacgtgg tgggtgcagaa agcccagttc aactgggac cagagactgt cggcctcata 480
      catggctcct ttttctgggg gtacattgtc actcagattc ctggaggatt tatctgccaa 540
      aaattcgcag ccaacagggt ctttggcttt gccattgtgg ctacctccac cctaaatatg 600
      ttgatccctt cagcagcccg tggtcactat ggctgtgtca tcttcgtgag gatccttcag 660
40      ggattgggtg agggggtcac ataccctgct tgccatggca tctggagcaa atgggcccct 720
      cccttagaac ggagtcggct ggcgacgaca gcccttttgcg gttcctatgc cggggcagtg 780
      gttgccatgc ctctggctgg ggtcctggta cagtattcag gatggagttc tgtcttctat 840
45      gtctatggca gcttcgggat cttttggtac ctggtctggt tgcctgtctc ctacgagtca 900
      cctgcactac accccagcat ctccgaggag gagcgcaaat acattgagga tgccatcgga 960
      gaaagcgcga agctcatgaa ccctgttacg aagtttaaca caccctggag gcgcttcttt 1020
      acctccatgc cggctctatgc catcattgtc gccaaacttt gccgcagctg gactttctac 1080
50      ctgctcctca tctcccagcc cgcctacttt gaagaagtgt tcggctttga gatcagcaag 1140
      gtgggactgg tgcgggcact gcctcacctt gtcagtacta tcatcgtacc catcggaggc 1200
      cagatcgccg acttcctgcg cagtcgtcat ataatgtcca cgaccaatgt gcgaaagctg 1260
      atgaactgcg ggggtttcgg gatggaagct acgctgctgc tgggtggtcg atactcacac 1320
55      tccaagggcg tggccatctc cttcctggtc ctggctgtgg gcttcagtgg ctttgctatc 1380
      tctgggttta acgtgaacca cttggacatc gccctcgat atgccagcat cttgatgggc 1440
      atttccaatg gcgtgggcac actgtctggg atggtgtgcc ccatcctcgt ggggtgcaatg 1500
60      accaagcaca agacgcggga ggagtggcag tacgtgttcc tcatagcctc cctggtgcac 1560
  
```

ES 2 288 556 T3

```

tatggaggtg tcatcttcta tggggtcttt gcttcgggag agaaacagcc gtgggcagag 1620
ccggaggaga tgagcgagga gaagtgtggc tttgttgccc acgaccagct ggctggcagt 1680
gacgaaagtg aaatggaaga cgaggttgag cccccggggg caccctccgc acctccgcct 1740
tctacggggg ccacacacag cacagttcag cctccaagge cccaccctcc tgctcgggac 1800
tactgaccac gtgcctccca ctggtgggca gtttccagga cctccactcg atacacctct 1860
agcctaaccg gcagtgtcga ggaacccccc tctctctctg cctcaggctt aagatgcaag 1920
tcttcccttg tgcccagtgc tgtccgacca gccctctctc cttctcaact gcctcttgca 1980
ggggtgaagc tgcacactag cagtttcaag ctctgtccga attc 2024

```

<210> 6

<211> 560

<212> PTR

<213> *Rattus Norvegicus*

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Pro Ser Ala Ala Arg Val His Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg
          165             170             175

