



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 813**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98917525 .2**

(86) Fecha de presentación : **29.04.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0979278**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2000**

(54)

Título: **Métodos para diagnosticar la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos.**

(30)

Prioridad: **30.04.1997 US 45160 P**
28.04.1998 US 67676

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(73)

Titular/es: **McGill University**
845 Sherbrooke Street West
Montreal, QC H3A 2T5, CA

(72)

Inventor/es: **Prichard, Roger, K.;**
Xu, Ming;
Ribeiro, Ana, Paula;
Blackhall, William, J.;
Beech, Robin, N.;
Molento, Marcelo y
Liu, Hao, Yuan

(74)

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 294 813 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para diagnosticar la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos novedosos para diagnosticar la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos. Más específicamente, la invención tiene que ver con métodos únicos para detectar el desarrollo de resistencia a lactonas macrocíclicas utilizando sondas de ácido nucleico.

Descripción de la técnica relacionada

Los compuestos lactónicos macrocíclicos tales como los compuestos LL-F28249, las milbemicinas y las avermectinas son ampliamente utilizados para el tratamiento de los parásitos nemátodos y artrópodos. La familia de compuestos LL-F28249 altamente activa son agentes endectocidas naturales aislados del caldo de fermentación de *Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.106.994 y su continuación Patente de los Estados Unidos Núm. 5.169.956 se describe la preparación de los componentes principales y secundarios, LL-F28249 α - λ . La familia de compuestos LL-F28249 incluye adicionalmente, pero no está limitada a, los derivados 23-oxo y los derivados 23-imino semisintéticos de LL-F28249 α - λ que se muestran en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.916.154. La moxidectina, conocida químicamente como 23-(O-metiloxima)-LL-F28249 α , es un potente derivado 23-imino particularmente potente. Otros ejemplos de derivados LL-F28249 incluyen, pero no están limitados a, 23-(O-metiloxima)-5-(fenoxiacetoxi)-LL-F28249 α , 23-(semicarbazona)-LL-F28249 α y 23-(tiosemicarbazona)-LL-F28249 α .

Las milbemicinas, también conocidas como serie B-41 de antibióticos, son lactonas macrocíclicas de origen natural aisladas del microorganismo, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 3.950.360 se muestra la preparación de los antibióticos macrólidos milbemicina $_{\alpha 1-\alpha 10}$, milbemicina $_{\beta 1-\beta 3}$ etc. Estos compuestos también son referidos comúnmente como milbemicina A, milbemicina B, milbemicin D y similares, o antibiótico B-41A1, antibiótico B-41A3, etc.

Las avermectinas, también conocidas como familia de compuestos C-076, son lactonas macrocíclicas de origen natural producidas por el microorganismo actinomiceto del suelo, *Streptomyces avermitilis*. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.310.519 se describe el aislamiento y preparación de los componentes principales A $_{1a}$ (p. ej., avermectina A $_{1a}$), A $_{2a}$, B $_{1a}$ y B $_{2a}$, y los componentes minoritarios A $_{1b}$ (p. ej., avermectina A $_{1b}$), A $_{2b}$, B $_{1b}$ y B $_{2b}$. La familia C-076 abarca adicionalmente derivados semisintéticos tales como las 22,23-dihidroavermectinas descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.199.569. Los derivados semisintéticos incluyen, pero no están limitados a, ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina y similares.

Se ha encontrado resistencia a todos los compuestos lactónicos macrocíclicos de amplio espectro en la mayor parte de las regiones del mundo donde se utilizan rutinariamente en la producción animal. Por ejemplo, la resistencia al fármaco ivermectina (IVM), conocido químicamente como 22,23-dihidroavermectina B $_1$ o 22,23-dihidro C-076 B $_1$ y un miembro utilizado comúnmente de la familia del fármaco avermectina, se ha convertido en un problema muy extendido, concretamente en los nemátodos de ovejas, cabras y ganado vacuno (Shoop, Parasitol. Today 9: 154-159, 1993). En algunas partes del mundo, la supervivencia de la producción animal comercial está amenazada por el desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos. Adicionalmente, existe una evidencia contradictoria en cuanto a si la resistencia a ivermectina (avermectina) confiere resistencia a las milbemicinas relacionadas o a otros macrólidos (Arena *et al.*, J. Parasitol. 81: 286-294, 1995; Oosthuizen y Erasmus, J. So. African Vet. Assoc. 64: 9-12, 1993; Pomroy and Whelan, Vet. Rec. 132: 416, 1993; Shoop, 1993; Condora *et al.*, Vet. Rec. 132: 651-652, 1993; Pomroy *et al.*, N.Z. Vet. J. 40: 76, 1992; Pankavich *et al.*, Vet. Rec. 130: 241-242, 1992; Craig *et al.*, Vet. Parasitol. 41: 329-333, 1992). Los mecanismos de resistencia a las avermectinas, las milbemicinas y otros compuestos lactónicos macrocíclicos siguen siendo desconocidos.

Hace algunos años se identificaron las glicoproteínas P (Pgp) como proteínas implicadas en la resistencia a múltiples fármacos (MDR) de las células tumorales de mamíferos (Julino y Ling, 1976; Gros y Buschman, 1993; Gottesman y Pastan, 1993). Las proteínas MDR también pueden estar implicadas en la resistencia a fármacos en los parásitos protozoicos *Entamoeba histolytica* (Whirth, Archivos De Investigacion Medica 21(Sup. 1): 183-189, 1990; Samuelson *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 38: 281-290, 1990), *Leishmania enrietti* (Chow, Mol. Biochem. Parasitol. 60: 195-208, 1993), *L. donovani* (Callahan *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 68: 145-149, 1994); y *Plasmodium falciparum* (Volkman *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 57: 203-211, 1993; Cowman *et al.*, J. Cell Biol. 113: 1033-1042, 1991). Mientras muchos investigadores creen que el mecanismo propuesto para la implicación de las Pgp en la resistencia a fármacos es que la Pgp se comporta como una bomba para incrementar la salida de fármaco, Callahan *et al.* (1994) sugirieron que la Pgp puede funcionar disminuyendo la entrada de fármaco. No obstante, el cuadro completo de cómo puede la Pgp ser responsable de la resistencia al fármaco todavía no está claro.

Solo recientemente se han investigado los homólogos de Pgp en nemátodos (Sangster, Parasitol. Today 10: 319-322, 1994; Lincke *et al.*, EMBO J. 12: 1615-1620, 1993; Lincke *et al.*, J. Mol. Biol. 228: 701-711, 1992). Se han clo-

nado tres genes Pgp completos y un gen Pgp parcial de tres nematodos que viven en libertad, *Caenorhabditis elegans*, secuenciado y mapeado en los cromosomas I, IV y X (Lincke *et al.*, 1992). Sangster *et al.*, J. Cell Biochem. 17 (Sup.): 1223, 1993, indicaron una evidencia para diversos genes parciales para Pgp en el nematodo parásito *Haemonchus contortus*, aunque faltaba la información de la secuencia. Los experimentos *in vivo* han demostrado que la desorganización del gen *mdr1* de ratón, un gen de la glicoproteína P, conduce al deterioro de la barrera hemato-encefálica y a un aumento de la sensibilidad a los fármacos en estos ratones (Schinkel *et al.*, Cell 77:491-502, 1994). Los ratones con una delección de *mdr1* eran 50-100 veces más sensibles a la ivermectina que los ratones normales.

Se ha demostrado que la resistencia a los fármacos basada en la expresión en exceso de la glicoproteína P es revertida por el verapamil y otros numerosos bloqueadores del canal del calcio, antagonistas de calmodulina, esteroides y análogos hormonales, ciclosporinas, dipiridamol y otros agentes de reversión de MDR (Ford, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 9: 337-361, 1995). No obstante, no ha habido ningún informe o sugerencia en la literatura para utilizar agentes de reversión de MDR para combatir la resistencia a los plaguicidas en nematodos y artrópodos.

Existe una necesidad concreta de entender el mecanismo de la resistencia a las lactonas macrocíclicas, para ser capaz de detectar la resistencia incipiente antes de que se vuelva flagrante y sea difícil gestionar la salud de los animales. La capacidad de revertir la resistencia tiene un gran potencial para mantener el control de parásitos frente al fracaso del tratamiento convencional. Un objeto importante de la presente invención, por tanto, es determinar estos mecanismos de resistencia con el fin de encontrar medios viables, sensibles para detectar y superar la resistencia problemática mejorando de ese modo el control de los parásitos.

Breve resumen de la invención

Desconocido hasta ahora, se ha encontrado que el mecanismo de resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos es debido a la expresión en exceso de homólogos de glicoproteína P novedosos. Se ha encontrado además recientemente que las moléculas de ácido nucleico que codifican los homólogos de la glicoproteína P o los fragmentos de la misma que regulan esta resistencia son útiles como sondas únicas en los métodos para diagnosticar la resistencia a las lactonas macrocíclicas.

La invención proporciona un uso según la reivindicación 1 y una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la misma según la reivindicación 9.

Breve descripción de los dibujos

Los antecedentes de la invención y su desviación de la técnica se describirán adicionalmente más abajo con referencia a los dibujos acompañantes, donde:

La Figura 1 muestra el producto de la PCR de 432 pb que se genera a partir de una genoteca de *Haemonchus contortus* cDNA pBLUESCRIPT® como molde y cebadores degenerados basados en los dominios de unión a ATP conservados de los genes de la glicoproteína P de *Caenorhabditis elegans* tras la electroforesis sobre gel de agarosa.

Las Figuras 2A y 2B representan, respectivamente, la secuencia de nucleótidos del producto de la PCR de 432 pb mostrado en la Figura 1 y la traducción a aminoácidos pronosticada del ADNc (que corresponde al SEQ ID NO: 1 y al SEQ ID NO: 2, respectivamente).

La Figura 3 muestra las autorradiografías de las transferencias Northern del ARN extraído de huevos de cepas de nematodos sensibles a ivermectina y resistentes (MKIS y MKIR; ACIS y ACIR) respectivamente. El producto de la PCR de 432 pb-[P³²] con homología con Pgp, se utiliza como una sonda y un fragmento de actina-[P³²] de pBA1 se utiliza como segunda sonda.

Las Figuras 4A y 4B representan la secuencia de ADNc completa (4175 pb) del clon PGP-A de la genoteca de ADNc de *H. contortus* con una elevada homología con las glicoproteínas P conocidas (que corresponde al SEQ ID NO:3).

La Figura 5 representa la secuencia de ADNc parcial (1810 pb) del extremo 5' del clon PGP-A de la genoteca de ADNc de *H. contortus* (que corresponde al SEQ ID NO:4).

La Figura 6 representa la secuencia de ADNc parcial (2698 pb) del extremo 3' del clon de PGP-A de la genoteca de ADNc de *H. contortus* (que corresponde al SEQ ID NO:5).

La Figura 7 representa la supuesta traducción a aminoácidos (1275 a.a.) del ADNc de PGP-A (que corresponde al SEQ ID NO:6).

Las Figuras 8A a 8B representan la secuencia de ADNc parcial (3512 pb) del extremo 3' del clon de PGP-0 relacionado pero diferente de la genoteca de ADNc de *H. contortus* (que corresponde al SEQ ID NO: 7).

La Figura 9 representa la secuencia de ADNc parcial (2681 pb) del extremo 3' del clon de PGP-B relacionado pero diferente de la genoteca de ADNc de *H. contortus* (que corresponde al SEQ ID NO: 8).

La Figura 10 muestra autorradiografías de las transferencias Southern del ADN genómico extraído de huevos de cepas de *H. contortus* sensibles y resistentes a ivermectina (MKIS Y MKIR) después de la digestión con *PvuII*, electroforesis y sondeadas con la sonda de Pgp- [P^{32}] de 432 pb de *H. contortus*.

La Figura 11 muestra el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción de los productos de la PCR del ADN de gusanos adultos macho individuales de cepas de *H. contortus* susceptibles (calles 1-9) o resistentes (calles 11-20) a la ivermectina, generadas con cebadores de glicoproteína PGP2S y PGPAS seguido de digestión con *DdeI* y separación sobre electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Las flechas indican los tres fragmentos de digestión que están asociados con la resistencia.

Las Figuras 12A y 12B representan las secuencias de ácido nucleico que comprenden el cebador efector PGP2S (Fig. 12A, que corresponde al SEQ ID NO:9) y cebador antisentido PGPAS (Fig. 12B, que corresponde al SEQ ID NO:10) que están contruidos a partir del clon de ADNc homólogo de la glicoproteína P de nematodos PGP-O-3' (región del intrón de 53 pb) y se utilizan para generar los productos de la PCR que son diagnósticos para la resistencia endectocida a lactonas macrocíclicas.

Las Figuras 13A y 13B ilustran la eficacia de la moxidectina (MOX) frente a cepas susceptibles (Fig. 13A) o resistentes (Fig. 13B) a moxidectina de *H. contortus* en jerbos.

Las Figuras 14A y 14B ilustran la eficacia de la ivermectina (IVM) frente a cepas susceptibles (Fig. 14A) y resistentes (Fig. 14B) a moxidectina de *H. contortus* en jerbos.

Las Figuras 15A y 15B ilustran la eficacia del verapamil (VRP) con o sin ivermectina (IVM;DL₅₀) frente a cepas susceptibles (Fig. 15A) o resistentes a moxidectina (Fig. 15B) de *H. contortus* en jerbos.

Las Figuras 16A y 16B ilustran la eficacia de la combinación de moxidectina (MOX; Fig. 16A) o ivermectina (IVM; Fig. 16B) con verapamil (VRP) frente a cepas resistentes a moxidectina de *H. contortus* en jerbos.

Las Figuras 17A, 17B y 17C ilustran, respectivamente, la digestión con *HinfI* de fragmentos de PCR de la glicoproteína P del ADN de gusanos individuales de *H. contortus* susceptibles, resistentes a ivermectina y resistentes a moxidectina, utilizando los cebadores PGP2S y PGPAS, seguido de digestión y separación en electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Las flechas del lado derecho de las Figuras 17B y 17C indican los fragmentos de digestión que están asociados con la resistencia mientras las flechas del lado izquierdo indican la posición y el tamaño de los marcadores normalizados.

Las Figuras 18A, 18B y 18C ilustran, respectivamente, la digestión con *AluI* de fragmentos de PCR de la glicoproteína P del ADN de gusanos individuales de *H. contortus* susceptible, resistente a la ivermectina y resistente a la moxidectina, utilizando los cebadores PGP2S y PGPAS, seguido de digestión y separación en electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Las flechas del lado derecho de las Figuras 18B y 18C indican los fragmentos de digestión que están asociados con la resistencia mientras las flechas del lado izquierdo indican la posición y tamaño de los marcadores normalizados.

Descripcion detallada de la invención

Según la presente invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico purificadas y aisladas novedosas que codifican nuevos homólogos de la glicoproteína P o los fragmentos de los mismos que regulan la resistencia a lactonas macrocíclicas. Estos ácidos nucleicos encuentran uso como sondas de métodos innovadores para el diagnóstico precoz de una resistencia en desarrollo a los endectocidas. En el pasado, no han estado disponibles métodos de detección de la resistencia a lactonas macrocíclicas basados en ADN o ARN. En la actualidad, solamente la presente invención proporciona la base genética de la resistencia y la diagnosis de la resistencia utilizando sondas de ácidos nucleicos. La detección temprana bajo las pautas de esta invención permite mantener un control adecuado de los parásitos y un mantenimiento adecuado de la utilidad de los compuestos lactónicos macrocíclicos. Adicionalmente, el mecanismo de resistencia a las lactonas macrocíclicas se puede utilizar en el desarrollo de escrutinios para identificar nuevos agentes anti-parasitarios.

Los métodos novedosos de la presente invención que son útiles para detectar la resistencia a compuestos lactónicos macrocíclicos en nematodos utilizan las nuevas sondas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Se pueden emplear para el análisis una variedad de mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica. Deseablemente, el método detecta cambios en el ADN genómico o el ARNm para proporcionar un medio viable para la diagnosis de la resistencia a lactonas macrocíclicas.

Estos métodos incluyen, por ejemplo, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la hibridación en una transferencia Southern, la hibridación puntual o el análisis de transferencia Northern o el uso de un anticuerpo para una secuencia de péptidos correspondiente a la traducción de las secuencias de nucleótidos entre los cebadores novedosos de la invención de una plaga individual o una mezcla de plagas tales como gusanos, utilizando cebadores o sondas, por ejemplo, correspondientes a la porción de la secuencia de ADNc de PGP-O entre las secuencias identificadas como PGP2S y PGPAS (véanse las Figs. 12A y 12B). Los cebadores o sondas alternativos dentro de esta región que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen, pero no están limitados a, todas las combinaciones de cebadores

o sondas de la PCR dentro de esta región o los de otras secuencias homólogas a PGP tales como PGP-A, PGP-B, PGP-O y similares. Básicamente, la región codificadora de los genes homólogos a la glicoproteína P correspondientes a las secuencias de ADNc identificadas como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B, PGP-B-3', PGP-O, PGP-O-3' y similares es detectada mediante PCR, transferencia Southern, hibridación puntual, transferencia Northern, Polimorfismo de la

5 Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y otros métodos de análisis normalizados. Sorprendentemente, se ha encontrado que el patrón de digestión del fragmento de la PCR, o los datos de la transferencia están asociados con los rasgos susceptibles o resistentes que son diagnósticos para el desarrollo de la resistencia a las lactonas macrocíclicas.

10 Se puede emplear la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos sintetizando un producto de ácido nucleico que puede ser sondeado junto con el análisis de transferencia Southern o inicialmente digerido con una enzima de restricción para el análisis de RFLP como se describe en la presente memoria. Los cebadores se utilizan para iniciar una reacción de PCR utilizando los ácidos nucleicos extraídos del espécimen de la plaga. Se utilizan para sintetizar una o varias secuencias de glicoproteína P. Los

15 productos de la PCR se pueden cortar después con enzimas de restricción y las secuencias digeridas se pueden hacer circular sobre un gel de electroforesis. Los ejemplos de las enzimas de restricción adecuadas que se pueden emplear en la digestión de los productos de la PCR incluyen, pero no están limitados a, *AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *RsaI* y similares. El patrón de las bandas observadas en una transferencia Southern o una transferencia Northern indica qué alelos de la glicoproteína P están presentes en un espécimen de una plaga tal como el gusano o un grupo de gusanos. Algunos

20 de los alelos pueden ser asociados con la sensibilidad a las lactonas macrocíclicas y otros con la resistencia a las lactonas macrocíclicas. Los productos de la PCR, seguido de los productos digeridos con las enzimas de restricción, proporcionan medios viables de detección de la resistencia. El procedimiento de corte de los productos de la PCR o los ácidos nucleicos tales como el ADN para el análisis RFLP aumenta enormemente la sensibilidad y la especificidad de la diagnosis.

25 De un modo similar se puede emplear el análisis con una Reacción en Cadena de la Polimerasa - Transcriptasa Inversa (RT-PCR) para la detección de la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos en plagas de nematodos o artrópodos. Típicamente, se extrae el ARN de un espécimen de nematodo o artrópodo y se utiliza la transcriptasa inversa seguida de PCR, como se describe en la presente memoria, para detectar la resistencia.

30 A modo de ilustración, se extraen del espécimen de la plaga los ácidos nucleicos, típicamente el ADN para el procedimiento de PCR o el ARNm para la RT-PCR, una plaga que se sabe que es resistente a los compuestos lactónicos macrocíclicos y una plaga que se sabe que es susceptible a las lactonas macrocíclicas. Los ácidos nucleicos derivados de las plagas resistentes y susceptibles se utilizan como punto de referencia. El ADN, o el ADNc producido por el

35 ARNm mediante la Transcriptasa Inversa, es desnaturalizado y los cebadores de la invención se añaden para formar una mezcla. Las tres mezclas se someten a muchos ciclos de PCR, normalmente se digieren mediante enzimas de restricción y se someten a electroforesis en gel. Con posterioridad, se comparan el patrón y la intensidad de las bandas del espécimen con la de los ácidos nucleicos de referencia, esto es, ADN o ADNc, de los extractos resistentes y susceptibles para detectar la población resistente. Opcionalmente, se incluyen en el procedimiento la hibridación por

40 medio de una sonda de la invención o el uso de un colorante tal como bromuro de etidio para ayudar a visualizar las bandas.