```

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 3946

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 7

cgtttaaaag ccatacagatt tgagagcaat aagtcttcaa aaccgggaat ttacattggt 60
tttcagctga ccgacttcca ggaaaaggac tcaaccgcat ctacccaaat accgtggcac 120
tgcttgcgct ctttgccacc ggatactccc cttccaatga gactttctga ttgtgtctac 180
caactctcct attaggaac ccgtgggttg catgcageta ttctgttgta ttctcattct 240
cactctccct cccttctctc actctcactc ttgctggagg cgagccacta ccattctgct 300
gagaaggaaa agcccgcaac tactttaaga gattaagaca atatgcgcaa tcctcgccctt 360
tcctagcaat cactatttaa atctggcaag aactgacaac agtctttgca agaatggaat 420
ccgtaaaaca aaggatthttg gccccaggaa aagaggggct aaagaatttt gctggaaaat 480
cactcggcca gatctacagg gtgctggaga agaagcaaga caccggggag acaatcgagc 540
tgacggagga tgggaagccc ctagaggtgc ccgagaggaa ggccgctg tgcgactgca 600
cgtgcttcgg cctgccccgc cgtacatta tcgcatcat gagcggectg ggcttctgca 660
tctccttcgg tatcggctgc aacctggcg tggccattgt ggacatggtc aacaacagca 720

ES 2 288 556 T3

ccatccaccg cgggggcaag gtcacccaagg agaaagccaa attcaactgg gacccggaaa 780
 ccgtggggat gatccacggg tccctctctt ggggctacat catcactcag attccgggag 840
 gctacatcgc gtctcggctg gcagccaaca gggttttcgg agctgccata cttcttacct 900
 ctaccctaaa tatgctaatt ccatcagcag ccagagtgc tttatggatgt gtcattcttg 960
 tcagaatact gcagggactt gttgaggggt tgacctacce agcatgtcat gggatatgga 1020
 gcaaattggg cccacctcta gagaggagta gactggcaac caccctcttt tgggttctt 1080
 atgccggagc tgtgattgca atgaccttag ctggcattct tgtgcagtac actggctggg 1140
 cttcagtgtt ttatgtctac ggaagctttg gaatggctct gtacatgttt tggcttttgg 1200
 tgtcttatga aagtcctgca aagcatccta ctattacaga tgaagaacgt aggtacatag 1260
 aagaaagcat tggagagagt gcaaattctt taggtgcaat ggaaaaattc aagactccat 1320
 ggaggaagtt ttttacatcc atgccagtct atgcaataat tgttgcaaac ttctgcagaa 1380
 gctggacttt ttattttatt cttattagtc agccagcata ttttgaggaa gtctttggat 1440
 ttgaaattag caaggttggg atgctatctg ctgtgccaca cttagtaatt acaattattg 1500
 tgctatttgg gggacaaatt gcagattttc taagaagcaa gcagattctt tcaactacga 1560
 cagtgaagaa gatcatgaat tgtggtggtt ttggcatgga agccacactg ctcttggtcg 1620
 ttggctattc tcatactaga ggggtagcaa tctcattctt ggtacttgca gtgggattca 1680
 gtggatttgc tatactctgt ttcaatgtta accacttggg tctgctcca agatatgcca 1740
 gtatcttaat gggcatttct aatggtgttg gcacattgtc aggaatggtt tgcctatca 1800
 ttgttggtgc aatgacaaag aataagtcac gtgaagagtg gcagtatgtc ttctgatcg 1860
 ctgccctagt ccatatggg ggagttatat ttatgcaat atttgcctca ggagagaaac 1920
 aacctggggc agaccgggag gaacaagtg aagaaaaatg tggatttatt catgaagatg 1980
 aactcgatga agaaacaggg gacattactc aaaattatat aaattatggt accaccaagt 2040
 cttatggtgc cacaacacag gccaatggag gttggcctag tggttgggaa aagaagaggg 2100
 aatttgtaca aggagaagta caagactcac atagctataa ggaccgagtt gattattcat 2160
 aacaaaacta attactggat ttatttttag tgtttgtgat taaattcatt gtgattgcac 2220
 aaaaatttta aaaacacgtg atgtaaactt gcaagcatat caaccaggca agtcttgetg 2280
 taaaaatgaa aacaaaacaa acccatgagg ttaccatcaa gtgcaatctg taaaattgtg 2340
 aagttccatc atttccattc aagtcattca ttcttgcat tgtgacttaa aggttgactg 2400
 gtcaaaattg tagaaacaag tagttaccca ttggattcat atgagctaaa actcatcact 2460
 atttactaaa gcacaacatc tcatcctaca aaagttaaga agccaaagct acttgatcat 2520
 gcaaaatgca cttatatatt tgttacactg tattgcaaga tagcacacag aagttggctg 2580
 cgtcaagtag aggcgacatt tattaagtga aaatcatgga gttgggatat ctctcaatta 2640
 aagaataaca ttgtgaacta tcagctacaa agttgtactg aataactatt agaattgcat 2700
 aatgtgagat attttgttag tctcctaaag gaatatcttg cagtgttttc tatgaaatgc 2760
 ttgggcacaa acacttattt ctgtgaaaga gaacatgtaa gttgaggggt atgcttcctg 2820
 ttcttccatc catttaccta atagtatgaa acagttcaca ttcaataaaa atcaaacctt 2880
 tcatgtagcg tatcacataa cttttttgca aaaaatataa aaagaaataa acttcaatgt 2940
 attttttatt acaactttgt actggttgta acttgcat taaaaaaa agagatatat 3000
 aaaccacaaa gaatctaata agaaatttat tatggagata tagcccttaa aatgcaatat 3060
 taagaacaaa gaaatagaaa atggtttaga tatctttctt ccttcataat taaatactat 3120
 atgaaacttg tgccacagag ctatatgtaa tatgaaaaga ttaacttcat agagatatg 3180
 taagtaggta attttattat ttaaagtcct attaagaat atttgtctta aatatatagg 3240
 acaatacatt atattaaaat ggtctctctc tatatatatc tgtatatctt atacatgtcc 3300
 atacacagaa acataataaa caatcttcac acgaaccua aaatagcata cacctaattg 3360
 tgggttaggg aattgcaatt tctactttca tagagtcata gaattttagg tggggaagag 3420
 gcattttgct tgtcatttct taatataact caacaagaat tgcaacattt gtgtaccaag 3480
 caataagtgc aatgcataaa atttctgtgc tgtatattac cttcattttg cttgtagtag 3540
 ctgtttgggt ggttggaaata attttatttt tcttttaaaa aagctaacat cagacccctt 3600

ES 2 288 556 T3

tataatgtcc taaaattatg ataatacatt tcccaattca actcaaaata ttattgggtgt 3660
 attttgtcta ttctggatat ttgatctgtt taatgtactg tgctagtgac tggaggccct 3720
 gctactgcaa atataaaacc taaagtttgt ttaaaaaaat gcaaatcatt ctttacctta 3780
 agaaaaaaaa aatacccttt gctttgtgcc tcaaagtgat gtaatgtgat cacagctttt 3840
 gttgtgttga atgaaaatat gtggactgtc attttgttgc agcaaaaaag tgtaataaaa 3900
 atgctctatt tatccttttt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3946

<210> 8

<211> 582

<212> PTR

<213> *Homo Sapiens*

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Cys Val Ile Phe Val Arg Ile Leu Gln Gly Leu Val Glu Gly

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

	435	440	445
5	Ser Asn Gly Val Gly Thr Leu Ser Gly Met Val Cys Pro Ile Ile Val		
	450	455	460
10	Gly Ala Met Thr Lys Asn Lys Ser Arg Glu Glu Trp Gln Tyr Val Phe		
	465	470	475 480
15	Leu Ile Ala Ala Leu Val His Tyr Gly Gly Val Ile Phe Tyr Ala Ile		
	485	490	495
20	Phe Ala Ser Gly Glu Lys Gln Pro Trp Ala Asp Pro Glu Glu Thr Ser		
	500	505	510
25	Glu Glu Lys Cys Gly Phe Ile His Glu Asp Glu Leu Asp Glu Glu Thr		
	515	520	525
30	Gly Asp Ile Thr Gln Asn Tyr Ile Asn Tyr Gly Thr Thr Lys Ser Tyr		
	530	535	540
35	Gly Ala Thr Thr Gln Ala Asn Gly Gly Trp Pro Ser Gly Trp Glu Lys		
	545	550	555 560
40	Lys Glu Glu Phe Val Gln Gly Glu Val Gln Asp Ser His Ser Tyr Lys		
	565	570	575
45	Asp Arg Val Asp Tyr Ser		
	580		
50	<210> 9		
	<211> 3982		
	<212> DNA		
	<213> <i>Rattus Norvegicus</i>		
55	<400> 9		
60	agacagtaag gttcttttgc ttttttccct tacacaagga ttcgatgacg tttttggtca 60		
	atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gttaagactt caaaaccggg aatttacgtt 120		
	gtttttcggg gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgcacca aataccacgg 180		
	cactgcgcgc gccctcggcc accggatcct ccccttccaa tgagactttg tgactgtgtg 240		
65	taccaattct cctattagga aacccggtgg ctgaatgcag ctattccggt gtactctctt 300		
	tctcgtctct cctccctctt ccaactcaca gccttgctga aaagctcatc tctgctgaga 360		
	agaaaacggt ctaccttaac ctattaagac tatgcgacaga actcgccctt catagccatc 420		
	acaattttaa tctggttaagg ctggacacga gtcttttaca gaatggagtc ggtaaaacaa 480		
	aggatttttg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc cctcggacag 540		
	atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccatcgagct gacagaggac 600		
	ggcaagcccc tggaggtgcc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtgcttcggc 660		

ES 2 288 556 T3

ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcat ctcccttggg 720
 atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatggtca acaacagcac catccaccgg 780
 ggtggcaaaag ttatcaagga gaaagccaag ttttaactggg accccgagac tgtggggatg 840
 attcacgggt cgttcttctg gggctataatc atcacgcaga ttccgggcgg atacatcgca 900
 tcgcgactgg ctgctaaccg ggtcttggg gctgccatc tgcttacctc taccctcaat 960
 atgctgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcatcttctg tagaatattg 1020
 caaggacttg tggagggcgt caccatccca gcctgtcagc ggatatggag caagtgggccc 1080
 cctccttctg agaggagtag gttggctacc accctcttct gtgggttccta tgctggagca 1140