Se utilizan sondas novedosas en la diagnosis de la resistencia a las lactonas macrocíclicas mediante la detección de la susceptibilidad o la resistencia a las lactonas macrocíclicas en el análisis de PCR. Los cebadores que se utilizan

45 en el análisis de PCR se construyen, por ejemplo, a partir de las secuencias de ácido nucleico para los clones de ADNc homólogos a la glicoproteína P del parásito. Los ejemplos de los cebadores de la PCR adecuados que se pueden emplear en el análisis mediante PCR son los cebadores PGP2S y PGPAS utilizados en las direcciones efectora y antisentido, respectivamente, que son construidos a partir de PGP-O-3' o PGP-O (véanse las Figs. 12A y 12B). Los cebadores también pueden ser preparados a partir de secuencias completas o parciales de otros ácidos nucleicos

50 de la glicoproteína P tales como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B-3', PGP-O, *etc.* y las hebras complementarias de los mismos que contienen la región que se ha encontrado que es diagnóstica de la resistencia a la lactona macrocíclica. Se pueden obtener secuencias útiles alternativas mediante medios convencionales tales como las técnicas de hibridación en condiciones normalizadas o restrictivas.

55 Se pueden preparar la transferencia Southern, la hibridación Puntual o la transferencia Northern con las moléculas de ácido nucleico del espécimen nematodo o artrópodo, utilizando una sonda que comprende una de las secuencias de la molécula de ácido nucleico que codifica la resistencia o una porción de la misma, se puede comparar el nivel de los ácidos nucleicos extraídos del espécimen con el nivel de los ácidos nucleicos de la sonda, por ejemplo, midiendo o detectando el nivel de ADN o ARNm. Generalmente, se mapean tres extractos de ácido nucleico para realizar la

60 comparación: del espécimen de la plaga, de un espécimen que se sabe que es resistente y de un espécimen que se sabe que es susceptible. En el caso de la transferencia Southern, se compara el patrón de las bandas. Con la transferencia Northern, se compara o bien el patrón o bien la intensidad de las bandas. Para la hibridación, se compara la intensidad de las manchas.

65 Otra técnica implica la realización de un análisis del Polimorfismo de la Longitud del Fragmento de Restricción (RFLP) extrayendo los ácidos nucleicos de un espécimen de nematodo o artrópodo, digiriendo el ácido nucleico con una enzima de restricción, utilizando una sonda que comprende una de las secuencias de la molécula de ácido nucleico que codifica la resistencia o una porción de la misma y comparando el patrón de digestión con el patrón de digestión

de los nematodos o artrópodos que se sabe que son de poblaciones resistentes o sensibles a los endectocidas lactónicos macrocíclicos. Cuando se corta el ADN con la enzima de restricción, se hace correr sobre un gel y se sondea con la técnica de RFLP, la sonda hibrida con las secuencias similares, pero su longitud variará dependiendo de dónde se encuentran los sitios de restricción para esa enzima. Repitiendo el análisis con ADN de gusanos individuales, se observan patrones ligeramente diferentes debido al polimorfismo. Los patrones específicos son diagnósticos para el gen de resistencia. *PvuII* es un ejemplo de una enzima de restricción preferida que se puede emplear para el análisis de RFLP. En el método se pueden sustituir otras enzimas de restricción convencionales conocidas por los expertos normales en la técnica.

Un ejemplo adicional de un procedimiento útil para detectar la resistencia tiene que ver con la elaboración de anticuerpos que emplean homólogos de la proteína PGP novedosos. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo para una secuencia del péptido correspondiente a la traducción a aminoácidos de los ácidos nucleicos o los fragmentos de los mismos que codifican los homólogos de la glicoproteína P que regulan la resistencia. Después, se prepara un espécimen de la plaga de nematodos o artrópodos, o el extracto del mismo, para su reacción con el anticuerpo anterior. El espécimen o el extracto se hacen reaccionar con el anticuerpo en condiciones adecuadas que permiten que se produzca la unión anticuerpo-antígeno y, después de eso, se detecta la presencia de la unión anticuerpo-antígeno mediante métodos convencionales.

Los métodos descritos anteriormente para la detección de la resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos pueden utilizar adicionalmente un ligando o colorante específico de la glicoproteína P. Normalmente, el nivel de la glicoproteína P en el espécimen se puede observar más fácilmente utilizando el ligando o colorante y se puede comparar con los niveles obtenidos en las poblaciones de nematodos o artrópodos resistentes o susceptibles a las lactonas macrocíclicas conocidas. El ligando o colorante normalmente está radiomarcado de manera que pueda ser fácilmente detectado. Los ejemplos de los ligandos adecuados útiles en este método incluyen, pero no están limitados a, prazosina, azidoprazosina, yodoarilo-azidoprazosina y similares. Se pueden emplear una variedad de colorantes convencionales tales como, por ejemplo, rodamina 123, bromuro de etidio y otros.

Para los fines de esta invención, la molécula de ácido nucleico puede ser ADN, ADNc o ARN. No obstante, en la realización más preferida de esta invención, la sonda de ácido nucleico es una molécula de ADNc. Muchos de los métodos anteriores ilustran ácidos nucleicos extraídos de *Haemonchus contortus*. Se contempla que la presente invención abarca el uso de ácidos nucleicos recombinantes que codifican la resistencia o susceptibilidad a los macrólidos así como ácidos nucleicos aislados de otras cepas de gusanos o especies de plagas.

Los plásmidos que contienen ADNc derivado de *Haemonchus contortus* se depositan con relación a la presente solicitud de patente y se mantienen de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A. Las secuencias de ADNc descritas en la presente memoria están contenidas en plásmidos (pBLUESCRIPT® II, disponible en el mercado de Stratagene Inc., La Jolla, CA) transformado en cepas bacterianas de *Escherichia coli* XL-Blue. Los plásmidos identificados como PGP-B-3', PGP-O-3' y PGP-A-5' han sido consignados en la ATCC el 29 de Enero de 1.997 y se les ha asignado los Números de Consigna ATCC 98307, 98309 y 98310, respectivamente. El plásmido PGP-A-3' ha sido consignado en la ATCC el 26 de Febrero de 1.997 y se le ha asignado el Número de Consigna ATCC 98336. Se debe apreciar que también pueden estar abarcados dentro del alcance de la presente invención otros plásmidos, que pueden ser fácilmente construidos utilizando la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas descritas en la presente memoria.

Se describe la única reversión de la resistencia en parásitos a los compuestos lactónicos macrocíclicos administrando o aplicando los agentes de reversión a la resistencia a múltiples fármacos. Esta reversión de un problema de resistencia existente permite volver a ganar el control satisfactorio del parásito. El nematodo de esta invención hace referencia a insectos de cosechas, nematodos de cosechas o mamíferos.

Deseablemente, la reversión de la resistencia a múltiples fármacos, es un bloqueador del canal del calcio tal como verapamil, nifedipina y similares; un antagonista de calmodulina, tal como trifluoperazina, proclorperazina y similares; un análogo del alcaloide de vinca tal como vindolina, taliblastina y similares; un agente esteroide tal como progesterona y similares; un agente hormonal tal como tamoxifeno, estradiol y similares; un agente inmunosupresor tal como ciclosporina A, SDZ-PSC 833 y similares, un antibiótico tal como eritromicina, cefoperazona, ceftriaxona, tetraciclina y similares; compuestos misceláneos tales como dipiridamol, quinidina, reserpina, amiodarona, *etc.*; y otros agentes de reversión de la resistencia a múltiples fármacos conocidos por los expertos en la técnica.

Para incrementar la eficacia de los macrólidos parasiticidas, los compuestos se administran a los mamíferos oralmente, parenteralmente, tópicamente (actividad local) o transdérmicamente (actividad generalizada) dependiendo de la biodisponibilidad del medicamento seleccionado por la ruta de administración deseada. La administración parenteral de los medicamentos abarca cualquier medio distinto del oral, tal como por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratraqueal, intraluminal, *etc.* Es evidente que los agentes de reversión de la MDR se administran en relación con la administración del compuesto lactónico macrocíclico que encuentra resistencia en los nematodos o artrópodos ectoparásitos o endoparásitos de los mamíferos. Sin embargo, la administración de los agentes de reversión de la MDR se puede realizar o bien antes o bien durante la administración concurrente de las lactonas macrocíclicas. Si el agente de reversión de la MDR se administra antes del endectocida, el personal médico o veterinario puede determinar fácilmente mediante los niveles apropiados en sangre cuánto antes se puede administrar el agente de reversión de la MDR para aumentar la eficacia del macrólido. Típicamente, el agente de reversión de la MDR se puede administrar

a las 24 horas del inicio de la terapia endectocida y, preferiblemente, en las 4 horas anteriores o concomitantemente con la administración de la lactona macrocíclica.

En términos de la dosificación, la cantidad adecuada del agente de reversión de la MDR que es eficaz para incrementar la eficacia del compuesto lactónico macrocíclico frente a los nematodos resistentes o los artrópodos resistentes ectoparásitos o endoparásitos variará típicamente en un amplio intervalo de cantidades a una variedad de concentraciones. El agente de reversión de MDR concreto seleccionado para su uso con el endectocida específico afectará claramente a la dosis útil del agente de reversión de la MDR. Se contempla que la selección de las dosificaciones apropiadas de cada agente de reversión de la MDR y del compuesto lactónico macrocíclico para lograr la cantidad eficaz potenciadora del plaguicida se puede titular fácilmente mediante el ensayo rutinario conocido por los que tienen un conocimiento práctico normal en las técnicas médicas y veterinarias.

Para su uso en el tratamiento parasiticida, se pueden administrar oralmente compuestos lactónicos macrocíclicos en una forma de dosificación unitaria tal como una cápsula, un bolo o un comprimido. Las cápsulas y bolos comprenden el ingrediente activo mezclado con un vehículo portador convencional tal como almidón, talco, estearato de magnesio o fosfato dicálcico. La forma de dosificación unitaria sólida, seca se prepara mezclando uniformemente e íntimamente el ingrediente activo con diluyentes, cargas, agentes disgregantes y/o aglutinantes adecuados finamente divididos tales como almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, cauchos vegetales y similares. Tales formulaciones de dosificación unitarias se pueden variar ampliamente con respecto a su peso total y su contenido de ingrediente activo dependiendo de factores tales como el tipo y el peso del mamífero que se vaya a tratar y del tipo y la gravedad de la infección o infestación. Generalmente, la cantidad de compuesto macrocíclico administrado en la administración oral es de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal y preferiblemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal. No obstante, la cantidad variará dependiendo del grado de resistencia ya desarrollado en el parásito.

Para los animales, el compuesto lactónico macrocíclico y muchos agentes de reversión de la MDR también se pueden administrar por medio de un pienso animal dispersando íntimamente el ingrediente activo en el alimento o utilizándolo como aderezo superficial o en forma de peletes que se pueden añadir después al alimento terminado u opcionalmente como alimento separado. Las composiciones adecuadas incluyen premezclas o suplementos de alimentación en los que el compuesto activo está presente en cantidades relativamente grandes, donde dichas premezclas o suplementos son adecuados para la alimentación directa al animal o para la adición al alimento ya sea directamente o después de una etapa de dilución o combinación intermedia.

Los portadores o diluyentes típicos adecuados para tales composiciones incluyen cereales secos de destilerías, harina de maíz, harina de cítricos, restos de fermentación, conchas de ostras molidas, productos del trigo, melazas, harina de mazorca de maíz, alimento molido de haba comestible, cascajos de soja, piedra caliza triturada y similares. Los compuestos activos se dispersan íntimamente por todo el portador mediante métodos tales como trituración, agitación, molienda o volteo. Las composiciones que contienen aproximadamente del 0,005% a aproximadamente el 2,0%, en peso, del compuesto activo son particularmente adecuadas como premezclas de alimentación.

Los suplementos alimenticios, que son proporcionados directamente al animal, contienen de aproximadamente un 0,0002% a un 0,3%, en peso, de los compuestos activos. Tales suplementos son añadidos al alimento para animales en una cantidad que proporciona al alimento final la concentración de compuesto activo deseada para el tratamiento o control de la enfermedad por parásitos resistentes. Aunque la concentración deseada del compuesto activo variará dependiendo de una variedad de factores tales como el compuesto concreto empleado o la gravedad de la afección, los compuestos macrocíclicos de esta invención se proporcionan normalmente como alimento a concentraciones de aproximadamente un 0,00001% a aproximadamente un 0,02% en el alimento.

Alternativamente, los compuestos pueden ser administrados parenteralmente a los animales aquejados, en cuyo evento el ingrediente activo es disuelto, dispersado o suspendido en un vehículo portador líquido estéril, isotónico, no tóxico. El material activo se mezcla con el vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico, preferiblemente un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o similar. También se pueden utilizar otros vehículos parenterales tales como propilenglicol, glicerol y similares para las formulaciones parenterales.

En las formulaciones parenterales, los macrólidos activos se disuelven o suspenden típicamente en la formulación en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 5,0%, en peso, del compuesto activo en dicha formulación.

Convenientemente, los macrólidos también pueden ser administrados a los animales aquejados por la ruta tópica o transdérmica para obtener un efecto local o generalizado. Cuando se utilizan en animales, los compuestos pueden ser aplicados en forma de poción líquida. La poción para animales es normalmente una solución, suspensión o dispersión del compuesto activo, normalmente en agua, junto con un agente de suspensión tal como bentonita y un agente humectante o un excipiente similar. Generalmente, las pociones también contienen un agente antiespumante. Las formulaciones en pociones contienen típicamente de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,5%, en peso, del compuesto macrocíclico activo. Las formulaciones en poción preferidas contienen de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,1%, en peso.

Adicionalmente, los compuestos macrocíclicos se pueden administrar aplicándolos en forma de gel, loción, solución, crema o pomada a la piel humana o vertiéndolos sobre la piel o el pellejo del animal a través de una solución. Las formulaciones tópicas o transdérmicas comprenden el ingrediente activo combinado con excipientes y portadores inactivos convencionales. La crema, por ejemplo, puede utilizar petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, alcohol estearílico, alcohol cetílico, laurilsulfato de sodio, tampón fosfato de sodio, polisorbato, parabenos, cera emulsionante, copolímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, agua purificada y similares. Las pomadas pueden emplear, por ejemplo, petrolato, aceite mineral, cera mineral, glicerina y similares. Las soluciones tópicas pueden proporcionar el ingrediente activo compuesto con propilenglicol, parabenos, hidroxipropilcelulosa, conservantes. Las formulaciones tópicas pueden integrar el ingrediente activo disuelto en un disolvente inerte adecuado, tal como dimetilsulfóxido, propilenglicol, butoxietoxietanol y similares. Una formulación tópica particularmente útil comprende el ingrediente activo disuelto o dispersado en un disolvente aromático, propionato de éter miristílico de PPG-2, polibuteno, un agente antimicrobiano, un antioxidante y un aceite mineral o vegetal farmacéuticamente aceptable no tóxico.

Para incrementar la eficacia de los macrólidos como agentes plaguicidas, se aplican agentes de reversión de la resistencia a múltiples fármacos a las cosechas, semillas de las cosechas o al suelo o al agua en la cual están creciendo o van a crecer los cultivos o las semillas en una cantidad eficaz potenciadora del plaguicida. Los agentes de reversión de la MDR se pueden aplicar antes o a la vez que la aplicación de la lactona macrocíclica. Típicamente, el agente de reversión de la MDR se aplicará 4 horas antes o, preferiblemente, a la vez que la aplicación de la lactona macrocíclica.

En términos de las tasas de aplicación, la cantidad adecuada de agente de reversión de la MDR que es eficaz para incrementar la eficacia del compuesto lactónico macrocíclico frente a las plagas de los cultivos resistentes variará típicamente en un amplio intervalo de cantidades a una variedad de concentraciones y tasas. El agente de reversión de la MDR concreto seleccionado para su uso con el plaguicida del cultivo afectará claramente a la tasa de aplicación del agente de reversión de la MDR. Se contempla que la elección de cantidades, concentraciones, tasas de pulverización apropiadas y similares de cada agente de reversión de MDR y el compuesto lactónico macrocíclico para lograr una cantidad eficaz potenciadora del plaguicida pueda ser determinada fácilmente mediante procedimientos rutinarios conocidos por los que tienen un conocimiento práctico en la técnica agrícola.

En cuanto a los agentes nematocidas útiles para proteger las semillas de cultivos o los cultivos en crecimiento o cosechados del ataque de las plagas, se pueden formular los compuestos en gránulos compactos secos, composiciones en pasta líquida, polvos mojables, espolvoreables, concentrados en polvo, microemulsiones y similares, todos los cuales se prestan a la aplicación al suelo, al agua o al follaje y proporcionan la protección a la planta requisito. Tales composiciones incluyen los compuestos de la invención mezclados con portadores sólidos o líquidos agrónomicamente aceptables.

En la composición agrícola, los compuestos activos están íntimamente mezclados o triturados junto con excipientes y portadores en cantidades suficientes para proporcionar típicamente de aproximadamente 3% a aproximadamente 20% en peso del compuesto lactónico macrocíclico en dicha composición.

Las composiciones son útiles para combatir las plagas agrícolas que infligen daños a los cultivos mientras crecen o mientras están almacenados. Los compuestos se aplican utilizando mecanismos conocidos tales como pulverizaciones, espolvoreables, emulsiones, polvos mojables, pasta líquida y similares a los cultivos en crecimiento o almacenados para proporcionar protección frente a la infestación por plagas agrícolas.

Inesperadamente, se ha encontrado que el mecanismo de resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos es debido a la expresión en exceso de homólogos de la glicoproteína P novedosos que ocasiona una salida de antihelmíntico del parásito. La presente invención ilustra la implicación de los genes homólogos de Pgp en la resistencia a IVM en *H. contortus*. Se ha demostrado que la expresión en exceso de la proteína Pgp en las cepas resistentes a IVM de *H. contortus* está regulada tanto por la transposición del ADN genómico que codifica los homólogos de PGP como por la transcripción génica.

Se ha utilizado *H. contortus* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) para la evaluación de la eficacia antihelmíntica y se ha demostrado que se corresponde con los estudios de este parásito en ovejas (Conder *et al.*, J. Parasitol. 78: 492-497, 1992). Empleando el modelo de jerbo, se describe que se pueden utilizar inesperadamente los agentes de reversión de múltiples fármacos para incrementar la eficacia de las lactonas macrocíclicas frente a los parásitos resistentes. Como ejemplo representativo, se demuestra que el agente de reversión de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) verapamil potencia únicamente la acción de la moxidectina y la ivermectina contra *H. contortus* susceptible y resistente a moxidectina.

Los parásitos tales como *H. contortus* contienen genes homólogos de Pgp que son expresados en diferentes fases del ciclo de vida del parásito. Esta invención encuentra que el nivel de expresión de la glicoproteína P es sorprendentemente elevado en las diferentes cepas que son resistentes a las lactonas macrocíclicas tales como la ivermectina en comparación con los niveles en las cepas susceptibles de las cuales derivan las cepas resistentes. El nivel de expresión de Pgp más alto, en las cepas resistentes a ivermectina, está asociado con una alteración a nivel genómico.

Las glicoproteínas P pueden actuar como bombas moleculares para extraer xenobióticos hidrófobos de las células. Una elevación en el nivel de la glicoproteínas P es la base de la resistencia a múltiples fármacos en las células cancerosas

y también parece estar implicada en algunas formas de resistencia a fármacos en algunos protozoos. Todavía no se ha descrito un nivel elevado de Pgp como mecanismo de resistencia a fármacos en los parásitos nemátodos. Esta es la primera evidencia que demuestra que la resistencia a ivermectina puede estar debida a una elevación en las glicoproteínas P. La resistencia a la ivermectina se está convirtiendo en un problema común en los parásitos nemátodos de los animales y potencialmente en los parásitos artrópodos. Es probable que su uso continuado contra los artrópodos conduzca a la selección de una resistencia similar a la de los nemátodos.

Existen evidencias de que la ivermectina comparte una acción común con otras avermectinas, tales como doramectina, milbemicinas (Arena *et al.*, 1995) y moxidectina. Se puede apreciar que el desarrollo de resistencia frente a otros compuestos lactónicos macrocíclicos implicará la hiperexpresión de la glicoproteína P conduciendo a tasas elevadas de flujo de fármaco.

Este trabajo es significativo porque permite la detección sensible de la resistencia a ivermectina y de la resistencia a otros compuestos lactónicos macrocíclicos en nemátodos y artrópodos utilizando sondas de ADN y ADNc basadas en las diferencias demostradas encontradas en los productos digeridos con PvuII de ADN de organismos resistentes y susceptibles. Asimismo permite la predicción del grado de resistencia a partir del nivel de expresión de la glicoproteína P basado en los niveles de ARNm de Pgp o de proteína Pgp. Este conocimiento del mecanismo de resistencia a los macrólidos permite sintetizar análogos activos que sigan siendo eficaces en presencia de un mecanismo de resistencia a otras lactonas macrocíclicas basado en *mdr*. Más específicamente, los productos químicos que actúan sobre el modo de acción del receptor, el canal de cloruro activado por glutamato (Arena *et al.*, 1995), pero que no son extraídos eficazmente por la bomba de glicoproteína P, esto es, son sustratos pobres para el flujo de Pgp, pueden ser seleccionados para superar la resistencia. Esto conducirá a mejoras en los controles de los parásitos, especialmente en la prevención y el tratamiento de la resistencia a ivermectina y la resistencia cruzada a otras avermectinas, milbemicinas y compuestos LL-F28249.