 gtcattgcaa tgccttagc tggatctctg gtgcagtaca ctggatggc ttcagtattt 1200
 tacgtatatg gaagcttctg tatggtctgg tatatgttct ggcttctggg gtcttacgag 1260
 agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc 1320
 ggggagagcg caaatctgtt aggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagtgt 1380
 ttcatatcca tgcctgtcta tgcgataatt gttgcaaaact tctgcaggag ttggactttt 1440
 tatttactgc tcatcagtc accagcttat ttccaggagg tttttggatt tgaaatcagc 1500
 aagggtggca tgttgtctgc ggtccacac ctgggtcatga caatcattgt gcctatcggg 1560
 gggcaaatg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaag 1620
 atcatgaact gcgggggttt tggcatggaa gccacactgc ttctggttgt tggctactct 1680
 catactagag ggggtggccat ctccctcttg gtgcttcag tgggattcag tggatttgc 1740
 atctctggtt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatatgccag tatcttaatg 1800
 ggcatttcaa atggtgttg cagctgtcg ggaatggtct gccgatcat tgttgggtgca 1860
 atgacgaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggc 1920
 cactatggtg gagtcatatt ttatgacta tttgcctcag gagagaagca acccttgggca 1980
 gaccctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa 2040
 gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccaccaaatc ctaoggcgcc 2100
 accctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga atttgtgcaa 2160
 gaaagtgcgc aagacgcgta ctccatataag gaccgagatg attattcata acgaagctag 2220
 ttgtctggat cctttgtagt gtttgtgatt aaattaatg tgattgcaca aaatcatttt 2280
 aagaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttgcgt ttcaaaaaat 2340
 aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtcccat caagtgcaat ctgtggcggc 2400
 agtcacgtga cgccatttcc attcaggcca ttcgctcctt tcgtttgtga tttaaagggt 2460
 tctgtagaa ataagtaggt attcggtgga tccatcacca cgttagagag tacaactaca 2520
 acagttggca catgtcatcc tacggaagtt aggaagccaa agctactgga ttatgtgaac 2580
 tgcatttatt tatttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga 2640
 catagtagaa ctggaaagat ggctagattg ggtactgacg ataatcattg tgtgtatatc 2700
 atggagtggc tatatctttt aattggagaa ctatatgtga tagctagcaa aattgtactg 2760
 aattattact aggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat cttccaaaag cttatcttgc 2820
 agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg 2880
 gaggagtatg ctccatgctc tcccatcacc tacctgacag tatcaaacct tcacatttca 2940
 atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgaactttt ttgcaaaaaa gaataataaga 3000
 agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg 3060
 aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat 3120
 agcccttaaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttctctg 3180
 ataactagag actatatgga actcacacca caaagctata tataatatga aaagataaac 3240
 aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaatgt cccatttaag aggtatttgt 3300
 cttgagtata tagtacaag tatattaaaa ttatatctac atccctgtat atcttataca 3360
 tatccactca cacaacata acaataactt ttcacacaga accaaaaaca agcatacacc 3420
 taatgttggg tttggggatt gcaatttcta ctttcataga gtcatagaat tttagatggg 3480
 aaaaaaaaag gcattttgct cgtcatttct taatataatt aattcaacag gaactgcaac 3540