Esta invención proporciona una nueva evidencia de que en la resistencia a los endectocidas lactónicos macrocíclicos, tales como la ivermectina, en parásitos e animales nematodos y artrópodos, la expresión de la glicoproteína P es elevada en comparación con el nivel de expresión en las cepas parentales del parásito susceptibles. Adicionalmente demuestra que el nivel superior de expresión está asociado con las diferencias, a nivel genómico, de los genes de la glicoproteína P. Por ejemplo, utilizando el análisis de transferencia de Southern de ADN reunido y mediante análisis de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de gusanos individuales, se determinan las diferencias en el ADN genómico para Pgp en *Haemonchus contortus* resistente a ivermectina en comparación con la cepa parental susceptible, y la diversidad de los alelos para Pgp en los gusanos resistentes parece estar marcadamente reducida en comparación con la cepa susceptible parental. Se han encontrado ahora sondas de ácido nucleico novedosas que pueden diferenciar entre parásitos susceptibles y resistentes y se considera que son útiles en la detección temprana del desarrollo de resistencia a los compuestos lactónicos macrocíclicos.

Se describe que la resistencia a las macrolactonas se puede superar utilizando un agente de reversión de MDR. Por ejemplo, el verapamil, un agente de reversión de MDR relativamente débil, bien conocido, aumenta significativamente la eficacia de la moxidectina frente a *H. contortus* resistente a moxidectina. Los gusanos resistentes a moxidectina muestran una resistencia secundaria a ivermectina y la resistencia a ivermectina también se supera mediante el uso de un agente de reversión de la MDR suave.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. No obstante, se debe entender que estos ejemplos son solamente ilustrativos. Se debe apreciar que cuando se han dado las condiciones de reacción típicas (*p. ej.*, temperatura, tiempos de reacción, *etc.*), también se pueden utilizar condiciones que están tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente son menos convenientes. Los ejemplos se llevan a cabo a la temperatura ambiente (de aproximadamente 23°C a aproximadamente 28°C) y a la presión atmosférica. Todas las partes y porcentajes referidos en la presente memoria son en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique de otro modo.

Se puede obtener un conocimiento adicional de la invención a partir de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Síntesis por PCR y Clonación de un ADN de 432 pb para un Homólogo de la Glicoproteína P a partir de una Genoteca de ADNc de H. contortus

Basándose en los dominios de unión a ATP altamente conservados de la Pgp de *C. elegans*, se diseña un par de cebadores de PCR degenerados. El cebador efector es 5'-ACNGTNGCNYTNGTNGG-3' (que corresponde al SEQ ID NO: 11) y el cebador antisentido es 5'-GCNSWNGTNGCYTCRTC-3' (que corresponde al SEQ ID NO: 12). La PCR se lleva a cabo durante 40 ciclos a una temperatura desnaturante de 94°C durante 1 minuto, una temperatura de hibridación de 37°C durante 1 minuto, y una temperatura de prolongación de 72°C durante 3 minutos utilizando una genoteca de ADNc de *H. contortus* (Geary *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 50: 295-306, 1992) como molde. Se purifica un producto de 432 pb mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto purificado se utiliza como molde para una segunda ronda de amplificación mediante PCR con los mismos cebadores. Con posterioridad se clona un producto de 432 pb enriquecido en un vector TA (Invitrogen) según los protocolos normalizados. Los plásmidos con insertos son transformados en *Escherichia coli* y después cultivados en placa sobre placas de Ampicilina LB

ES 2 294 813 T3

que contienen un sustrato cromogénico, X-GAL® (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, disponible en el mercado de Gibco BRL, Bethesda, MD) (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Se identifican diez clones como secuencias del dominio de unión a ATP de la glicoproteína P.

5 Ejemplo 2

Escrutinio de la Genoteca de ADNc de H. contortus

10 Se escinde el fragmento de 432 pb mediante *EcoR*I, se marcó con cebado al azar con d-CTP[P³²] y se utiliza como sonda para escrutar la genoteca de ADNc (Sambrook *et al.*, 1989). Se escrutarán aproximadamente 1 millón de clones y se identifican nueve supuestos clones. Los clones positivos se digieren con PvuII y tres de ellos que contenían insertos del tamaño pronosticado se secuencian con posterioridad.

15 Ejemplo 3

Cepas de Parásito

20 Se utilizan dos pares de cepas de *H. contortus* susceptibles y resistentes a ivermectina. El primer par es una cepa resistente a ivermectina (MFR) desarrollada en Merck Research Laboratories, Rahway, NJ (Rohrer *et al.*, J. Parasitol. 80: 493-497, 1.994) y la cepa parental susceptible a ivermectina (MFS) de la cual se selecciona la cepa resistente a lo largo de diecisiete generaciones de selección con ivermectina.

25 El segundo par es una cepa resistente a ivermectina (ACR) desarrollada en American Cyanamid Company, Princeton, NJ y la cepa parental susceptible a ivermectina (ACS) de la cual se selecciona la cepa resistente a lo largo de catorce generaciones de selección con ivermectina. Se ha informado que la cepa MFR es 10 veces más resistente a la DE₉₅ en comparación con FMS, y se ha encontrado que ACR, después de doce generaciones de selección, es 6,3 veces más resistente a la DE₉₅ en comparación con ACS.

30 Ejemplo 4

Extracción de ARN e Hibridación Northern

35 Se recogen gusanos adultos de *H. contortus* susceptibles y resistentes a ivermectina del abomaso de ovejas (Lubega y Prichard, Biochem. Pharmacol. 41: 93-101, 1991). Se recogen huevos de cada cepa y se aíslan de la heces de las ovejas (Weston *et al.*, J. Parasitol. 14: 159-164, 1984) que han sido previamente liberadas de los gusanos e inoculadas con una de las cuatro cepas de *H. contortus*. El ARN total se extrae de los tejidos de las cepas susceptibles y resistentes a ivermectina, respectivamente, utilizando Reactivo TRIzol® (Gibco BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, company protocol). El ARN total se hace correr sobre electroforesis en gel de agarosa - formaldehído desnaturalizante y se transfiere a membranas de nailon H-bond. Las membranas se prehibridan a 65°C en disulfato de dextrano al 10%, SDS al 1% (dodecilsulfato de sodio), NaCl 1,0 M a lo largo de 4 horas. El fragmento de Pgp de *H. contortus* de 432 pb marcado con P³² y una sonda de actina que consiste en el fragmento PstI de 1,25 kb de *pBA1* (Degen *et al.*, J. Biol. Chem. 258: 12153, 1.983) se mezclan y se incuban durante la noche con las membranas a 65°C en el mismo tampón de hibridación. Las membranas se lavan con 2X SSC (mezcla 1:2 de citrato de trisodio y cloruro de sodio), SDS al 0,1% a 65°C durante 30 minutos y 0,5X SSC a 35°C durante 1 hora y después se someten a autorradiografía. Se realizan los análisis de las imágenes para la determinación cuantitativa de la expresión del ARNm, utilizando el programa IMAGE (O'Neil *et al.*, Appl. Theor. Electrophor., 1: 163-167, 1.989). Las sondas de ADN de actina de una fuente de ratón, marcadas e hibridadas con la misma transferencia, utilizando el mismo método que antes, se utilizan como control interno para la carga de ARNm. Los resultados se muestran en la Fig. 3 (S = cepas no seleccionadas; 45 R = cepas seleccionadas con IVM; MKI = cepas desarrolladas en Merck Research Laboratories, Rahway, NJ; ACI = cepas desarrolladas en American Cyanamid Company, Princeton, NJ).

Ejemplo 5

55 *Transferencias Southern*

Se extrae ADN genómico de cepas tanto susceptibles como resistentes a ivermectina (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizan cuatro enzimas de restricción *EcoR*I, *Clal*I, *Pvu*II y *Pst*I para digerir el ADN genómico siguiendo las directrices del proveedor. Cada reacción se lleva a cabo con cepas tanto resistentes como susceptibles a ivermectina. 60 Tras una digestión con enzimas de restricción durante la noche, las muestras se hacen correr sobre geles de agarosa al 1% y después se aplican sobre membranas H-bond (Sambrook *et al.*, 1989). Las membranas con ADN se exponen a luz UV para fijar el ADN a 65°C en tampón (sulfato de dextrano al 10%, SDS al 1% y NaCl 1M) durante al menos 4 horas. El fragmento de 432 pb, marcado con [P³²], se añade como sonda y se hibrida con el ADN genómico en el tampón de prehibridación, durante la noche. Las membranas se lavan con posterioridad dos veces con 2X SSC durante 10 minutos, dos veces con 1X SSC durante 15 minutos y después se someten a autorradiografía. 65

Resultados

Amplificación mediante PCR

Dos rondas de amplificación mediante PCR generan un producto de 432 pb (Fig. 1) que es altamente homólogo al dominio de unión a ATP conservado de la glicoproteína P (Fig. 2A). La supuesta secuencia de aminoácidos (Fig. 2B) muestra que este fragmento es altamente homólogo a la glicoproteína P o a las proteínas de resistencia a múltiples fármacos de *C. elegans*, ratón u otras especies. Estos datos indican que el fragmento de 432 pb representan la secuencia de unión a ATP de un homólogo de Pgp de *H. contortus*.

Expresión de ARNm de Glicoproteína P en Cepas Resistentes y Susceptibles a Ivermectina de *H. contortus*

Una única especie animal puede tener diferentes Pgp que pueden variar de tamaño. La hibridación Northern, con el producto de la PCR del homólogo de *H. contortus* de Pgp de 432 pb, muestra que el tamaño molecular del ARNm para la Pgp de *H. contortus* es de aproximadamente 4 pb. No obstante, se ha encontrado que los niveles de ARNm de Pgp en cepas de *H. contortus* resistentes y susceptibles a ivermectina son diferentes. Como ilustración, los resultados de numerosas transferencias Northern representativas sobre ARN de huevos de *H. contortus* se muestran en la Fig. 3.

El ARN también es sondeado con una sonda de actina para permitir la corrección para diferentes cantidades de ARN cargadas sobre los geles. La intensidad de la banda de ARNm de Pgp varía con la cepa del parásito. Después de la corrección para la intensidad de la banda de actina, se ha encontrado que la cantidad de la banda de ARNm de 4 kb reconocido por la sonda de Pgp de 432 pb es mucho mayor en ambas cepas resistentes a ivermectina en comparación con sus respectivas cepas precursoras susceptibles a la ivermectina. El incremento varía del 250% al 670% tras la normalización para la expresión del ARNm de actina en las cepas resistentes y susceptibles al fármaco (Tabla 1). También se obtienen resultados similares en las comparaciones de la expresión de Pgp utilizando ARN extraído de *H. contortus* adulto.

La Tabla 1 muestra la intensidad relativa del ARNm para la glicoproteína P y la actina en cepas de *Haemonchus contortus* susceptibles y resistentes a ivermectina. El ARN es extraído de huevos de las respectivas cepas emparejadas de Merck (MKI) y American Cyanamid (ACI). Cada par susceptible y resistente es procesado al mismo tiempo. El ARN es separado sobre gel de agarosa y sondeado con las sondas radiomarcadas de Pgp de 432 pb de *H. contortus* y de *pBA1* de actina. La intensidad relativa de cada banda se determina, después de la autorradiografía en gel, mediante densitometría del gel. La intensidad de cada banda de Pgp se corrige en cuanto a la intensidad de su correspondiente banda de actina con el fin de ajustar las diferentes cantidades de ARN que han sido cargadas sobre los geles. Todas las comparaciones se realizan por pares (resistente (R) versus la correspondiente susceptible (S)).

TABLA 1

Comparación de Cepas	Razón R/S Corregida
MKIS/MKIR	6,77
MKIS/MKIR	6,08
MKIS/MKIR	2,57
ACIS/ACIR	4,19

Secuenciación de Homólogos de Glicoproteína P de la Genoteca de ADNc de *H. contortus*

Los clones más largos (4,2 kb, 3,5 kb y 2,7 kb) identificados utilizando la sonda de 432 pb, que se ha demostrado que son homólogos a la glicoproteína P, son total o parcialmente secuenciados. Las Figuras 4A a 4B muestran la secuencia de ADNc completa para el clon de PGP-A (4175 pb) que tiene una gran homología con los genes de la glicoproteína P conocidos tales como la proteína de resistencia a múltiples fármacos de *Xenopus* (*Xemdr*) y el gen *cepgpA* de *C. elegans* para la glicoproteína A. Las Figuras 5 y 6 muestran la secuencia parcial, en la dirección efectora (Fig. 5; PGP-A-5') y en la dirección antisentido (Fig. 6; PGP-A-3') del fragmento de ADNc que también es altamente homólogo a la glicoproteína P. Las Figuras 7-9 ilustran, respectivamente, la supuesta traducción a aminoácidos del ADNc de PGP-A, la secuencia de ADNc parcial del extremo 3' del clon PGP-O (3,5 kb), dirección antisentido, y la secuencia de ADNc parcial del extremo 3' del clon PGP-B (2,7 kb), dirección antisentido.

Diferencias del ADN Genómico Entre las Cepas Resistentes y Susceptibles a Ivermectina de H. contortus y Determinación de una Sonda de Acido Nucleico para la Detección de la Susceptibilidad o la Resistencia a Macrolactonas

Las hibridaciones de ADN genómico muestran que al menos dos bandas son reconocidas por la sonda de 432 pb en los mapas de digestión con ClaI y PstI de cepas susceptibles y resistentes a ivermectina. Los mapas de digestión con *EcoRI* muestran tres bandas que hibridan fuertemente y una banda ligera para las cepas tanto susceptibles como resistentes. No obstante, los patrones de digestión con PvuII son claramente diferentes entre las cepas resistentes y susceptibles a ivermectina (Fig. 10).

Los productos de la PCR son generados utilizando pares de cebadores que son específicos para los genes de Pgp de parásitos. En un ejemplo, el cebador inverso es específico para una región de 53 pares de bases de longitud presente en uno de los clones de Pgp (PG-O). El cebador directo hibrida con una región común a múltiples clones Pgp. El ADN genómico extraído de adultos de *H. contortus* macho individuales de poblaciones sensibles a IVM (24 gusanos) y resistentes a IVM (29 gusanos) (MKIS y MKIR) se utiliza como molde para la amplificación mediante PCR. Los productos de la PCR de Pgp, aproximadamente 900 pb de longitud, se digieren con la enzima de restricción DdeI y los productos de la digestión se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante (Fig. 11; véanse también las Figs. 17A-18C que ilustran los patrones de restricción diagnósticos para la resistencia después de la selección con ivermectina o moxidectina, utilizando diferentes cepas de gusanos y diferentes enzimas de restricción). El patrón de digestión para los gusanos de la población susceptible es variable, mientras el de los gusanos de la población resistente es más homogéneo. Un patrón de digestión idéntico de tres bandas (flechas) se encuentra en 28 de los 29 gusanos de la población resistente (Fig. 11, calles 11-18 y 20, por ejemplo), mientras solamente 4 o 5 gusanos de la población susceptible tienen este patrón (Fig. 11, calles 6 y 9, por ejemplo). Los ejemplos de las sondas se muestran en las Figuras 12A y 12B.

Estos resultados se repiten varias veces. Los datos de la PCR y los datos de la transferencia Southern indican claramente que la selección para la resistencia al endectocida lactónico macrocíclico ocasiona una reducción de la diversidad genética de los alelos de Pgp y que las diferencias en Pgp al nivel del ADN pueden ser detectadas mediante técnicas con sondas específicas tales como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), análisis de transferencia Southern y RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción).

Métodos Adicionales (Referencia)

Ejemplo 6

Establecimiento de la DL_{50} para Moxidectina e Ivermectina Contra H. contortus Susceptible y Resistente a Moxidectina en el Jerbo

A los jerbos, que son alimentados con una ración comercial normalizada a la cual se había añadido hidrocortisona al 0,02% 5 días antes de la infección, se les inoculan 1.000 *H. contortus* L₃ sin cubierta. El día 10 después de la inoculación, los jerbos se tratan con agua o diversas dosis de moxidectina o ivermectina oralmente. Cada grupo de tratamiento contiene 6 jerbos. Las cepas de parásito y las tasas de dosificación de antihelmíntico se muestran en la Tabla 2. Los resultados de estas titulaciones de dosis se muestran en las Figuras 13A-14B. Los análisis de próbitas se utilizan para estimar los niveles de DL_{50} para cada antihelmíntico frente a cada cepa. La DL_{50} estimada para la moxidectina frente a cepas susceptibles y resistentes a moxidectina son 0,010 y 0,017 mg/kg, respectivamente, y para la ivermectina los niveles de DL_{50} estimados son 0,024 y 0,046 mg/kg, respectivamente.

Los resultados indican que (i) la moxidectina es más potente que la ivermectina frente a cepas tanto susceptibles como resistentes a moxidectina, y (ii) *H. contortus* resistente a moxidectina tiene una resistencia secundaria a ivermectina.

ES 2 294 813 T3

TABLA 2

Tasas de dosificación (mg/kg) de moxidectina (mox) o ivermectina (ivm) frente a cepas resistentes y susceptibles a mox de *H. contortus* en jerbos (n=6)

COMPUESTO (mg/kg)	SUSCEPTIBLE (PF14)	RESISTENTE (MOF14)
CONTROL	---	---
MOX	0, 0125	0, 0125
MOX	0, 025	0, 025
MOX	0, 05	0, 05
MOX	0, 1	0, 1
IVM	0, 025	0, 025
IVM	0, 1	0, 1
IVM	0, 4	0, 4
IVM	1, 6	1, 6

Ejemplo 7

Determinación de la Toxicidad y la Eficacia del Verapamil Solo y Combinado con Ivermectina

Este experimento se realiza para determinar la toxicidad del verapamil, un agente de reversión de MDR débil, solo y combinado con ivermectina, la eficacia del verapamil solo frente a *H. contortus* y el efecto del verapamil a 20 mg/kg sobre la eficacia de la ivermectina frente a gusanos susceptibles y resistentes a moxidectina. Se utilizan tasas de dosificación de verapamil entre 20 y 80 mg/kg solo o combinado con ivermectina a 0,024 y 0,046 mg/kg en jerbos infectados con *H. contortus* susceptible o resistente a moxidectina. El verapamil se administra concomitantemente con la ivermectina por la ruta oral. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 294 813 T3

TABLA 3

Demostración de la toxicidad y eficacia del verapamil (VRP) con o sin ivermectina frente a cepas resistentes o susceptibles a moxidectina de H. contortus en jerbos (n = núm. por grupo)

COMPUESTO (mg/kg)	NÚM. SUSCEPTIBLES (PF14)	NÚM. RESISTENTES (MOF14)
CONTROL	5	5
VRP 20	5	5
VRP 40	3	3
VRP 60	3	3
VRP 80	3	3
IVM**	5	5
IVM/VRP 20	5	5
IVM/VRP 40	5	5
IVM/VRP 60	5	5
IVM/VRP 80	5	5
** La dosis de ivermectina es de 0,024 mg/kg frente a la cepa PF14 y de 0,046 mg/kg frente a la cepa MOF14.		

Como no se observan muertes ni otros signos de toxicidad a una tasa de dosificación de verapamil de 20 mg/kg, en ausencia o presencia de ivermectina, esta tasa de dosificación se utiliza para experimentos siguientes de reversión de la resistencia. Se ha encontrado que el verapamil solo no tiene un efecto significativo sobre los recuentos de gusanos a ninguna de las tasas de dosificación utilizadas.

La toxicidad del verapamil se resume en la Tabla 4.

TABLA 4

Toxicidad de verapamil en jerbos

VRP (mg/kg)	MUERTES - VRP SOLO	MUERTES - VRP + IVM*
20	0/10	0/10
40	0/5	2/10
60	1/6	1/10
80	3/7	2/10
* La ivermectina se utiliza a 0,24 mg/kg o 0,046 mg/kg según la Tabla 3.		

ES 2 294 813 T3

Debido a la toxicidad del verapamil a tasas de dosificación de 40 mg/kg y superiores, solamente se consideran los efectos del verapamil a 20 mg/kg sobre la eficacia de la ivermectina frente a gusanos susceptibles y resistentes a moxidectina. Estos resultados, mostrados en las Figuras 15A y 15B, se resumen en la Tabla 5. El verapamil a 20 mg/kg aumenta significativamente la eficacia de la ivermectina frente a gusanos resistentes a moxidectina.

TABLA 5

Efecto del verapamil (20 mg/kg) sobre la eficacia (%) de la ivermectina

CEPA	SUSCEPTIBLE (PF14)	RESISTENTE A MOX (MOF14)
TRATAMIENTO (mg/kg)	% EFICACIA*	% EFICACIA*
CONTROL	0	0
VRP 20	17 (n.s.)	-53 (n.s.)
IVM [#]	54 (A)	79 (A)
IVM [#] /VRP 20	92 (A)	96 (B)
# La ivermectina se administra a 0,024 mg/kg a jerbos infectados con la cepa PF14 y a 0,046 mg/kg a jerbos infectados con la cepa MOF14. "n.s." indica que los recuentos de gusanos no son significativamente diferentes de los controles; "A" representa significativamente diferente de los controles, pero no de otros recuentos de gusanos, de la misma cepa, con la misma letra; "B" representa recuentos de gusanos significativamente diferentes de "A" para la misma cepa y tasa de dosificación de ivermectina.		

Ejemplo 8

Efectos del Verapamil sobre la Eficacia de Moxidectina e Ivermectina Frente a H. contortus Susceptible y Resistente a Moxidectina

Este experimento se realiza con jerbos para determinar los efectos del verapamil a 20 mg/kg sobre la eficacia de la moxidectina y la ivermectina frente a *H. contortus* susceptible y resistente a moxidectina. Todos los tratamientos tienen 7 jerbos/grupo. Las tasas de dosificación de moxidectina e ivermectina se seleccionan para dar aproximadamente un 50% de eficacia en ausencia de verapamil. El verapamil a 20 mg/kg aumenta significativamente la eficacia de la moxidectina frente a los gusanos resistentes. El incremento observado cuando se administra simultáneamente verapamil con ivermectina no es significativo en este experimento ya que la eficacia obtenida con la ivermectina ya es relativamente alta. Los resultados se muestran en la Tabla 6 (véase la representación gráfica de los resultados en las Figuras 16A y 16B).

ES 2 294 813 T3

TABLA 6

Efecto del verapamil sobre la eficacia (%) de moxidectina e ivermectina frente a la cepa resistente a moxidectina de *H. contortus* (MOF14)

TRATAMIENTO	RECuento DE GUSANOS (MEDIA $\pm$ E.T.)	EFICACIA (%) SIGNIFICACION A $P < 0,05$
PLACEBO	46 $\pm$ 7	--- A#
VRP*	80 $\pm$ 9	-73 A
MOX (0.017 mg/kg)	14 $\pm$ 3	70 B
MOX (0.017 mg/kg) + VRP*	2 $\pm$ 1	96 C
IVM (0.028 mg/kg)	9 $\pm$ 1	80 B
IVM (0.028 mg/kg) + VRP*	3 $\pm$ 1	93 B
* El verapamil se administra a 20 mg/kg. Todos los tratamientos son por ruta oral. # Las diferentes letras indican que los recuentos medios de gusanos son estadísticamente diferentes. No obstante, los resultados de la ivermectina ($\pm$ verapamil) no se comparan con los resultados de la moxidectina ($\pm$ verapamil). El propio verapamil aumenta los recuentos de gusanos, pero el recuento medio no es estadísticamente diferente del control.		

Este experimento confirma que el agente de reversión de MDR débil verapamil supera la resistencia en nematodos a las macrolactonas. Estos resultados son totalmente coincidentes con la evidencia molecular anterior de que la resistencia a las macrolactonas está asociada con la expresión en exceso de homólogos de la glicoproteína P debido a un cambio en el ADN de la glicoproteína P en los parásitos resistentes. Los agentes de reversión de MDR más potentes, tales como la ciclosporina A, SDZ-PSC 833 u otros potentes agentes de reversión pueden incrementar notablemente la eficacia de los endectocidas lactónicos macrocíclicos frente a los parásitos resistentes.

En lo anterior, se ha proporcionado una descripción detallada de las realizaciones concretas de la presente invención con fines ilustrativos y no limitantes.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una molécula de ácido nucleico obtenible de un nematodo y que codifica un homólogo de la glicoproteína P, para detectar la resistencia a un compuesto lactónico macrocíclico basada en cambios en el ADN genómico de una plaga de nematodos, donde dicho compuesto lactónico macrocíclico se selecciona del grupo que consiste en

LL-F28249a- λ ,

un derivado 23-oxo de LL-F28249a- λ ,

un derivado 23-imino de LL-F28249a- λ ,

un derivado 23-semicarbazona de LL-F28249a- λ ,

un derivado 23-tiosemicarbazona de LL-F28249a- λ ,

una avermectina, y

una milbemicina;

donde dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que muestra un patrón de digestión con las enzimas de restricción en una transferencia Southern coincidente con la secuencia de nucleótidos identificada como PGP-A mostrada en el SEQ ID NO: 3,

PGP-A-3' mostrada en el SEQ ID NO: 5 (número de acceso ATCC 98336),

PGP-B-3' mostrada en el SEQ ID NO: 8 (número de acceso ATCC 98307), o

PGP-O-3' mostrada en el SEQ ID NO: 7 (número de acceso ATCC 98309); o

un fragmento o hebra complementaria de la misma; o dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida a aproximadamente 65°C en presencia de un tampón de dextrano a lo largo de al menos aproximadamente 4 horas con una secuencia de nucleótidos identificada como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B-3', o PGP-O-3'.

2. El uso según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos identificada como

PGP-A mostrada en el SEQ ID NO: 3,

PGP-A-3' mostrada en el SEQ ID NO: 5,

PGP-B-3' mostrada en el SEQ ID NO: 8, o

PGP-O-3' mostrada en el SEQ ID NO: 7; o

un fragmento o una hebra complementaria de la misma; o dicha molécula de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que hibrida a aproximadamente 65°C en presencia de un tampón de dextrano a lo largo de al menos aproximadamente 4 horas con una secuencia de nucleótidos identificada como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B-3', o PGP-O-3'.

3. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha plaga de nematodos es *Haemonchus contortus*.

4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende comparar una molécula de ácido nucleico que codifica un homólogo de glicoproteína P extraído de un espécimen de dicha plaga de nematodos con

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica un homólogo de glicoproteína P extraído de un espécimen del nematodo que se sabe que es resistente al compuesto lactónico macrocíclico y

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica un homólogo de glicoproteína P extraído de un espécimen del nematodo que se sabe que es susceptible al compuesto lactónico macrocíclico.

5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende hibridar la molécula de ácido nucleico extraída de un espécimen de una plaga de nematodos con una sonda de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 1.

ES 2 294 813 T3

6. El uso según la reivindicación 4, **caracterizado** por la mezcla de una a tres de las moléculas de ácido nucleico con un cebador de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR); por medio de lo cual el cebador de PCR o RT-PCR comprende una secuencia de nucleótidos entre PGP2S del SEQ ID NO: 9 y PGPAS del SEQ ID NO: 10 en las direcciones efectora y antisentido, respectivamente, o una secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 1.

7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una PCR que utiliza cebadores, estando seleccionados dichos cebadores del grupo que consiste en PGP2S del SEQ ID NO: 9, PGPAS del SEQ ID NO: 10, cebadores preparados a partir de secuencias completas o parciales de ácidos nucleicos identificados como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B-3', y hebras complementarias de los mismos; y una secuencia de nucleótidos que hibrida a aproximadamente 65°C en presencia de un tampón de dextrano a lo largo de al menos aproximadamente 4 horas con una secuencia de nucleótidos identificada como PGP-A, PGP-A-3', PGP-B-3', o PGP-O-3'.

8. El uso según la reivindicación 6 o 7, que comprende el análisis del polimorfismo de la longitud de restricción de los productos de la PCR de la reivindicación 6 o 7 cortando los productos de la PCR con enzimas de restricción y haciendo correr las secuencias digeridas sobre un gel de electroforesis.

9. Una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la misma, codificando dicha molécula de ácido nucleico o dicho fragmento un homólogo de glicoproteína P, donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos identificada como

PGP-A mostrada en el SEQ ID NO: 3,

PGP-A-3' mostrada en el SEQ ID NO: 5 (número de acceso ATCC 98336),

PGP-B-3' mostrada en el SEQ ID NO: 8 (número de acceso ATCC 98307), o

PGP-O-3' mostrada en el SEQ ID NO: 7 (número de acceso ATCC 98309), o una hebra complementaria de la misma.

10. Un plásmido o vector viral biológicamente funcional **caracterizado** por contener la molécula de ácido nucleico o el fragmento definido en la reivindicación 9.

11. Una célula anfitriona adecuada transformada o transfectada establemente por medio de un vector **caracterizado** por comprender la molécula de ácido nucleico o el fragmento según la reivindicación 9.

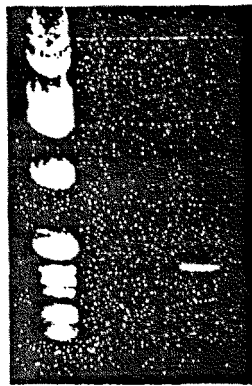


Fig. 1

1 ACGGTGGCGT TTGTTGGGCA GTCTGGTTGT GGAAAGCA CTGTGAAGGC GTTGTGGAA
61 CGGTTTACA ATCAAAACA GGGCGTGATT ACGACGCCG AAACATCAG AAACATGAAC
121 ATACGCAATC TTGTTGAGCA AGTGTGTATT GTAAGCCAGG AACCAACGCT GTTCGACTGT
181 ACCATCATGG AAAACATCTG TTACGGTCTC GATGACCCCA AGCTCCTACG AACAGGTTGT
241 TGCTGCAGCA AAATCGGTG AGTCGAATG GCGAACATTC ACNATTTTGT GCTGGGACTA
301 CCAGAGGGTT ACGATACGG TGTTGGTGAG AAAGGCACTC AGCTGTCAGG CGACACAGAAG
361 AAACGAATAG CCATAGCCAG ACGCTGATT CGAGATCCGC CTATACTTCT GCTGGATGAG
421 GCTACGACGG CC

FIG. 2A

1 TVAFVQSGC GKSTVKALLE RFYNQKQVI TDAENIRNMN IRNLREQVCI VSQEPTLFDK
61 TIMENICYGL DDPKLLRTGC CCSKIGRDEM ANIHFVLGL PEGYDTRVGE KGTQLSGGQK
121 KRIAIARALI RDPPIILLDE AITTA

FIG. 2B

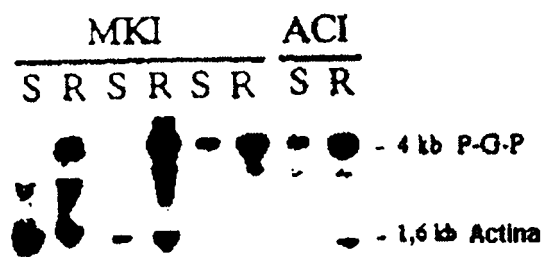


Fig. 3

```

1  GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGAGATCGTT CTCAAGCTGG TAAATGTTT GAAAAAGGCC
61  AAGATGATGA ACGTATACCA TTACTCGGTT CATCCAAGAA AAGTTCAATC GGCGAAGTCA
121  GTAAAAAAGA AGAACCGGCT ACAATAACAA ACCGTGGAAT TCTCTCCTTA GCCACTACAT
181  TGGATTATGT GCTTCTTGCG GCTCGTACGC TGGCGCCGTG TGTTCATGGC GCTGGATTCT
241  CAGTACTCGG TATTGTACTC GGTGGTATGA CGACAGTCTT TCTCAGAGCT CAGAACTCAG
301  AATTGGTTCT GGGCACTGTT AGTCGGGATC CTGAAGCGCT ACCAGCTCTT ACTAAAGGAG
361  AATTTGACAC ACTAGTACGT AGGTATTGCT TATACTACCT TGGATTAGGC TTTGCTATGT
421  TTGCAACATC TTATATACAG ATTGTGCTTT GGGAGACGTT CCGCGAAGCA ATTACCCATA
481  AATTACGAAA AATTTATCTA AAAGCCATAC TTGGGCAGCA GATCTCATGG TTTGACATTG
541  AACAAACAGG AAATCTCACA GCTCGTCTAA CCGATGATCT CGAACGTGTT CGTGAAGGAC
601  TTGGTGATAA ACTGTCCGCT TTTATACAAA TGGTGTCTGC TTTTGTGGCT GTTTCTGTG
661  TAGGATTTCG GTATAGCTGG TCAATGACGC TCGTGATGAT GGTGCTGGCG CCGTTTATAG
721  TTATTTCTGC TAATTGGATG TCAAAAATCG TTGCTACTAG GACCCAAGTT GAACAGGAAA
781  CCTACGCTGT TGCCCGTGCT ATAGCGGAGG AGACTTTCTC ATCGATACGA TCCGTACACT
841  CGATATGTGG CCATAAAAGA GAGCTAACAA GATTTGAGGC AGCGTTGGAG AAAGGACGTC
901  AGACAGGCGT TGTCAAATAT TTCTATATGG GTGTTGGTGT GGGATTTGGT CAGATGTGTA
961  CCTATGTGTC CTACGCTTTC GCTTTTGGT ATGGCAGTGT ACTGATCATC AACGACCTG
1021  CATTGGATCG TGGCGGAATT TTCACAGTCT TTTTGTGCTG GATGTCCCGC TCAGCAGCTC
1081  TCGGCACATG TCTGCCACAT CTTAACACCA TATCCATCGC TCGAGGAGCG GTACGAAGTG
1141  TACTGTCACT GATTAAATAGT AGTCCAAAAA TCGATCCCTA TTCGTTAGAT GGCATTGTGC
1201  TCAACAATAT CAGAGGATCT ATCCGCTTCA AGAAGCTGCA TTTCTCCTAT CTTTCCCGAA
1261  GAACATTGCA GATATTGAAA GGTGTGTCAC TCGAAGTGTC GGTGGCCAA AAAATTGCTT
1321  TGGTGGGTTT AAGCGGTTGT GGAAGTCAA CGAAGCTCAA TTTATTATTG AGATTTTATG
1381  ATCCGACAAG GGGAAAGGTA ACCATAGATG ATATTGATGT GTGTGATCTC AACGTGCAAA
1441  AACTTCGTGA ACAAATCGGT GTTGTTAGTC AGGAACCAGT GCTTTTTCAT GGCACACTAT
1501  TCGAAAATAT CAAGATGGGT TATGAACAGG CCACAATGGA GAGGTTCCAA GAAGCGTGCC
1561  CTGTGGCGAA TGCTCCCGAC TTTACCAAAC GACTTCCAGA AGGTTACGGC ACCCGAGTTG
1621  GTGAACGTGG TGTGCAGTTA AGTGGCGGAC AAAAGCAGCG AATTGCCATA CCTCGTGCGA
1681  TCATCAAGAA CCTCGCATA CTGCTGCTCG ATGAAGCCAC CAGTGCTCTA GACACAGAAG
1741  CGGAATCAAT CGTGCAAGAG GCTCTGGAGA AGGCTCAAAA AGGGAGAACA ACCGTCAATTG
1801  TAGCGCATCG TCTGTCTACT ATCAGAAACG TGGATCAGAT TTTGTTTTTC AAGAACGGAA
1861  CGATCGTTGA GCAGGCACT CATGCCGAGT TGATGAACAA ACGTGGAGTA TTCTTTGAAA
1921  TCACTCAAGC ACAAGTCTC CGACAAGAGA AGGAAGAGGA AGTTTTAGAT AGCGATGCGG
1981  AATCCGATGT CGTGTCACCG GATATTGCAT TACCCCATCT TAGTTCACTT CGATCCCGTA
2041  AAGAATCCAC AAGAAGTGCT ATCTCCCGCG TCCCAGCGT TCGAAGTATG CAAATCGAAA
2101  TGGAGGACCT TCGTGCCAAA CCAACTCCAA TGTGAAAAAT TTTCTATTTT AACCGTGACA
2161  AATCGGATA TTTCATTTTG GGACTCATCG CCTGTATTAT TACTGGAAGT GTTACACCGA
2221  CATTTGCACT TTTATATCGG CAGATCATAC AGGTATACTC GGAACCTGTT GATCAAAATG
2281  AAGGCCATCT GCTGTCTCG TGTCGAGCTT TCATCGTCAT TGGTCTCGTA CACGCTTTTG
2341  CGTTCTTTTT CTGCGCTATT TGTTTGGGAC GTTGGCGCGA AGCGTTAAGC AAAAAATTAC
2401  GTTTGAGGCG GTTCAAGAAC CTTCTGGGAC AGAATGTGGG ATTCTACGAC GATATCCGAC
2461  ACCGTACCGG TAAACTCTGT ACCCGATTTC CTACAGATGC ACCCAATGTC CGATATGTGT
2521  TCACTCGACT TCCGGGTGTG CTTTCAATCG TGGTGACCAT AATTGGAGCT TTTGTTATTG
2581  GATTCACTTT CCGGTGGCAG CTGCTTTTGA TTCTTATGGT GATGGTACCG TTGATCATCG
2641  GTAGTGGATA CTTTCGAGATG GGCATGCACT TTGGTAAGAA GATCGGTGAC ACAGAGCTTC
2701  TTGAAGAGGC TCGGAAAGTT GCCTCTCAAG CCGTGGAGAA CATTCGTACC GTGCATGCCC
2761  TGAATAGGCA AGAGCAGTTC CATTTCAATG ATTGGAGTA TTTGAAGGAA CCTATCGAG
2821  AAAATCTTTG CCAGGCGCAC ACCTACGGGG GTGTATTGCG GTTCTACAA TCGTTGTTAT
2881  TCTTTATGTA TGCTGTAGCA TTTTGGATTG GTGCAATCTT CGTGGACAAC CACAGCATGC
2941  AACCGATTGA CGTTTACCGA GTATTTTTTC CGTTCAATGT TGTGGACAA ATGTCGGCA

```

FIG. 4A

```

3001 ACATTTCTTC TTTTATTCCT GACGTTGTGA AAGCTCGCCT GGCTGCATCG CTCCTTTTCT
3061 ACCTTATCGA ACACCCATCA GAAATTGATA ATTTGTCCGA GGATGGTGTG ACGAAGAAAA
3121 TCCTCGGTCA TATCTCGTTC CGCAATGTCT ATTTCAATTA TCCGACAAGA AGACAGATCA
3181 GAGTACTCCG TGCACCTAAC CTAGAGATAA ATCCTGGCAC GACGGTAGCG CTGTGTGGGC
3241 AGTCTGGTTG TCGAAAAAGC ACTGTGATCG CGTTGTTTGA ACUGTTTTAC AATCAAAACA
3301 AGGGCGTGAT TACGGTGGAC GCGGAAAACA TCAGAAACAT GAACATACGC AATCTTCGTG
3361 AQCAAGTGTG TATTGTTAGC CAGGAACCAA CGCTGTTTGA CTGTACCATC ATGAAAAACA
3421 TCTGTTACCG TCTCGATGAC CCCAAGCCGT CCTACGAACA GGTGTTTGCT GCAGCAAAAA
3481 TGGCGAACAT TCACAATTTT GTGCTGGGAC TACCAGAGGG TTACGATACG CGTGTTCGTG
3541 ARAAAGGCAC TCAGCTGTCA GCGCGACAGA AGCAACGAAT AGCCATAGCC AGAGCGCTGA
3601 TTCGAGATCC GCCTATACTT CTGCTGGATG AGGCGACAAG CGCGCTGGAT ACCGAGAGTG
3661 AAAAGATCGT GCAAGACGCC CTAGAGGTTG CTCGCCAAGG TAGAACGTGC CTGTAAATTG
3721 CCCATCGCCT TTCTACAATT CAAGACAGTG ACGTCATAGT GATGATCCAG GACGGGAAAG
3781 CTACAGACAG AGGCACTCAT GAACATTTAC TGATGAAGAA CGATCTATAC AAACGGCTAT
3841 GCGAAACACA ACGACTCGTT GAATCACAAT GAGTTTTTAG TGCCAATCGA TAGTGATCGA
3901 TAAGCTATGG ATTACTCTTT AACACTTACT GATCATATGA CTCTATCTCG TGCTTTATTA
3961 TAATGTACAT ATGTAATGGT TTTGATCTTA CATATCTTGT AATTGGTCCT CACTATCATA
4021 ATGCCTTTAG TAGTATATTA ACAGTTTTAT TAATACAAC TAAGTAACAT ATTAACAATT
4081 TTATTTAATAT AACTTAAGTA AGATATTGAC AGTTTTATTA ATTTGGAGGA TTTATAATAA
4141 AACCTCGTGC CGCTCGTGCC GAAACGATAT CAAGC