ES 2 288 556 T3

atttgtgtac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gtgtgtaaac tatccccata 3600
 ctgcttgtgg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcggag ctctttacaa 3660
 5 tgttttgccg tgataagaat gcacatccca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgtt 3720
 acctgtctgt tttaggtatt tgggtctgtt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggccctg 3780
 ctactgcgaa tataaaacgt gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga 3840
 aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgaccat aacccttgc 3900
 10 gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttgctgc gaagcaagtg ttaataaaat 3960
 gtctctattta aaaaaaaaaa aa 3982

<210> 10
 <211> 582
 <212> PTR
 <213> *Rattus Norvegicus*
 20 <400> 10

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

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Glu Phe Val Gln Glu Ser Ala Gln Asp Ala Tyr Ser Tyr Lys
565 570 575

Asp Arg Asp Asp Tyr Ser
580

<210> 11

<211> 2836

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 11

cggccgcccg ggcccgcggg cggggggatt ggcaggggac ccgcgtgggc acagccacca 60
tggagtcccg gcaggaggag ttccggaagc tggcggggcg cgccctgggg aggctgcacc 120
ggttactgga gaagcggcag gaaggcgcgg agacactgga gctgagtgcc gacgggcggc 180
cagtgaaccac gcacactcgg gaccgcctg tgggtggactg caccctgctt ggccctccctc 240
gtcgtctacat catcgccatc atgagcggtc tgggtttctg tatcagcttt ggcacccgct 300
gcaacctggg cgtggccatc gtgtccatgg tcaacaacag cacaacccac cgtggggggc 360
acgtggtggg gcagaaagcc cagttcaact gggatccaga gactgtcggc ctcatatg 420
gtcccttttt ctggggctac attgtcactc agattcctgg aggatttatt tgccaaaaat 480
tcgcagccaa cagggtcttt ggctttgcca ttgtggctac ctccacccta aacatgttga 540