```

FIG. 4B

```

1  GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGAGATCGTT CTCAAGCTGG TAAAAATGTTT GAAAAAGGCC
61  AAGATGATGA ACGTATACCA TTACTCGGTT CATCCAAGAA AAGTTCAATC GGCGAAGTCA
121 GTAAAAAAGA AGAACCGCCT ACAATAACAA ACCGTGGAAT TCTCTCCTTA GCCACTACAT
181 TGGATTATGT GCTTCTTGCG GCTGGTACGC TCGCGCCGTG TGTTCATGGC GCTGGATTCT
241 CAGTACTCGG TATTGTACTC GGTGGTATGA CGACAGTCTT TCTCAGAGCT CAGAACTCAG
301 AATTTCGTTCT GGGCACTGTT AGTCGGGATC CTGAAGGGCT ACCAGCTCTT ACTAAGGAAG
361 AATTTCGACAC ACTAGTACGT AGGTATTGCT TATACTACCT TGGATTAGGC TTTGCTATGT
421 TTGCAACATC TTATATACAG ATTGTGTGTT GGGAGACGTT CGCCGAACGA ATTACCCATA
481 AATTACGAAA AATTATCTA AAAGCCATAC TTCGGCAGCA GATCTCATGG TTTGACATTG
541 AACAAACAGG AAATCTCACA GCTCGTCTAA CCGATGATCT CGAACGTGTT CGTGAAGGAC
601 TTGGTGATAA ACTGTCGCTT TTTATACAAA TGGTGTCTGC TTTTGTGGCT GGTTCCTGTG
661 TAGGATTCCG GTATAGCTGG TCAATGACGC TCGTGATGAT GGTCTGTGGC CCGTTTATAG
721 TTATTTCTGC TAATTGGATG TCAAAAATCG TTGCTACTAG GACCCAAGTT GAACAGGAAA
781 CCTACGCTGT TGCCGGTGCT ATAGCGGAGG AGACTTTCTC ATCGATACGA ACCGTACACT
841 CGATATGTGG CCATAAAAGA GAGCTAACAA GATTTGAGGC AGCGTTGGAG AAAGGACGTC
901 AGACAGGCCT TGTCAAATAT TTCTATATGG GTGTTGGTGT GGGATTTGGT CAGATGTGTA
961 CCTATGTGTC CTACGCCTTG GCTTTTGGT ATGGCAGTGT ACTGATCATC AACGACCCTG
1021 CATTGGATCG TGGCCGAATT TTCACAGTCT TTTTGTGCTG GATGTCCGGC TCAGCAGCTC
1081 TCGGCACATG TCTGCCACAT CTTAACACCA TATCCATCGC TCGAGGAGCG GTACGAAGTG
1141 TACTGTCAGT GATTAATAGT CGTCCAAAAA TCGATCCCTA TTGTTTAGAT GGCATTGTGC
1201 TCAACAATAT GAGAGGATCT ATCCGCTTCA AGAACGTGCA TTCTCTCTAT CCTTCCCGAA
1261 GAACATTGCA GATATTGAAA GGTGTGTCACT TGCAAGTGTC GGCTGGCCAA AAAATTGCTT
1321 TCGTGGGTTC AAGCGGTTGT GGAAAGTCAA CGAACGTCAA TTTATTATTG AGATTTTATG
1381 ATCCGACAAG GGGAAAGGTA ACCATAGATG ATATTGATGT GTGTGATCTC AACGTGCAAA
1441 AACTTCGTGA ACAAATCGGT GTTGTTAGTC AGGAACCAGT GCTTTTTCGAT GGCACACTAT
1501 TCGAAAATAT CAAGATGGGT TATGAACAGG CCACAATGGA GGAGGTCCAA GAAGCGTGCC
1561 GTGTGGCGAA TGCTGCCGAC TTCACCAAAC GACTTCCAGA AGGTTACGGC ACCCGAGTTG
1621 GTGAACGTGG TGTGCAGTTA AGTGGCGGAC AAAAGCAGCG AATTGCCATA GCTCGTGCGA
1681 TCATCAAGAA CCTCGCATA CTGCTGCTCG ATGAAGCCAC CAGTGCTCTA GACACAGAAG
1741 CGGAATCAAT CGTGCAAGAG GCTCTGGAGA AGGCTCAAAA AGGGAGAACA ACCGTCATTG
1801 TAGCGCATCG

```

FIG. 5

```

1 AGTGCTTTTC GATGGCACAC TATTCGAAAA TATCAAGATG GGTTATGAAC AGOCCACAAT
61 GGAGGAGGTC CAAGAAGCGT GCCGTGTGGC GAATGCTGCC GACTTCACCA AACGACTTCC
121 AGAAGGTTAC GGCACCCGAG TTGGTGAACG TGGTGTGCAG TTAAGTGGCG GACAAAAGCA
181 GCGAATTGCC ATAGCTCGTG CGATCATCAA GAACCTCGC ATACTGCTGC TCGATGAAGC
241 CACCAGTGCT CTAGACACAG AAGCGGAATC AATCGTGCAA GAGGCTCTGG AGAAGGCTCA
301 AAAAGGGAGA ACAACCGTCA TTGTAGCGCA TCGTCTGTCT ACTATCAGAA ACGTGGATCA
361 GATTTTTCGT TTCAAGAACG GAACGATCGT TGAGCAGGGC ACTCATGCCG AGTTGATGAA
421 CAAACGTGGA GTATTCTTTG AAATGACTCA AGCACAAGTC CTCCGACAAG AGAAGGAAGA
481 GGAAGTTTTA GATAGCGATG CGGAATCCGA TGTCTGTGTA CCGGATATTG CATTACCCCA
541 TCTTAGTTCA CTTCGATCCC GTAAAGAATC CACAAGAAGT GCTATCTCCG CGGTCCCCAG
601 CGTTTCGAAGT ATGCAAAATCG AAATGGAGGA CCTTCGTGCC AAACCAACTC CAATGTCGAA
661 AATTTTCTAT TTTAACCGTG ACAAATGGGG ATATTTCATT TTGGGACTCA TCGCCTGTAT
721 TATTACTGGA ACTGTTACAC CGACATTTGC AGTTTTATAT GCGCAGATCA TACAGGTATA
781 CTCGGAACCT GTTGATCAAAA TCAAAAGGCCA TGTGCTGTTT TGGTGTGGAG CTTTTCATCGT
841 CATTGGTCTC GTACACGCTT TTGCGTTCTT TTTCTCGGCT ATTTGTTTGG GACGTTCCGG
901 CGAAGCGTTA ACGAAAAAAT TACGTTTCGA GCGTTCAAG AACCTTCTGC GACAGAATGT
961 GGGATTCTAC GACGATATCC GACACGGTAC CGGTAACCTC TGTACGCGAT TTGCTACAGA
1021 TGCACCCAAT GTCCGATATG TGTTCACTCG ACTTCCGGGT GTGCTTTCAT CCGTGGTGAC
1081 CATAATTGGA GCTTTGGTTA TTGGATTTCAT CTTCGGGTGG CAGCTGGCTT TGATTCTTAT
1141 GGTGATGGTA CCGTTGATCA TCGGTAGTGG ATACTTCGAG ATGCGCATGC AGTTTGGTAA
1201 GAAGATGCGT GACACAGAGC TTCTTGAAGA GGCTGGGAAA GTTGCCCTTC AAGCCGTGGA
1261 GAACATTGCT ACCGTGCATG CCTTGAATAG GCAAGAGCAG TTCCATTTC TGTATTGCGA
1321 GTATTTGAAG GAACCTTATC GAGAAAAATCT TTGCCAGGCG CACACCTACG GGGGTGTATT
1381 CGCGTTCTCA CAATCGTTGT TATTCTTTAT GTATGCTGTA GCATTTTGA TTGTCGAAT
1441 CTTTCGTGAC AACCACAGCA TGCAACCGAT TGACGTTTAC CGAGTATTTT TCCCGTTCAT
1501 GTTTTGTGGA CAAATGCTCG GCAACATTTT TTCTTTTATT CCTGACGTTG TGAAGCTCG
1561 CCTGGCTGCA TCGCTCCTTT TCTACCTTAT CGAACACCCA TCAGAAATTG ATAATTGTC
1621 CGAGGATGGT GTACGAAGA AAATCTCTCG TCATATCTCG TTCCGCAATG TCTATTTCAA
1681 TTATCCGACA AGAAGACAGA TCAGAGTACT CCGTGGACTT AACCTAGAGA TAAATCCTGG
1741 CACGACCGTA GCGCTGTTG GCGAGTCTGG TTGTGGAAAA AGCACTGTGA TGGCGTTGTT
1801 GGAACGGTTT TACAATCAAA ACAAGGGCGT GATTACGGTG GACGGCGAAA ACATCAGAAA
1861 CATGAACATA CGCAATCTTC GTGAGCAAGT GTGTATTGTT AGCCAGGAAC CAACGCTGTT
1921 CGACTGTACC ATCATGGAAA ACATCTGTTA CGGTCTCGAT GACCCCAAGC CGTCTTACGA
1981 ACAGGTTGTT GCTGCAGCAA AAATGGCGAA CATTCACAAT TTTGTGCTGG GACTACCAGA
2041 GGGTTACGAT ACGCGTGTG GTGAAAAAGG CACTCAGCTG TCACGCGAC AGAAGCAMCG
2101 AATAGCCATA GCCAGAGCGC TGATTGAGGA TCCGCCTATA CTTCTGCTGG ATGAGCGGAC
2161 AAGCGCGCTG GATACCGAGA GTGAAAAGAT CGTGCAAGAC GCCCTAGAGG TTGCTCGCCA
2221 AGGTAGAAGC TGCTTGTAA TTGCCATCG CCTTCTTACA ATTCAAGACA GTGACGTCAT
2281 AGTGATGATC CAGGAGGGGA AAGCTACAGA CAGAGGCACT CATGAACATT TACTGATGAA
2341 GAACGATCTA TACAAACGGC TATGCGAAAC ACAACGACTC GTTGAATCAC AATGAGTTTT
2401 TAGTGCCAAT CGATAGTCAT CGATAAGCTA TGGATTAGTC TTTAACACTT ACTGATCATA
2461 TCACTCTATC TCGTCTTTA TTATAATGTA CATATGTAAT GGTTTTGTATC TTACATATCT
2521 TGTAAATGGT CCTCACTATC ATAATGCCTT TAGTAGTATA TTAACAGTTT TATTAATACA
2581 ACTTAAGTAA CATATTAACA ATTTTATTAA TATAACTTAA GTAAGATATT GACAGTTTTA
2641 TTAATTTGGA GGATTTATAA TAAAACCTCG TGCCGCTCGT GCCGAAACGA TATCAAGC

```

FIG. 6

```

1  MFEKGQDDER  IPLLGSSKKS  SIGEVSKKEE  PPTITNRGIL  SLATTLDYVL  LAAGTLAPCV
61  HGAGFSVLGI  VLGGMTTVFL  RAQNSEFVLG  TVSRDPEGLP  ALTKEEFDL  VRRYCLYYLG
121 LGFAMFATSY  IQIVCWETFA  ERITHKLRKI  YLKAILRQOI  SWFDIQQTGN  LTARLTDDLE
181 RVREGLGDKL  SLFIQMVSFA  VAGFCVGFAY  SWSMTLVMMV  VAPFIVISAN  WMSKIVATRT
241 QVEQETYAVA  GAIAEETFSS  IRTVHSICGH  KRELTRFEAA  LEKGRQTGLV  KYFYMGVGVG
301 FGQMCTVYSY  ALAFWYGSVL  IINDPALDRG  RIFTVFFAVM  SGSAALGTCL  PHLNTISIA
361 GAVRSVLSVI  NSRPKIDPYS  LDGIVLNNMR  GSIRFKNVHF  SYPSRRTLQI  LKGVSLQVSA
421 GQKIALVGSS  GCGKSTNVNL  LLRFYDPTRG  KVTIDDIDVC  DLNVQKLREQ  IGVVSQEPVL
481 FDGTLFENIK  MGYEQATMEE  VQEACRVANA  ADFTKRLPEG  YGTRVGERGV  QLSGGQKQRI
541 AIARAIIKNP  RILLDEATS  ALDTEAESIV  QEALEKAQKG  RTTVIVAHRL  STIRNVQDIF
601 VFKNGTIVEQ  GTHAELMNKR  GVFFEMTQAO  VLRQEKEEEV  LDSDAESDVV  SPDIALPHLS
661 SLRSRKESTR  SAISAVPSVR  SMQIEMEDLR  AKPTPMSKIF  YFNDRKWGYF  ILGLIACIIT
721 GTVTPTFAVL  YAQIIQVYSE  PVDQMKGHVL  FWCGAFIVIG  LVHAFAFFFS  AICLGRGGEA
781 LTKKLRFEAF  KNLLRQNVGF  YDDIRHGTGK  LCTRFBTAP  NVRVVFTRLP  GVLSSVVTII
841 GALVICFIFG  WQLALILMM  VPLIIGSGYF  EMRMQFGKKM  RDTELLEAG  KVASQAVENI
901 RTVHALNRQE  QHFMYCEYL  KEPYRENLQ  AHTYGGVFAF  SQSLLFFMYA  VAFWIGAIFV
961 DNHSMQPIDV  YRVFFAFMFC  GQMVGNISF  IPDVVKARLA  ASLLFYLIEH  PSEIDNLSED
1021 GVTKKISGHI  SFRNVYFNYP  TRRQIRVLRG  LNLEINPGTT  VALVGQSGCG  KSTMALLER
1081 FYNQNKGVIT  VDGENIRNMN  IRNLREQVCI  VSQEPFLFDC  TIMENICYGL  DDPKPSYEQV
1141 VAAAKMANIH  NFVLGLPEGY  DTRVGEKGTQ  LSGGQKQRIA  IARALIRDP  ILLLDATS
1201 LDTSEKIVQ  DALEVARQGR  TCLVIAHRLS  TIQDSDVIM  IQEGKATDRG  THEHLLMND
1261 LYKRLCETQR  LVESQ*

```

FIG. 7

```

1  CCCGTTGTTG  CCCGTCCTAT  AGCGGAGGAG  ACTTTCTCAT  CGATACGAAC  CGTACACTCG
61  TTATGTGGCC  ATAAAAGAGA  CCTAACACAG  CAGCGTTGGA  GAAAGGACGT  CAGACAGGCC
121  TTGTCAAATA  TTTCTATATG  GGTGTTGGTG  TGAGATTTGG  TCAGATGTGT  ACCTATGTGT
181  CCTACGCCCT  GGCTTTTTCG  TATGGCAGTG  TACTGATCAT  CAACGACCCCT  GCATTGGATC
241  GTGGCCGAAT  TTTACAGTC  TTTTGTGTGT  GATGTCCGGC  TCAGCAGCTC  TCGGCACATG
301  TCTGCCACAT  CTTAACACCA  TATCCATCGC  TCGAGGAGCG  GTACGAAGTG  TACTGTCACT
361  GATTAATAGT  CGTCCAAAAA  TCGATCCCTA  TTCGTTAGAT  GGCATTGTGC  TCAACAATAT
421  GAGAGGATCT  ATTCCGTTCA  AGAACGTCCA  TTTCTCCTAT  CCTTCCCGAA  GAACATTGCA
481  GATATTGAAA  GGTGTGTGAC  TGCAAGTGTC  GGTGCGCCAA  AAAATTGCTT  TGGTGGGTTT
541  AAGCGGTTGT  GGAAGTCAA  CGATCGTCAA  TTTATTATTG  AGATTTTATC  ATCCGACAAG
601  GGGAAAGGTA  ACCATAGATG  ATATTGATGT  GTGTGATCTC  AACGTGCAAA  AACTTCGTGA
661  ACAAATCCGT  GTTGTAGTC  AGGAACCAGT  GCTTTTTCAT  GGCACACTAT  TCUAAAATAT
721  CAAGATGGGT  TATGAACAGG  CCACAATCGA  GGAGGTCCAA  GAAGCGTCCC  GTGTGGCGAA
781  TGCTGCCGAC  TTATCAAAAC  GACTTCCAGA  AGGTTACGGC  ACCCGAGTTG  CTGAACGTGG
841  TGTGCAGTTA  AGTGGCGGAC  AAGAGCAGCG  AATTGCCATA  GCTCGTGCGA  TCATCAAGAA
901  CCTCGCATA  CTGCTGCTCG  ATGAAGCCAC  CAGTGTCTTA  GACACAGAAG  CGGAATCAAT
961  CGTGCAAGAG  GCTCTGGAGA  AGGCTCAAAA  AGGGAGAACA  ACCGTCAATTG  TAGCGCATCG
1021  TCTGTCTACT  ATCAGAAACG  TGGATCAGAT  TTTGTTTTTC  AAGAACGGAA  CGATCGTTGA
1081  GCAGGGCACT  CATCCGAGT  TGATGAACAA  ACGTGGAGTA  TTCTTTGAAA  TGACTCAAGC
1141  ACAAGTCCTC  CGACAAGAGA  AGGAAGAGGA  AGTTTTAGAA  AATACCGAAC  CAGTAGCGAA
1201  GTGTCAAGAG  GTATCCCTCC  CTGCTCCTGA  TGTCACTATT  TTGGCTCCCC  ATGAGGAACA
1261  ACCCGAGCTA  CCTAGCCCGC  CGGTCGGTT  AGAAAATACA  AAGCAACATG  AGCATCTCTG
1321  AATGTCTTTG  TCTGAGATAG  CGATCCGGAA  TCCGATGTCT  TGTCACCGGA  TATTGCATTA
1381  CCCCATCTTA  GTTCACTTCC  ATCCCGTAAA  GAATCCACAA  GAAGTGCTAT  CTCCGCGGTC
1441  CCCAGCGTTC  GAAGTATGCA  AATCGAAATG  GAGGACCTTC  GTGCCAAACC  AACTCCAATG
1501  TCGAAAATTT  TCTATTTTAA  CCGTGACAAA  TGGCATATTT  TCATTTTGGG  ACTCATCGCC
1561  TGTATTATTA  CTGGAAGTGT  TACACCGACA  TTTGCAAGTTT  TATATCGCCA  GATCATACAG
1621  GTATACTCGG  AACCTGTTGA  TCAATGAAA  GGGCATGTGC  TGTTCTGGTG  TGGAGCTTTC
1681  ATCGTCAATG  GTCICGTACA  CGCTTTTGGC  TTCTTTTCT  CGGCTATTTG  TTGGGACGT
1741  TGCCGCGAAG  CGTTAACGAA  AAAATTACGT  TTCGAGCGGT  TCAAGAACCT  TCTGCGCAG
1801  GATGTGGGAT  TCTACGACGA  TATCCGACAC  GGTACCGGTA  AACTCTGTAC  CCGATTTGCT
1861  ACAGATGCCAC  CCAATGTCCG  ATATGTGTTT  ACTCGACTTC  CGGGTGTGCT  TTCTACGGTG
1921  GTGACCATAA  TTGGAGCTTT  GGTATTGGA  TTCTCTTTCG  GGTGGCAGCT  GGCTTTGATT
1981  CTTATGGTGA  TGGTACCGTT  GATCATCGGT  AGTGGATACT  TCGAGATGCG  CATGCAAGTTT
2041  GGTAAGGAGA  TGCGTGACAC  AGAGCTTCTT  GAAGAGGCTG  GGAAGTTGCG  CTCTCAAGCC
2101  CTGGAGAACA  TTGCTACCGT  GCATGCCCTG  AATAGGCAAG  AGCAGTTECA  TTTTATGTAT
2161  TCGAGTATT  TGAAGGAACC  CTATCGAGAA  AATCTTTGCC  AGGCGCACAC  CTACGGGGGT
2221  CTATTCCGGT  TCTCACAATC  GTGTTATTTC  TTTATGTATG  CTGTAGCATT  TTGGAATTGGT
2281  GCAATCTTCC  TGGACAACCA  CAGCATGCAA  CCGATTGACG  TTTACCGAGT  ATTTTTCGGC
2341  TTCAATGTTT  GTGGACAAAT  GGTCCGCAAC  ATTCTTCTT  TTATTCCTGA  CGTTGTGAAA
2401  GCTCGCCTGG  CTGCATCGCT  CCTTTTCTAC  CTTATCGAAC  ACCCATCAGA  AATTGATAAT
2461  TTGTCCGAGG  ATGGTGTAC  GAAGAAAATC  TCTGGTCATA  TCTCGTTCCG  CAATGTCTAT
2521  TTCAATTATC  CGACAAGAAG  ACAGATCAGA  GTACTCCGTG  GACTTAACCT  AGAGATAAAT
2581  CCTGGCACGA  AGGTAGCGCT  TGTGGGCAG  TCTGGTTGTG  GAAAAAGCAC  TGTGATGGCG
2641  TTGTTGGAAC  GGTTTTACAA  TCAAAACAAG  GCGGTGATTA  CCGTGGACCG  CGAAAACATC
2701  AGAAACATGA  ACATACGCAA  TCTTCGTGAG  TGTTACGGTC  TCGATGACCC  CAAGCCGCTC
2761  CTGTTCCGACT  GTACCATCAT  GGAAAACATC  TGTTAACGGTC  TCGATGACCC  CAAGCCGCTC
2821  TACCAACAGG  TTGTTGCTGC  AGCAAAAATG  GCGAACATTG  ACAAATTTGT  GCTGGGACTA
2881  CCAGAGGGTT  ACCGATACGG  TGTTCGTGAG  AAAGGCACTC  AGCTGTCAGG  CGGACAGAAG
2941  CAACGAATAG  CCATAGCCAG  AGCGCTGATT  CGAGATCCGC  CTATACTTCT  GCTGGATGAG
3001  GCGACAAGCG  CGCTCGATAC  CGAGAGTGAA  AAGATCGTGC  AAGACGCCCT  AGAGGTTGCT