ES 2 288 556 T3

tcccttcagc agccccggtt cactatggct gtgtcatctt cgtgaggatc cttcagggat 600
 tgggtggagg ggtcacatac cctgcttgcc atggcatctg gagcaaatgg gccctccct 660
 tagaacggag tcggctggca acgacagcct tttgcggttc ctatgctggg gcgggtggtg 720
 ccatgccctt ggctgggggc cttgtgtcagt attcaggatg gagttctgtc ttctatgtct 780
 atggcagctt cgggatcttt tggtagctgt tctgggtgct tgtctcctat gagtcaccgg 840
 cactgcaccc cagcatctct gaggaggagc gcaaatacat tgaggatgcc atcggggaga 900
 gcgccaagct catgaaccct gttacgaagt ttaacacacc ctggaggcgc ttctttacgt 960
 ccatgccctt ctatgccatc atcgttgcca acctttgccg cagctggacc ttctacctgc 1020
 tccctcatct tcagccccgc tactttgaag aagtgttcgg ctttgagatc agcaagggtg 1080
 ggctgggtgc ggctgtgcct cacttgttca tgaccatcat cgtacccatt ggaggccaga 1140
 tcgtgactt tttgcgcagt cgtcacataa tgtccactac caacgtgcga aagctcatga 1200
 actgcggggg tttcgggatg gaagccacgc tgcgtgctgt ggtcggatac tcgcactcca 1260
 agggcggtgc catctccttc ctggctcctg ctgtgggttt cagtggcttt gccatctctg 1320
 ggtttaacgt gaaccacttg gacatcgccc ctgcgtatgc cagcatcttg atgggcattt 1380
 ccaatggcgt gggcacactg tctgggatgg tgtgccccat catcgtgggt gcaatgacca 1440
 agcacaaagc gcgggaggag tggcagtagc tgttctcat agcctccctg gtgcactacg 1500
 gcgggtgcat cttctatggg gtctttgctt cgggagagaa gcagccgtgg gcagagccgg 1560
 aggagatgag cgaggagaag tgtggctttg ttggccacga ccagctgggt ggcagtgaag 1620
 aaagtgaat ggaggacgag gctgagcccc caggggcgcc cccgcgcgc cctccgtcct 1680
 acggggccac acacagcaca gtgcagcctc cgaggccccc gccctctgtc cgggactact 1740
 gaccacgggc ctccactgt ggggcagttt ccaggacttc cactccatac acctctagcc 1800
 tgagcggcag tgtcgaggaa cccactcct cccctgcctc aggccttaaga tgcaagtctt 1860
 cccttgttcc cagtgtgtc cgaccagccc tctttccctc tcaactgctt cctgcggggg 1920
 gtgaagctgc acactagcag tttcaaggat acccagactc ccctgaaagt cgttctccgc 1980
 ttgtttctgc ctgtgtgggc tcaaatctcc cctttgaggg ctttatttgg agggacagtt 2040
 caacctcttc ctctcttggt gttttgaggt ttccacctt cccccaagac cccagggttt 2100
 ctcaggctac cccgagatta ttcagggtgt cccctactca gaagacttca tggctgctct 2160
 ctattagttt caaggctcgc ctaaccaatt ctacattttt ccaagctggt ttaacctaac 2220
 caccaatgcc gccgttccca ggactgatc tcaccagcgt ttctgaggga aaatggcggg 2280
 ttcaagtcct cccaccccc ttttcttccc tcgtccctc accagcacac tttgcggggc 2340
 cttgacctta gcttagtaca atcattgtcc agggaaatgg ccaaaatggc tctgtctacc 2400
 ccgtgtctt tttctgactc agttttcagg tctcagtagt ggctgcccac agctattaat 2460
 tcagcggctc gaggccacct ctctctcccc gtgggtggtt caggatcccc ctgcgtcccc 2520
 cccccccaaa tcttgcact ttattctcct ggggtggttc aggcgcctt cggtttctca 2580
 gtggccattt gttgtgtgtc cctcaggggc taaatgattc caaatctggg gtgcttcccc 2640
 tcatagacac cctctctca acgtagaaat ctgggtgggg gtgagggtgt tgagagaagt 2700
 tacagaatcc caggaaaggg agcggggctg ggaggagagg gttgttctg gggcagggtc 2760
 gtgtcttggg gtctgtctct gtgacgtaaa tcttgcctg cccacccca ctccaataa 2820
 acgctctggt gtacgg 2836