```

FIG. 8A

ES 2 294 813 T3

```

3061 CGCCAAGGTA GAACCTGCCT TGTAATTGCC CATCGCCTTT CTACAATTCA AGACAGTGAC
3121 GTCATAGTGA TGATCCAGGA GGGGAAAGCT ACAGACAGAG GCACTCATGA ACATTTACTG
3181 ATGAAGAACG ATCTATACAA ACGGCTATGC GAAACACAAC GACTCGTTGA ATCACAATGA
3241 GTTTTCTAGT CCAATCGATA GTGATCGATA AGCTATGGAT TAGTCTTTAA CACTTACTGA
3301 TCACAAATTT TATCTCGTGC TTTATTCTAA TGTACATATG TAACGGTTTT GATCTTACAT
3361 ATCTTCTAAT TGGTCCTCAC TATCATAATG CCTTTAGTAG TACATTAACA GTTTTATTAA
3421 TACAACTTAA GTAACATAAT AACAAATTTA TTAATATAAC TTAAGTAAGA TATTGACAGT
3481 TTTATTAATT TGGAGGATTT ATAATAAAAC TT

```

FIG. 8B

```

1  CCGGACTTCC  GGAAGGTTAC  GGCACCCGAG  TAGGTGAACG  TGGTGTACAA  CTAAGTGGCG
61  GACAAAAGCA  GCGCATCGCT  ATTGCTCGCG  CCATCATTTAA  AAACCCCTCGT  ATACTTCTGC
121  TTGACGAAGC  CACCAGTGCT  CTGGACACAG  AGGCGGAATC  AATTGTGCAA  GAAGCTCTCG
181  AGAAAGCTCA  AAAAGGACGA  ACGACCGTCA  TTGTAGCGCA  TCGCCTATCT  ACCATCAGAA
241  ATGTCGATCA  AATTTTTCGT  TTCAAGAATG  AAACGATTGT  TGACGAGGGT  ACACATGCAG
301  AGTTGATGAA  CAAACGAGGA  GTGTTCTTTG  AAATGACTCA  AGCACAGGTC  CTTCGACAAG
361  AAAAGGAAGA  GGAGGTCTTA  GAAAATACGG  AACCAGTAGC  GAAGTGTCAA  GAGGCATCCT
421  TTCTGTCTCC  TGATGTCACT  ATTTTGTACT  CCCATGACGA  ACAACCCGAG  CTACTTAGCC
481  CCGCGGATAG  CGATGCGGAA  TCCGACGTCA  TGTCACCGGA  TCTTGGCTTA  CCCCATCTTA
541  GTTCACTTCG  ATCACGTAAA  GAGTCCACAA  GAAGTGCTAT  TTCCGCAGTC  CCCAGCGTTC
601  GGAGTATGCA  GATCGAAATG  GAGGACCTTC  GTGCCAAACC  GACTCCGATG  TCGAAAATTT
661  TCTATTTCAA  CCGTGACAAA  TGGGGATTTT  TCATTTTGGG  ACTCATCGCC  TGTATTATAA
721  CTGGAACGT  TACACCGACA  TTTGCAAGTT  TATATCGCGA  GATCATACAG  GTATACTCGG
781  AACCTGTTGA  TCAAATGAAA  GGCCATGTGC  TGTTTTGGTG  TGGAGCTTTC  ATCGTCATTG
841  GTCTCGTACA  CGCATTTGCG  TTCTTTTCT  CGGCCATTTG  TCTGGGACGT  TCGGCGAAG
901  CTTTAAACGAA  GAAGTTACGT  TTTCGAGCGT  TCAAGAACCT  TCTCGACAA  GATGTGGGAT
961  TCTACGACGA  TATCCGACAC  GGTACCGGTA  AACTCTGTAC  GCGATTGCT  ACAGATGCAC
1021  CCAATGTTCC  ATATGTGTTT  ACTCGACTTC  CGGGTGTACT  TTTCATCGGTG  GTGACCATAA
1081  TCGGAGCTTT  GGTATTGGGA  TTTATTTTCG  GGTGGCAGCT  GGCCCTTGATT  CTTATGGTCA
1141  TGGTACCGTT  GATCATTGGC  AGTGGATACT  TCGAGATGCG  CATGCAGTTT  GGTAAAAAGA
1201  TGGGTGACAC  AGAGCTTCTT  GAAGAGGCTG  GGAAGATTGC  CTCACAAGCC  GTAGAGAATA
1261  TTCTGACCGT  ACATGCCCTG  AATCGCAAG  AGCAGTTCCA  TTTTCATGTAC  TCGGAGTATT
1321  TGAAGGAACC  CTATCGAGAG  AATCTTTGCC  AGGCGCACAC  TTACGGGGGT  GTATTTCGGT
1381  TTTACAGTC  GTTGTATTTC  TTTATGTATG  CTGTAGCATT  TTGGATTGGT  GCAATCTTTC
1441  TGGACAACCA  CAGCATGCAA  CCGATTGATG  TTTACCGAGT  ATTTTTCGCG  TTTCATGTTT
1501  GTGACAAAT  GGTGGCAAC  ATTTCTGCT  TCATCCCTGA  TGTGTGAAA  GCTCGCCTGG
1561  CTGCATCGCT  CCTTTTCTAC  CTCATCGAAC  ACCCATCAGA  AATTGATAAC  TTGTCCGAGG
1621  ATGGTGTCAA  GAAGAAAATC  TCTGGTCACA  TCTCGTTCCG  CAATGTCTAT  TTCAATTACC
1681  CGACGAGAAG  GCAGATCAGA  GTACTCCGTG  GACTTAACT  AGAGATAAAT  CCTGGCACGA
1741  CGGTACCGCT  TGTGGACAA  TCTGGTTGTG  GAAAAAGCAC  TGTGATGGCG  TTGTTCGAAC
1801  GCTTTTACAA  TCAAAACAAG  GGCGTGATTA  CGGTTGACGG  CGAAAACATC  AGAAAACATGA
1861  ACATACGCAA  TCTCCGTGAG  CAAGTATGTA  TAGTCAGCCA  GGAACCAACA  CTGTTCCGACT
1921  GTACCATCAT  GGAAAACATC  TGTACGGAC  TCGATGACCC  CAAACCGTCC  TACGAACAGG
1981  TTGTTGCGGC  AGCAAAAATG  GCGAACATCC  ACAATTTTGT  GCTGGGACTG  CCAGAGGGTT
2041  ATGACACCGG  TGTTCGCGAG  AAAGGCACTC  AGCTGTCAGG  CGGACAAAAG  CAAAGAATAG
2101  CCATAGCCCG  AGCGCTGATC  CGAGATCCGC  CTATACTTCT  GCTGGATGAG  GCGACAAGCG
2161  CTCTGACAC  GGAGAGTGAG  AAGATCGTGC  AAGACGCCCT  AGAGGTTGCT  CGCCAAGGTA
2221  GAACGTGCCT  TGTAAATTGCC  CACCGCTTT  CTACAATTCA  AGACAGTGAC  GTCATAGTGA
2281  TGATCCAGGA  GGGAAAAGCT  ACAGACAGAG  GCACTCATGA  ACATTTACTG  ATGAAGAACC
2341  ATCTATACAA  ACCGCTATGC  GAAACACAAC  GACTCGTTGA  ATCACAATGA  GTTTTATAGT
2401  CCGATCGATA  GTGATCGATA  AGCTATCGAT  TAGTCTTCAA  CACTTACTGA  TCATATGACT
2461  ATCTCGTGCT  TTATTATAAT  CTACATATGT  AATCGTTTTC  ATGTAAGTTA  AGTTATAATT
2521  GGTCTTCACT  ATCATAATGC  CTTTAGTAAT  GCATTAACAC  TTTTATAATA  TAACTTGAAT
2581  AACATATTGA  CAGTTTTATT  AATATAACTT  AAATAAGATA  TTGACAGTTT  TATTAAATTTG
2641  GAGAATTTAT  AATGAAACTT  CTGGATTCTT  GCAGCCCGGG  G

```

FIG. 9



FIG. 10

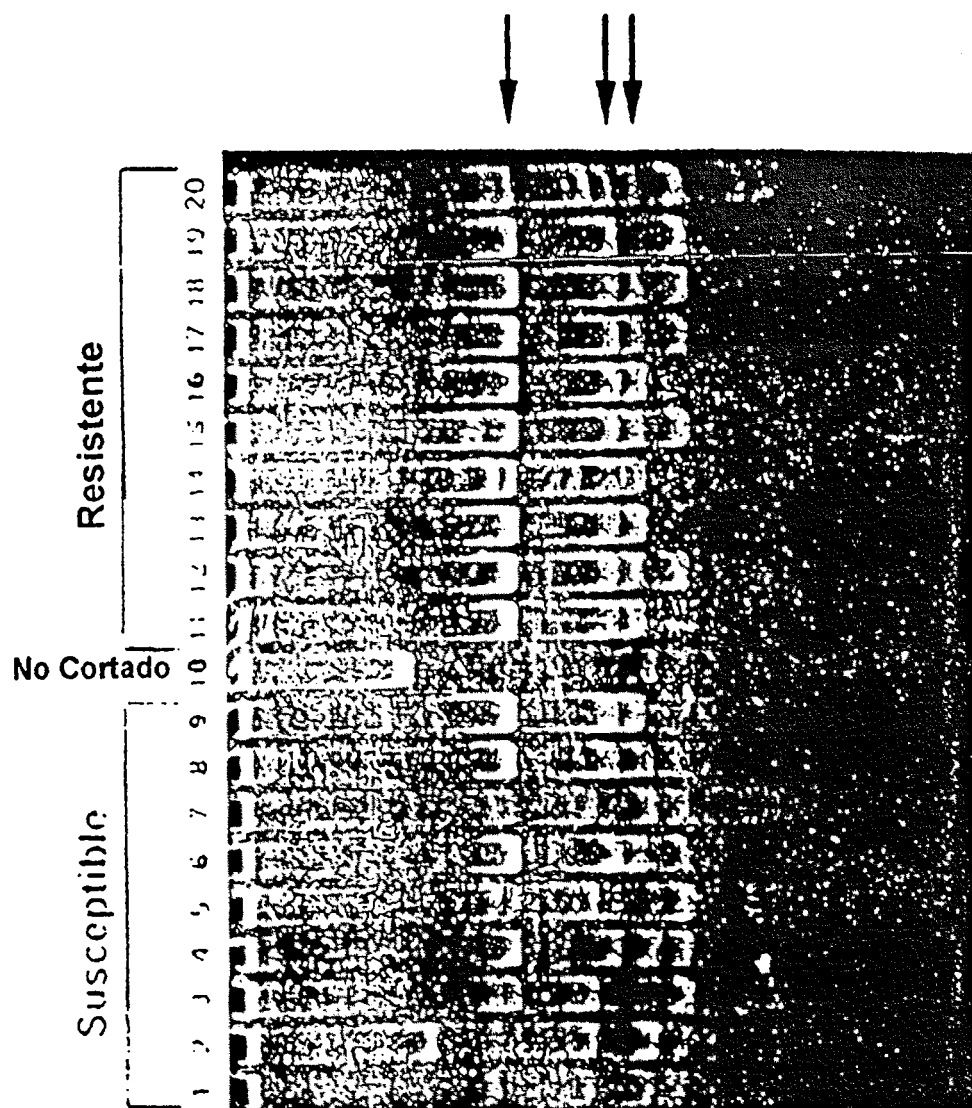


FIG. 11

5' GAAATGACTCAAGCACAAG 3' →

FIG. 12A

5' AGACAAAGACATTCAGAG 3' →

FIG. 12B

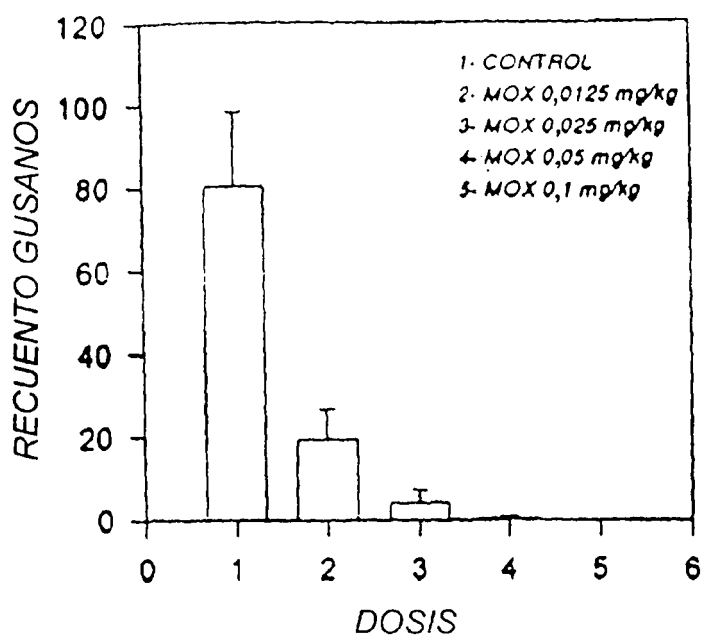


FIG. 13A

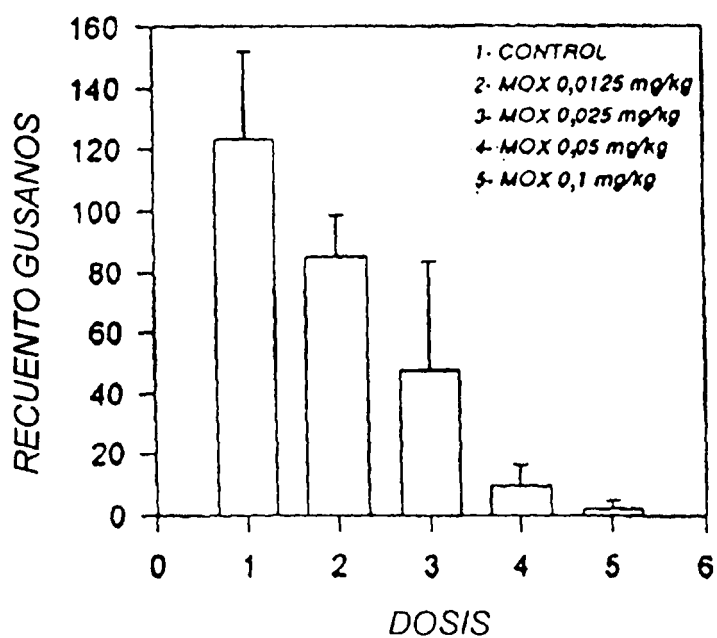


FIG. 13B

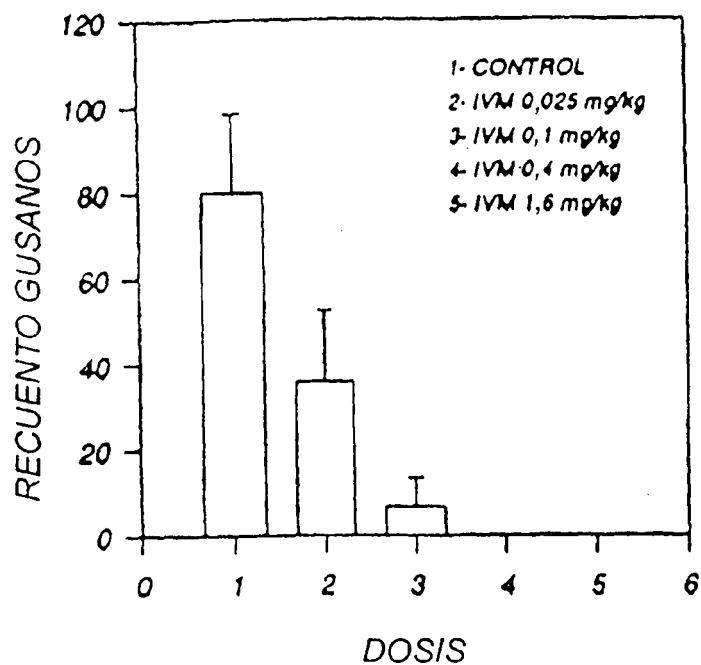


FIG. 14A

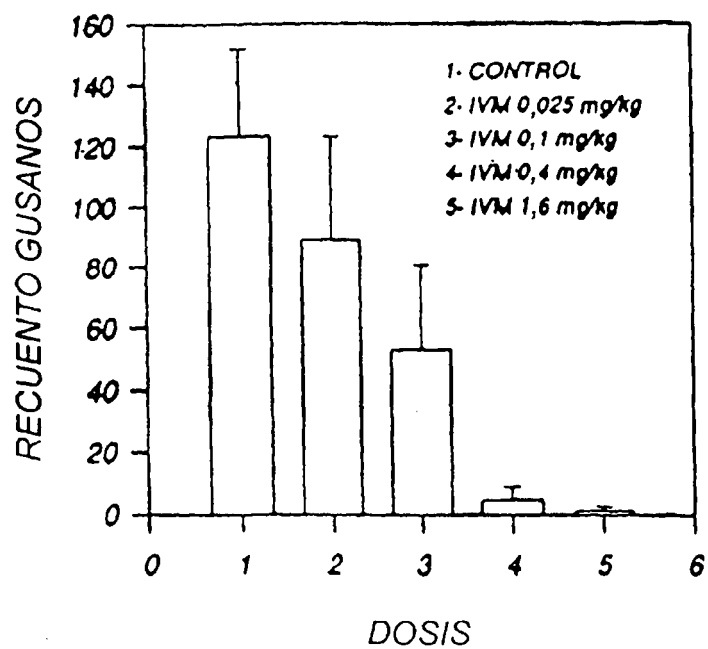


FIG. 14B

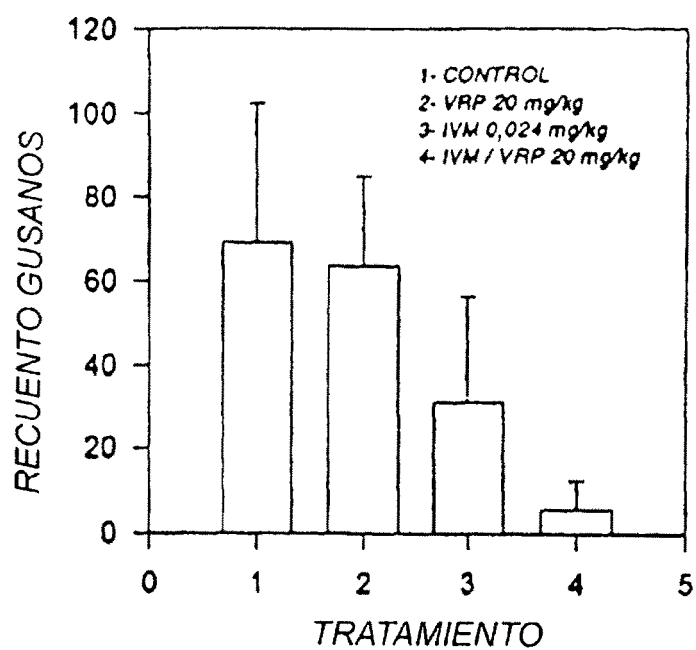


FIG. 15A

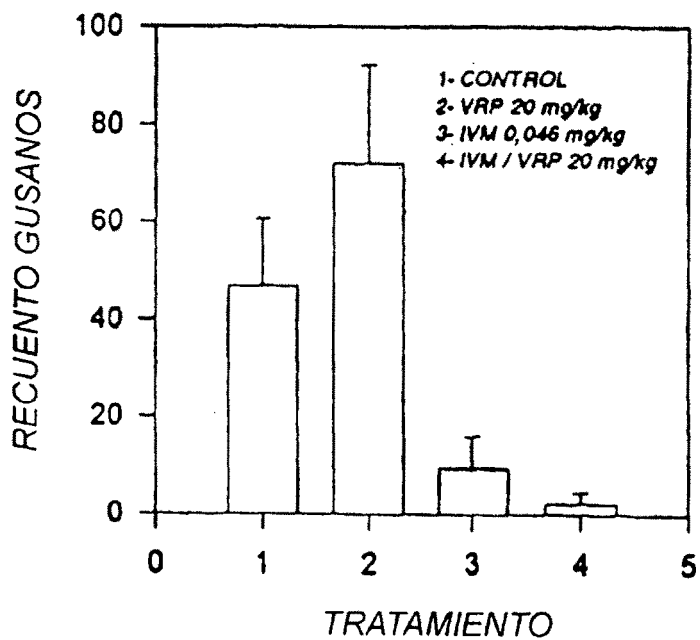


FIG. 15B

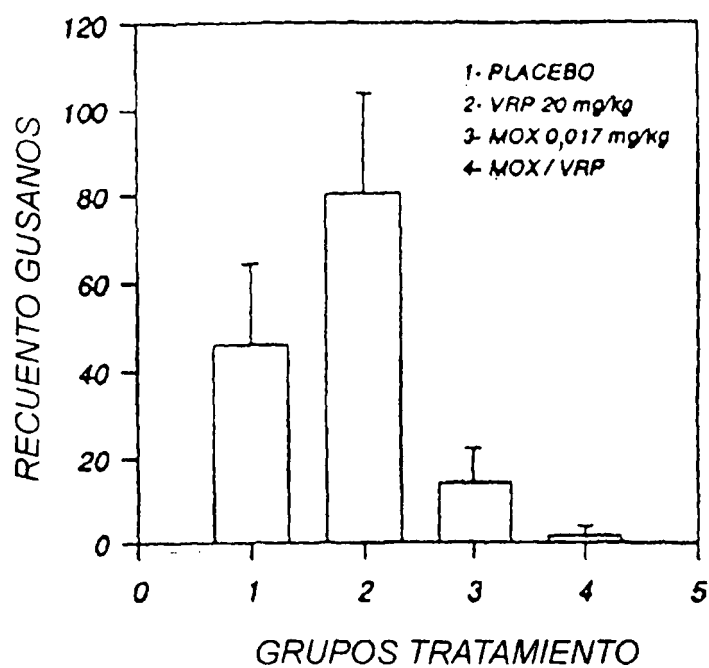


FIG. 16A

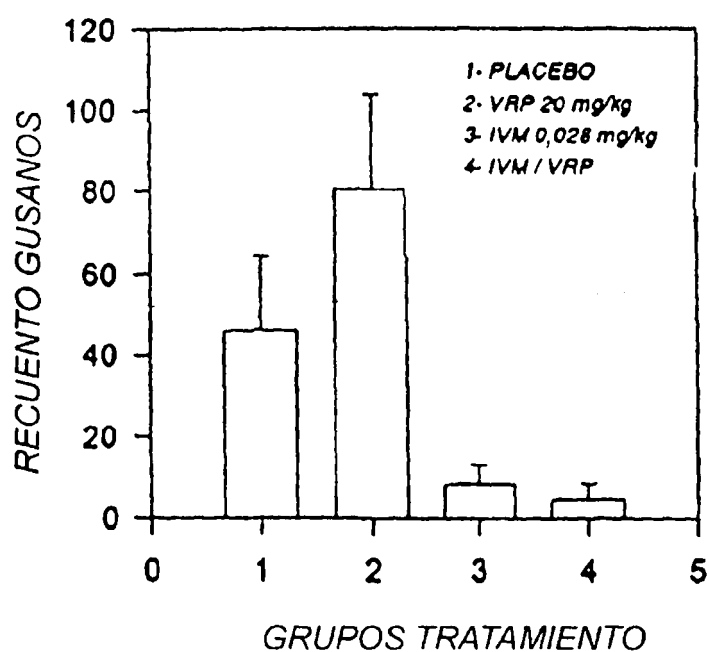


FIG. 16B

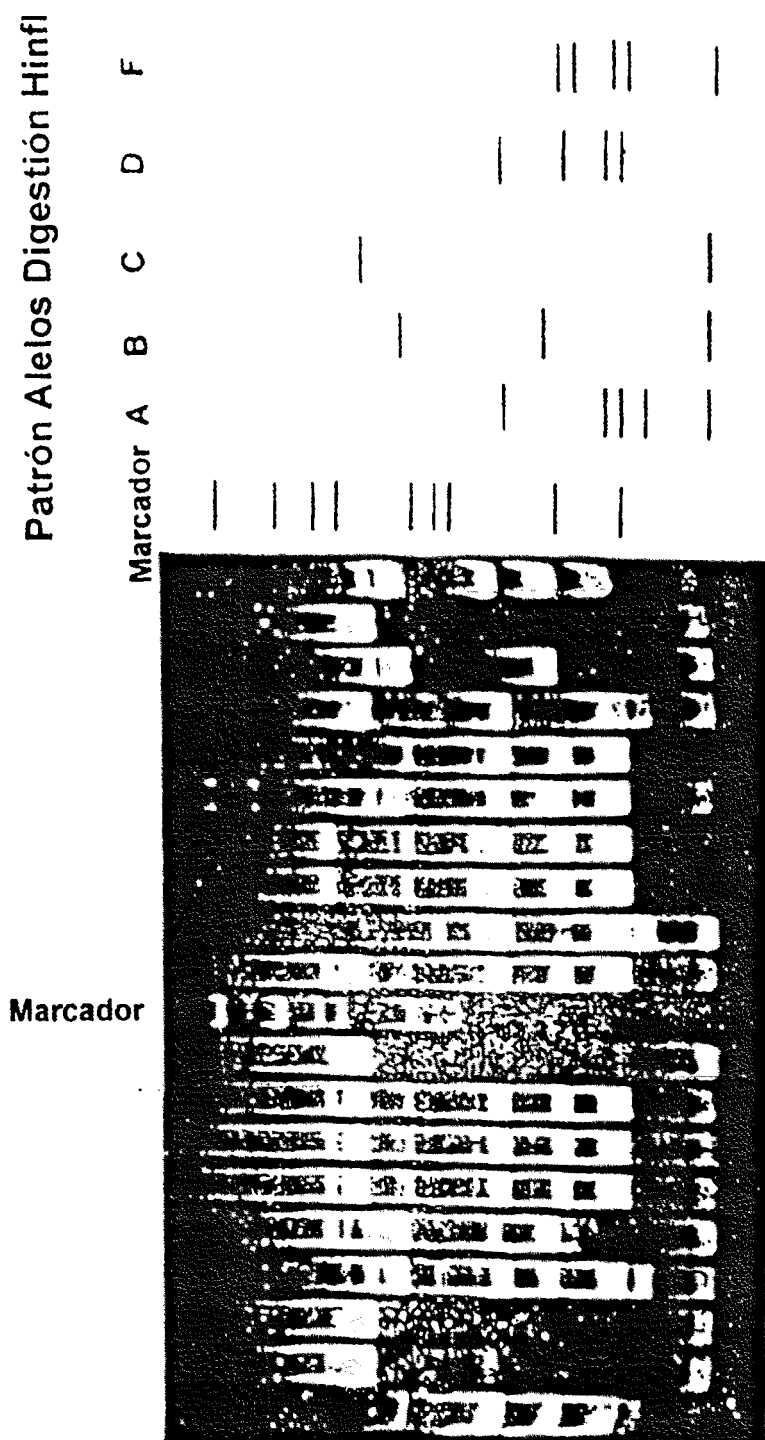


FIG. 17A

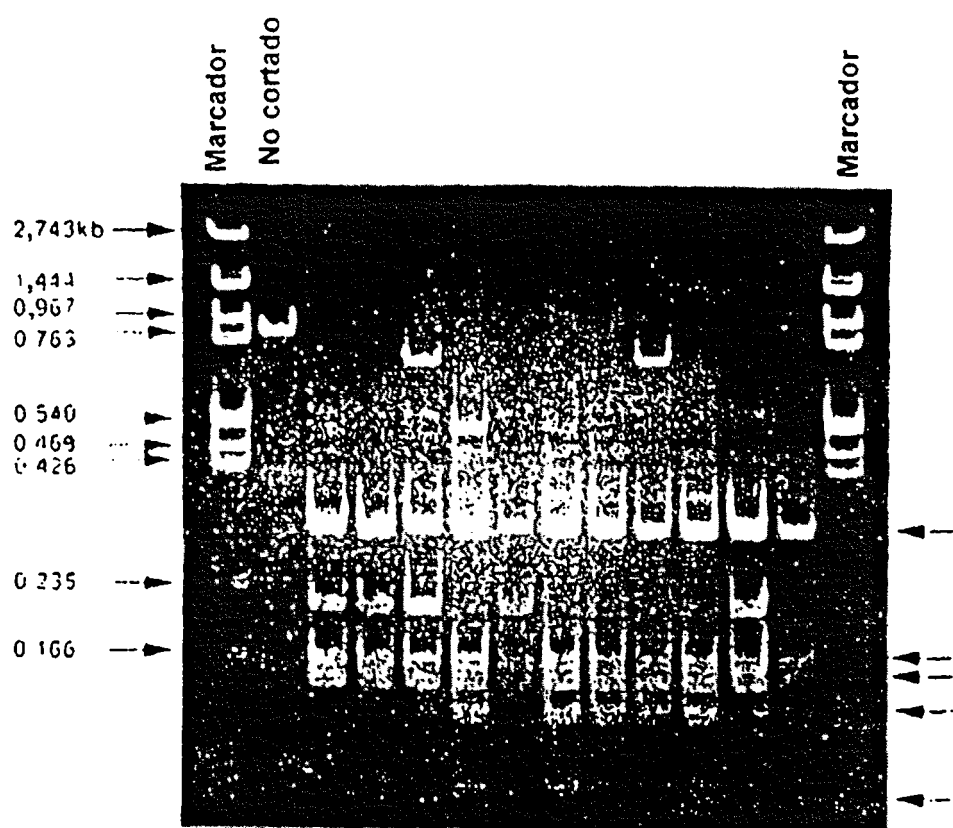


FIG. 17B

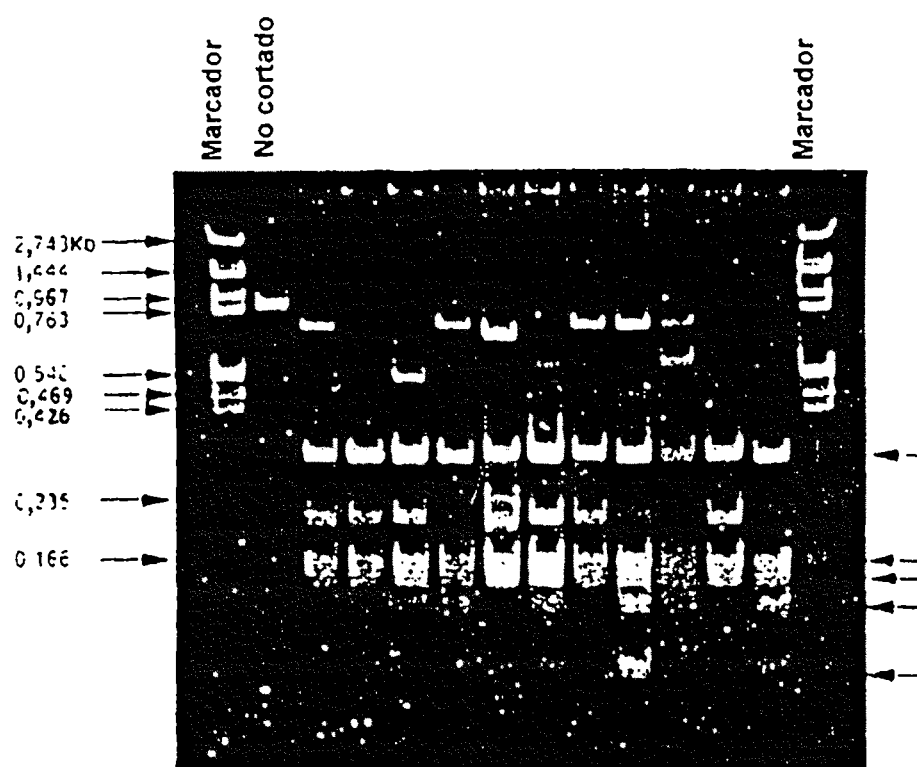


FIG. 17C

Patrones Alelos de Digestión Alul

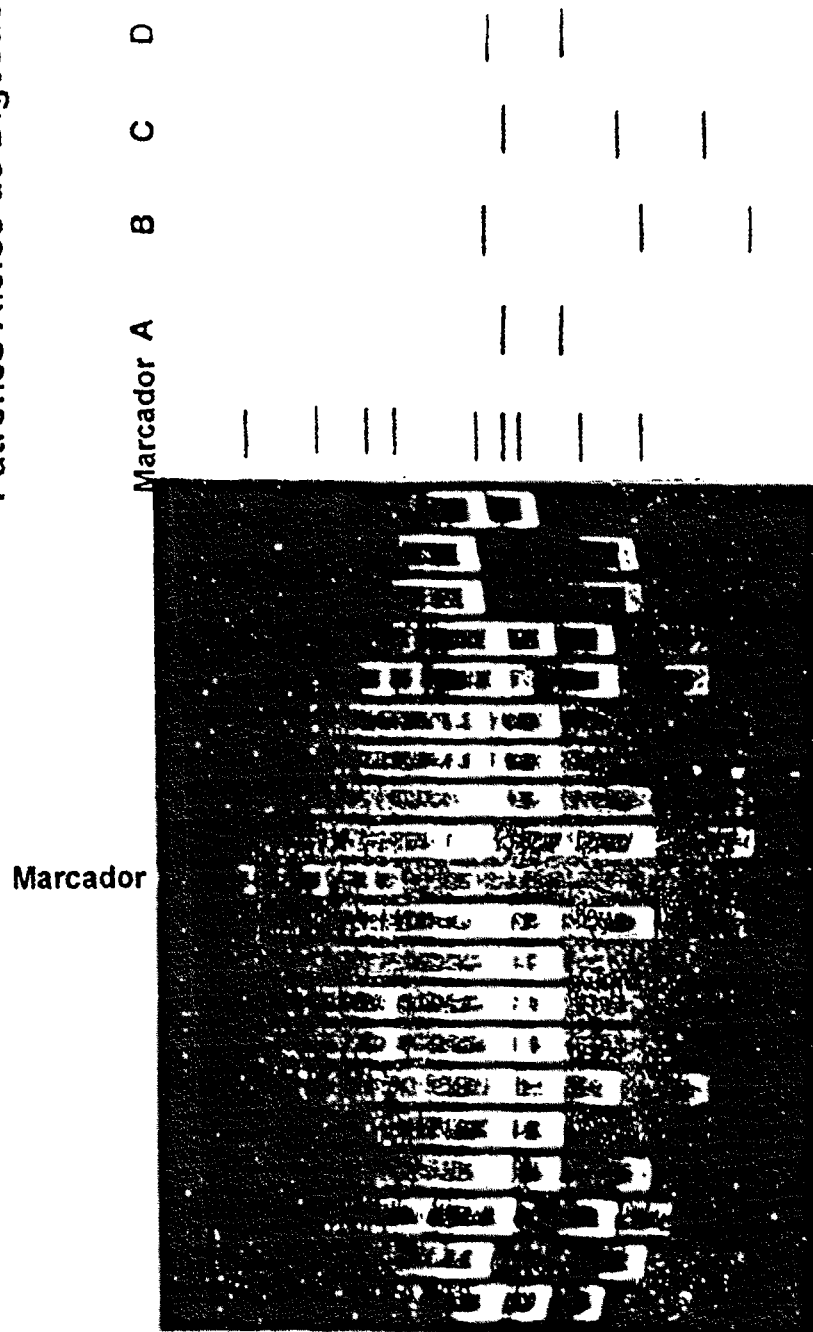


FIG. 18A

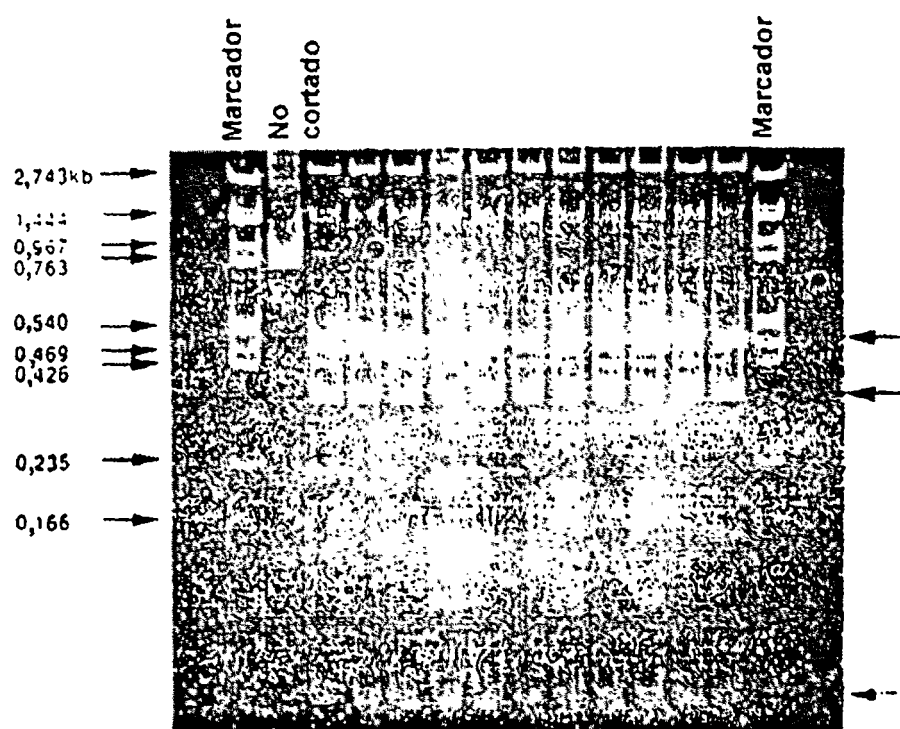


FIG. 188

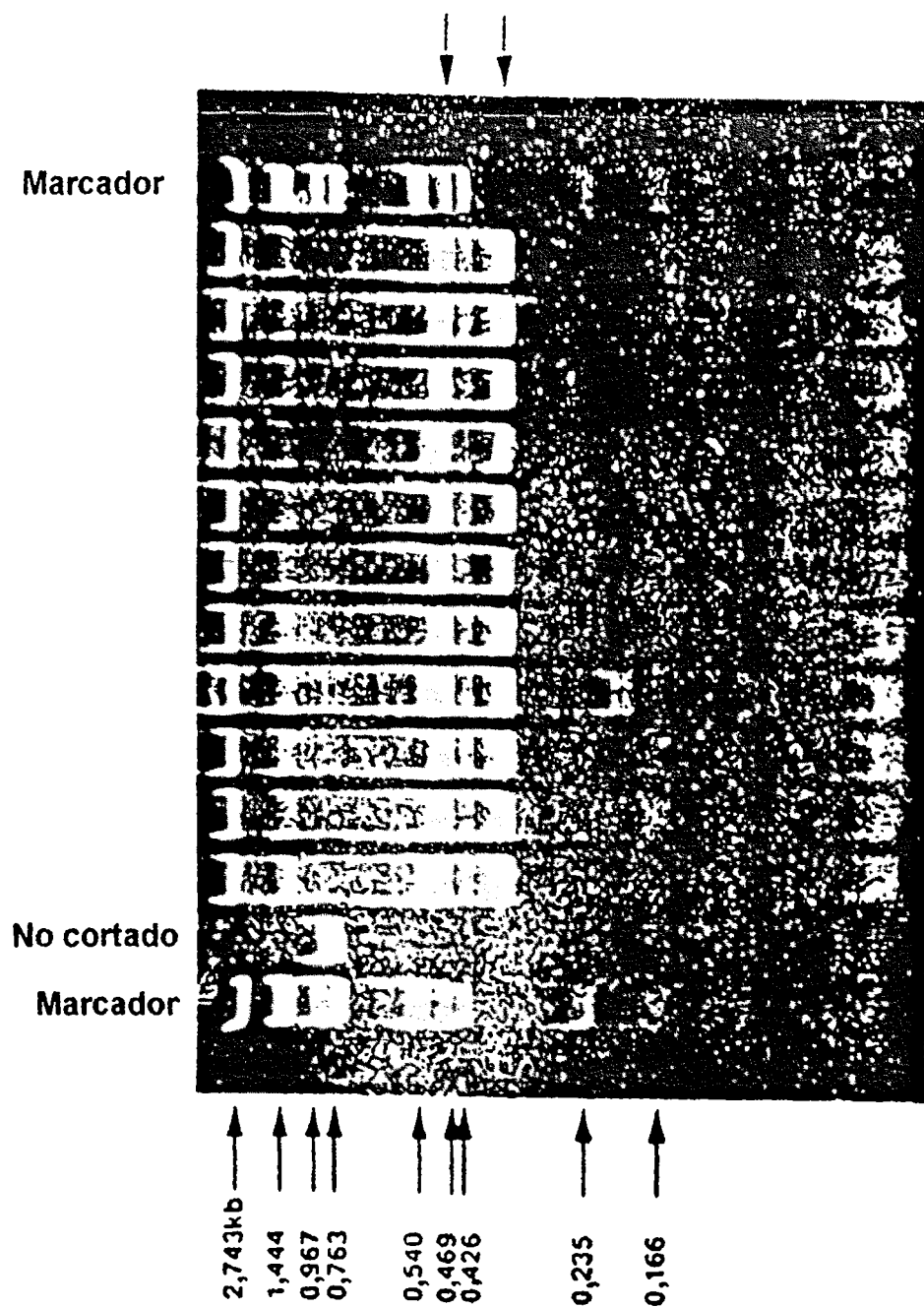


FIG. 18C

ES 2 294 813 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: McGill University
- (B) CALLE: 845 Sherbrooke Street W.
- (C) CIUDAD: Montreal
- (D) PROVINCIA: Quebec
- (E) PAÍS: Canadá
- (F) CÓDIGO POSTAL: H3A 2T5