55 <210> 12
 <211> 560
 <212> PTR
 60 <213> *Mus musculus*
 <400> 12

Met Glu Phe Arg Gln Glu Glu Phe Arg Lys Leu Ala Gly Arg Ala Leu

65

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

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

ES 2 288 556 T3

515

520

525

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

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

<210> 13

<211> 2528

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 13

```

ggcacgagggc tcagtcttaa ttccactctg ccactctgcc gcagagcaca attacgccgg 60
cgcgatggga ggagaccatg ttaaggcagg aagctaacag cagccgctca cctgaggcct 120
aggaagctcc caagggttct gagagctatg agctctgac agcaaagtca ccattttaga 180
cagtaggggtt cttttgcttt ttcccttaca caagggttcg atgacgtttc tggccaatct 240
gattaaaaga cagcggattt gattgcgata agacttcaaa accgggaatt tacgttggtt 300
ttcggtgagg tgacttccag aacagggact catcagcacc cgcccaaata ccacggcact 360
gcgcgcgcgc tcggccaccg gatcctcccc ttccaatgag actttgtgac tgtgtgtacc 420
aattctccta ttaggaaacc cgtgggctgc atgcagctat tctgttgtac tctctttctc 480
gccctccctc ccctctccaa ctacacagct tgctggaaag ctacacctctg ctgagaagaa 540
aaagctctac cttaaccaac taagactatg cgcagaatcc gtctttcata gccacaacaa 600
tttaaactctg gtaaggctgg acaccagtct ttacaagaat ggagtcggta aaacaaagga 660
ttttggcccc ggggaaagag gggataaaga attttgctgg aaaatccctc ggacagatct 720
acagggtgct ggagaagaag caggacaacc gagagaccat cgagctgaca gaggacggta 780
agcccctgga ggtgcctgag aagaaggctc cgctatgcga ctgcacgtgc ttccggcctgc 840
cgcgccgcta catcatagcc atcatgagcg gcctcggctt ctgcatatcc ttccggcatcc 900
gctgtaacct gggcgtggcc atcgtggaca tggtaacaa cagcactatc caccgcggag 960
gcaaagttat caaggagaaa gccaaattta actgggaccc cgagaccgtg gggatgatcc 1020
acggatcggt cttctggggc tatatcatca ccagattcc aggaggatat atcgcatcgc 1080
ggctggctgc taaccgggtc tttggggctg cgatactgct cacctctacc ctcaatatgc 1140
tgatcccatc tgcagccaga gtgcattatg gatgtgtcat ctttgtagg atattgcaag 1200
gacttgaggg ggggtgcacc taccagcct gtcatgggat atggagcaag tgggcccctc 1260
ccttgagagag gagtagggtt gctacaacct ccttttggtg ttccatgctt ggagcagtca 1320
ttgcaatgcc cttagctggg atccttggtc agtacactgg atggtcgtca gtattttatg 1380
tgtatggaag ctttggtcat gtctggtaca tgttctggct tctgggtgtc tatgagagcc 1440
ctgcaaagca tcttaccatt acagatgaag aacgtaggta catagaggag agcattggag 1500
agagcgcaaa tctgctaggt gcaatggaaa aatttaagac cccatggagg aagtttttca 1560
catccatgcc cgtctacgag ataattgttg ccaactctg caggagctgg actttttatt 1620
tactgctcat cagtcagcca gcttatcttg aggaggtttt tggatttgaa atcagcaagg 1680
ttggcatggt gtctgcagtc cctcaccttg tcatgacaat cattgtgcct atcggggggc 1740

```

ES 2 288 556 T3

```

aaattgcaga tttcctaagg agcaagcaaa ttctctcaac aactacagtg agaaagatca 1800
tgaattgtgg ggggttttggc atggaagcca cgtgtcttct ggttgttggc tactctcata 1860
ctagaggggt ggccatctcc ttcttggtgc ttgcagtagg attcagtgga ttgctatct 1920
ctgggtttcaa tgttaatcac ttggatattg ctccaagata tgccagtatc ttaatgggca 1980
tttcaaattg cggtggcacg ctgtcgggga tggtttgccc tatcattgtt ggtgcaatga 2040
caaagaataa gtcccgtgaa gaatggcagt atgtcttctt cattgctgca ctctccact 2100
atggtggagt catattttat gcaactattg cctcaggaga gaaacaacct tgggcagacc 2160
ctgaggaaac aagcgaagaa aaatgtggct tcattcacga agatgaactg gatgaagaaa 2220
cgggggacat cactcagaat tacataaatt acggtaccac caaatcttac ggtgctacct 2280
cacaggagaa tggaggctgg cctaacggct gggagaaaaa ggaagaattt gtgcaagaag 2340
gtgcgcaaga cgcgtacacc tataaggacc gagatgatta ttcataacga tgctagtgtc 2400
tggattcatt tgtagtgtt gtgaatcaat taattgtgat tgcacaaaaa taattttaaa 2460
aatgtggtgt gaacatgtaa acatatcaac caagcaagtc ttgctgttca aaaaaaaaaa 2520
aaaaaaaaa 2528

```

<210> 14

<211> 582

<212> PTR

<213> *Mus musculus*

<400> 14

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 288 556 T3

	Ile	Ala	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Phe	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	145	150	155	160
5	Leu	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Met	Leu	Ile	Pro	Ser	Ala	Ala	Arg	Val	His	165	170	175	
10	Tyr	Gly	Cys	Val	Ile	Phe	Val	Arg	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	180	185	190	
15	Val	Thr	Tyr	Pro	Ala	Cys	His	Gly	Ile	Trp	Ser	Lys	Trp	Ala	Pro	Pro	195	200	205	
20	Leu	Glu	Arg	Ser	Arg	Leu	Ala	Thr	Thr	Ser	Phe	Cys	Gly	Ser	Tyr	Ala	210	215	220	
25	Gly	Ala	Val	Ile	Ala	Met	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Leu	Val	Gln	Tyr	Thr	225	230	235	240
30	Gly	Trp	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Phe	Gly	Met	Val	Trp	245	250	255	
35	Tyr	Met	Phe	Trp	Leu	Leu	Val	Ser	Tyr	Glu	Ser	Pro	Ala	Lys	His	Pro	260	265	270	
40	Thr	Ile	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Ile	Glu	Glu	Ser	Ile	Gly	Glu	275	280	285	
45	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Glu	Lys	Phe	Lys	Thr	Pro	Trp	Arg	290	295	300	
50	Lys	Phe	Phe	Thr	Ser	Met	Pro	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile	Val	Ala	Asn	Phe	305	310	315	320
55	Cys	Arg	Ser	Trp	Thr	Phe	Tyr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Pro	Ala	Tyr	325	330	335	
60	Phe	Glu	Glu	Val	Phe	Gly	Phe	Glu	Ile	Ser	Lys	Val	Gly	Met	Leu	Ser	340	345	350	
65	Ala	Val	Pro	His	Leu	Val	Met	Thr	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gln	355	360	365	
70	Ile	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Ser	Lys	Gln	Ile	Leu	Ser	Thr	Thr	Thr	Val	370	375	380	
75	Arg	Lys	Ile	Met	Asn	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu	385	390	395	400

ES 2 288 556 T3

Leu Val Val Gly Tyr Ser His Thr Arg Gly Val Ala Ile Ser Phe Leu
405 410 415

5

Val Leu Ala Val Gly Phe Ser Gly Phe Ala Ile Ser Gly Phe Asn Val
420 425 430

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

Lys Glu Glu Phe Val Gln Glu Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Tyr Lys
565 570 575

55

Asp Arg Asp Asp Tyr Ser
580

60

65