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: METHODS FOR DETECTING AND REVERSING RESISTANCE TO MACROCYCLIC LACTONE COMPOUNDS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12

(iv) FORMA LEGIBLE CON EL ORDENADOR:

- (A) TIPO MEDIO: Disco Flexible
- (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: PCT/IB98/00735
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 29-ABRIL-1.998
- (C) CLASIFICACIÓN:

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NUMERO DE SOLICITUD: US 60/045,160
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 30-ABRIL-1.997
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 09/067,676
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 28-ABRIL-1.998

(vii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: SMART & BIGGAR
- (B) CALLE: P.O.BOX 2999, STATION D
- (C) CIUDAD: OTTAWA
- (D) PROVINCIA: ONTARIO
- (E) PAÍS: CANADÁ
- (F) CÓDIGO POSTAL: K1P 5Y6
- (G) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 73836-3

(viii) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELÉFONO: (613)-232-2486
- (B) TELEFAX: (613)-232-8440

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 432 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 294 813 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

```

5      ACGGTGGCGT TTGTTGGGCA GTCTGGTTGT GGAAAAGCA CTGTGAAGGC GTTGTGGGAC      60
      GGTTTTACAA TCAAAACAAG GGCCTGATTA CGGACGCCGA AAACATCAGA AACATGAACA      120
      TACGCAATCT TCGTGAGCAA GTGTGTATTG TAAGCCAGGA ACCAACGCTG TTCGACTGTA      180
10     CCATCATGGA AAACATCTGT TACGGTCTCG ATCGACCCCA AGCTCCTACG AACAGGTTGT      240
      TGCTGCAGCA AAATCGGTCTG AGTCGAAATG GCGAACATTC ACAATTTTGT GCTGGGACTA      300
15     CCAGAGGGTT ACGATACGCG TGTGGTGAG AAAGGCACTC AGCTGTCAGG CGGACAGAAG      360
      AAACGAATAG CCATAGCCAG AGCGCTGATT CGAGATCCGC CTATACTTCT GCTGGATGAG      420
20     GCTACGACGG CC      432
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 2:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 144 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

```

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

ES 2 294 813 T3

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 4175 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

15 **GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGAGATCGTT CTCAAGCTGG TAAAATGTTT GAAAAGGCC 60**
AAGATGATGA ACGTATACCA TTA CTGGTT CATCCAAGAA AAGTTCAATC GGCGAAGTCA 120
 20 **GTAAAAAAGA AGAACCGCCT ACAATAACAA ACCGTGGAAT TCTCTCCTTA GCCACTACAT 180**
TGGATTATGT GCTTCTTGCG GCTGGTACGC TGGCGCCGTG TGTTTCATGGC GCTGGATTCT 240
 25 **CAGTACTCGG TATTGTACTC GGTGGTATGA CGACAGTCTT TCTCAGAGCT CAGAACTCAG 300**

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 813 T3

	AATTCGTTCT GGGCACTGTT AGTCGGGATC CTGAAGGGCT ACCAGCTCTT ACTAAGGAAG	360
5	AATTTGACAC ACTAGTACGT AGGTATTGCT TATACTACCT TGGATTAGGC TTTGCTATGT	420
	TTGCAACATC TTATATACAG ATTGTGTGTT GGGAGACGTT CGCCGAACGA ATTACCCATA	480
10	AATTACGAAA AATTATCTA AAAGCCATAC TTCGGCAGCA GATCTCATGG TTGACATTC	540
	AACAAACAGG AAATCTCACA GCTCGTCTAA CCGATGATCT CGAACGTGTT CGTGAAGGAC	600
15	TTGGTGATAA ACTGTGCGTT TTTATACAAA TGGTGTCTGC TTTTGTGGCT GGTTCCTGTG	660
	TAGGATTTCG GTATAGCTGG TCAATGACGC TCGTGATGAT GGTCTGGGCG CCGTTTATAG	720
20	TTATTTCTGC TAATTGGATG TCAAAAATCG TTGCTACTAG GACCCAAGTT GAACAGGAAA	780
	CCTACGCTGT TGCCCGTGCT ATAGCGGAGG AGACTTTCTC ATCGATACGA ACCGTACACT	840
25	CGATATGTGG CCATAAAAGA GAGCTAACAA GATTTGAGGC AGCGTTGGAG AAAGGACGTC	900
	AGACAGGCCT TGTCAAATAT TTCTATATGG GTGTTGGTGT GGGATTTGGT CAGATGTGTA	960
30	CCTATGTGTC CTACGCCTTG GCTTTTGGT ATGGCAGTGT ACTGATCATC AACGACCCTG	1020
	CATTGGATCG TGGCCGAATT TTCACAGTCT TTTTGTCTGT GATGTCCGCG TCAGCAGCTC	1080
35	TGGGCACATG TCTGCCACAT CTTAACACCA TATCCATCGC TCGAGGAGCG GTACGAAGTG	1140
	TACTGTCACT GATTAATAGT CGTCCAAAAA TCGATCCCTA TTCGTTAGAT GGCATTGTGC	1200
40	TCAACAATAT GAGAGGATCT ATCCGCCTCA AGAACGTGCA TTTCTCCTAT CCTTCCCGAA	1260
	GAACATTGCA GATATTGAAA GGTGTGTCAC TGCRAAGTGC GGCTGGCCAA AAAATTGCTT	1320
45	TGGTGGGTTT AAGCGGTTGT GGAAAGTCAA CGAACGTCAA TTTATTATTG AGATTTTATG	1380
	ATCCGACAAG GGGAAAGGTA ACCATAGATG ATATTGATGT GTGTGATCTC AACGTGCAAA	1440
50	AAC TTCGTGA ACAAATCGGT GTTGTTAGTC AGGAACCAGT GCTTTTCGAT GGCACACTAT	1500
	TCGAAAAATAT CAAGATGGGT TATGAACAGG CCACAATGGA GGAGGTCCAA GAAGCGTGCC	1560
55	GTGTGGCGAA TGCTGCCGAC TTCACCRAAC GACTTCAGA AGGTTACGGC ACCCGAGTTG	1620
	GTGAACGTGG TGTGCAGTTA AGTGGCGGAC AAAAGCAGCG AATTGCCATA GCTCGTGCGA	1680

ES 2 294 813 T3

	TCATCAAGAA CCCTCGCATA CTGCTGCTCG ATGAAGCCAC CAGTGCTCTA GACACAGAAG	1740
5	CGGAATCAAT CGTGCAAGAG GCTCTGGAGA AGGCTCAAAA AGGGAGAACA ACCGTCATTG	1800
	TAGCGCATCG TCTGTCTACT ATCAGAAACG TGGATCAGAT TTTCGTTTTC AAGAACGGAA	1860
10	CGATCGTTGA GCAGGGCACT CATGCCGAGT TGATGAACAA ACGTGGAGTA TTCITTGAAA	1920
	TGACTCAAGC ACAAGTCCTC CGACAAGAGA AGGAAGAGGA AGTTTTAGAT AGCGATGCGG	1980
15	AATCCGATGT CGTGTCAACG GATATTGCAAT TACCCCATCT TAGTTCACTT CGATCCCGTA	2040
	AAGAATCCAC AAGAAGTGCT ATCTCCGCGG TCCCCAGCGT TCGAAGTATG CAAATCGAAA	2100
20	TGGAGGACCT TCGTGCCAAA CCAACTCCAA TGTGGAATAA TTCTATTTTT AACCGTGACA	2160
	AATGGGGATA TTTCATTTTG GGACTCATCG CCTGTATTAT TACTGGAACG GTTACACCGA	2220
25	CATTTGCAGT TTTATATGCG CAGATCATAC AGGTATACTC GGAACCTGTT GATCAAATGA	2280
	AAGGCCATGT GCTGTTCTGG TGTGGAGCTT TCATCGTCAT TGGTCTCGTA CACGCTTTTG	2340
30	CGTTCITTTT CTCGGCTATT TGTTTGGGAC GTTGCGGCGA AGCGTTAACG AAAAAATTAC	2400
	GTTTCGAGGC GTTCAAGAAC CTTCGCGAC AGAATGTGGG ATTCTACGAC GATATCCGAC	2460
35	ACGGTACCGG TAAACTCTGT ACGCGATTTG CTACAGATGC ACCCAATGTC CGATATGTGT	2520
	TCACTCGACT TCCGGGTGTG CTTTCATCGG TGGTGACCAT AATTGGAGCT TTGGTTATTG	2580
40	GATTCATCTT CGGGTGGCAG CTGGCTTTGA TTCTTATGCT GATGGTACCG TTGATCATCG	2640
	GTAGTGQATA CTTCGAGATG CGCATGCAGT TTGGTAAGAA GATGCGTGAC ACAGAGCTTC	2700
45	TTGAAGAGGC TGGGAAAGTT GCCTCTCAAG CCGTGGAGAA CATTCTGACC GTGCATGCCC	2760
	TGAATAGGCA AGAGCAGTTC CATTTTCATGT ATTGCGAGTA TTTGAAGGAA CCCTATCGAG	2820
50	AAAATCTTTG CCAGGCGCAC ACCTACGGGG GTGTATTGCG GTTCTCACA TCGTTGTTAT	2880
	TCITTATGTA TGCTGTAGCA TTTTGGATTG GTGCAATCTT CGTGGACAAC CACAGCATGC	2940
55	AACCGATTGA CGTTTACCGA GTATTTTTCG CGTTCATGTT TTGTGGACAA ATGGTCGGCA	3000
	ACATTTCTTC TTTTATTCCT GACGTTGTGA AAGCTCGCCT GGCTGCATCG CTCCTTTTCT	3060

ES 2 294 813 T3

```

ACCTTATCGA ACACCCATCA GAAATTGATA ATTTGTCCGA GGATGGTGTC ACGAAGAAAA 3120
TCTCTGGTCA TATCTCGTTC CGCAATGTCT ATTTCAATTA TCCGACAAGA AGACAGATCA 3180
GAGTACTCCG TGGACTTAAC CTAGAGATAA ATCCTGGCAC GACGGTAGCG CTTGTTGGGC 3240
AGTCTGGTTG TGGAAAAAGC ACTGTGATGG CGTTGTTGGA ACGGTTTTC AATCAAAACA 3300
AGGGCGTGAT TACGGTGGAC GGCAGAAAACA TCAGAAACAT GAACATACGC AATCTTCGTG 3360
AGCAAGTGTG TATTGTTAGC CAGGAACCAA CGCTGTTTGA CTGTACCATC ATGGAACAACA 3420
TCTGTTACGG TCTCGATGAC CCCAAGCCGT CCTACGAACA GGTGTTGCT GCAGCAAAAA 3480
TGGCGAACAT TCACAATTTT GTGCTGGGAC TACCAGAGGG TTACGATACG CGTGTGGTG 3540
ARAAAGGCAC TCAGCTGTCA GGCGGACAGA AGCAACGAAT AGCCATAGCC AGAGCGCTGA 3600
TTGAGATCC GCCTATACTT CTGCTGGATG AGGCGACAAG CGCGCTGGAT ACCGAGAGTG 3660
AAAAGATCGT GCAAGACGCC CTAGAGGTG CTCGCCAAGG TAGAACGTGC CTTGTAATTG 3720
CCCATCGCCT TTCTACAATT CAAGACAGTG ACGTCATAGT GATGATCCAG GAGGGGAAAG 3780
CTACAGACAG AGGCACTCAT GACATTTTAC TGATGAAGAA CGATCTATAC AAACGGCTAT 3840
GCGAAACACA ACGACTCGTT GAATCACAAT GAGTTTTTAG TGCCAATCGA TAGTGATCGA 3900
TAAGCTATGG ATTAGTCTTT AACACTTACT GATCATATGA CTCTATCTCG TGCTTTATTA 3960
TAATGTACAT ATGTAATGGT TTTGATCTTA CATATCTTGT AATGGTCTT CACTATCATA 4020
ATGCCTTTAG TAGTATATTA ACAGTTTTAT TAATACAAC TAAGTAACAT ATTAACAATT 4080
TTATTAATAT AACTTAAGTA AGATATTGAC AGTTTTATTA ATTTGGAGGA TTTATAATAA 4140
AACCTCGTGC CGCTCGTGCC GAAACGATAT CAAGC 4175

```

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1810 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

ES 2 294 813 T3

	GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGAGATCGTT CTCAAGCTGG TAAAATGTTT GAAAAAGGCC	60
5	AAGATGATGA ACGTATACCA TTACTCGGTT CATCCAAGAA AAGTTCAATC GGCGAAGTCA	120
	GTAAAAAGA AGAACCGCCT ACAATAACAA ACCGTGGAAT TCTCTCCTTA GCCACTACAT	180
10	TGGATTATGT GCTTCTTGCG GCTGGTACGC TGGCGCCGTG TGTTCAATGG GCTGGATTCT	240
	CAGTACTCGG TATTGTACTC GGTGGTATGA CGACAGTCTT TCTCAGAGCT CAGAACTCAG	300
15	AATTCGTTCT GGGCACTGTT AGTCGGGATC CTGAAGGGCT ACCAGCTCTT ACTAAGGAAG	360
	AATTTGACAC ACTAGTACGT AGGTATTGCT TATACTACCT TGGATTAGGC TTTGCTATGT	420
	TTGCAACATC TTATATACAG ATTGTGTGTT GGGAGACGTT CGCCGAACGA ATTACCCATA	480
20	AATTACGAAA AATTATCTA AAAGCCATAC TTCGGCAGCA GATCTCATGG TTTGACATTC	540
	AACAAACAGG AAATCTCACA GCTCGTCTAA CCGATGATCT CGAACGTGTT CGTGAAGGAC	600
25	TTGGTGATAA ACTGTCGCTT TTTATACAAA TGGTGTCTGC TTTGTGGCT GGTTCCTGTG	660
	TAGGATTGCG GTATAGCTGG TCAATGACGC TCGTGATGAT GGTGCTGGCG CCGTTTATAG	720
30	TTATTTCTGC TAATTGGATG TCAAAAATCG TTGCTACTAG GACCCAAGTT GAACAGGAAA	780
	CCTACGCTGT TGCCGGTGCT ATAGCGGAGG AGACTTTCTC ATCGATACGA ACCGTACACT	840
35	CGATATGTGG CCATAAAGA GAGCTAACAA GATTTGAGGC AGCGTTGGAG AAAGGACGTC	900
	AGACAGGCCT TGTCAAATAT TTCTATATGG GTGTTGGTGT GGGATTTGGT CAGATGTGTA	960
40	CCTAATGTGC CTACGCCTTG GCTTTTGGT ATGGCAGTGT ACTGATCATC AACGACCCTG	1020
	CATTGGATCG TGGCCGAATT TTCACAGTCT TTTTGTCTGT GATGTCCGGC TCAGCAGCTC	1080
45	TCGGCACATG TCTGCCACAT CTTAACACCA TATCCATCGC TCGAGGAGCG GTACGAAGTG	1140
	TACTGTCACT GATTAATAGT CGTCCAAAAA TCGATCCCTA TTCGTTAGAT GGCATTGTGC	1200
50	TCAACAATAT GAGAGGATCT ATCCGCTTCA AGAACGTGCA TTTCTCCTAT CCTTCCCGAA	1260

ES 2 294 813 T3

	GAACATTGCA GATATTGAAA GGTGTGTCAC TGCRAGTGTC GGCTGGCCAA AAAATTGCTT	1320
5	TGGTGGGTTC AAGCGGTTGT GGAAAGTCAA CGAACGTCAA TTTATTATTG AGATTTTATG	1380
	ATCCGACAAG GGGAAAGGTA ACCATAGATG ATATTGATGT GTGTGATCTC AACGTGCRAA	1440
10	AAC TTCGTGA ACAAATCGGT GTTGTAGTC AGGAACCAGT GCTTTTCGAT GGCACACTAT	1500
	TCGAAAATAT CAAGATGGGT TATGAACAGG CCACAATGGA GGAGGTCCAA GAAGCGTGCC	1560
15	GTGTGGCGAA TGCTGCCGAC TTCACCAAAC GACTTCCAGA AGGTTACGGC ACCCGAGTTG	1620
	GTGAACGTGG TGTGCAGTTA AGTGGCGGAC AAAAGCAGCG AATTGCCATA GCTCGTGCGA	1680
20	TCATCAAGAA CCCTCGCATA CTGCTGCTCG ATGAAGCCAC CAGTGCTCTA GACACAGAAG	1740
	CGGAATCAAT CGTGCAAGAG GCTCTGGAGA AGGCTCAAAA AGGGAGAACA ACCGTCAATTG	1800
25	TAGCGCATCG	1810

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2698 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

40	AGTGCTTTTC GATGGCACAC TATTCGAAAA TATCAAGATG GGTATGAAC AGGCCACAAT	60
	GGAGGAGGTC CAAGAAGCGT GCCGTGTGGC GAATGCTGCC GACTTCACCA AACGACTTCC	120
45	AGAAGGTTAC GGCACCCGAG TTGGTGAACG TGGTGTGCAG TTAAGTGGCG GACAAAAGCA	180
	GCGAATTGCC ATAGCTCGTG CGATCATCAA GAACCCTCGC ATACTGCTGC TCGATGAAGC	240
50	CACCAGTGCT CTAGACACAG AAGCGGAATC AATCGTGCAA GAGGCTCTGG AGAAGGCTCA	300
	AAAAGGGAGA ACAACCGTCA TTGTAGCGCA TCGTCTGTCT ACTATCAGAA ACGTGGATCA	360
55	GATTTTCGTT TTCAAGAACG GAACGATCGT TGAGCAGGGC ACTCATGCCG AGTTGATGAA	420

ES 2 294 813 T3

CAAACGTGGA GTATTCTTTG AAATGACTCA AGCACAAAGTC CTCCGACAAG AGAAGGAAGA 480
 5 GGAAGTTTTA GATAGCGATG CGGAATCCGA TGTCGTGTCA CCGGATATTG CATTACCCCA 540
 TCTTAGTTCA CTTCGATCCC GTAAAGAATC CACAAGAAGT GCTATCTCCG CGGTCCCCAG 600
 10 CGTTCGAAGT ATGCRAATCG AAATGGAGGA CCTTCGTGCC AAACCAACTC CAATGTCGAA 660
 AATTTTCTAT TTTAACCCTG ACAAATGGGG ATATTTTATT TTGGGACTCA TCGCCTGTAT 720
 TATTACTGGA ACTGTTACAC CGACATTTGC AGTTTTATAT GCGCAGATCA TACAGGTATA 780
 15 CTCGGAACCT GTTGATCAAA TGAAAGGCCA TGTGCTGTTC TGGTGTGGAG CTTTCATCGT 840
 CATTGGTCTC GTACACGCTT TTGCGTCTT TTTCTCGGCT ATTTGTTTGG GACGTTGCCG 900
 20 CGAAGCGTTA ACGAAAAAT TACGTTTCGA GCGGTTCAG AACCTTCTGC GACAGAATGT 960
 GGGATTCTAC GACGATATCC GACACGGTAC CGGTAAACTC TGTACGCGAT TTGCTACAGA 1020
 25 TGCACCCAAT GTCCGATATG TGTTCACTCG ACTTCCGGGT GTGCTTTCAT CGGTGGTGAC 1080
 CATAATTGGA GCTTTGGTTA TTGGATTAT CATTCGGGTG CAGCTGGCTT TGATTCTTAT 1140
 30 GGTGATGTA CCGTTGATCA TCGGTAGTGG ATACTTCGAG ATGCGCATGC AGTTTGGTAA 1200
 GAAGATGCGT GACACAGAGC TTCTTGAAGA GGCTGGGAAA GTTGCCCTCTC AAGCCGTGGA 1260
 35 GAACATTGCT ACCGTGCATG CCTGAAATAG GCAAGAGCAG TTCCATTCA TGTATTGCGA 1320
 GTATTTGAAG GAACCTATC GAGAAATCT TTGCCAGGCG CACACCTACG GGGGTGTATT 1380
 CGCGTTCTCA CAATCGTTGT TATTCTTTAT GTATGCTGTA GCATTTTGA TTGGTGCAAT 1440
 40 CTTCGTGGAC AACCACAGCA TGCAACCGAT TGACGTTTAC CGAGTATTTT TCGCGTTTAT 1500
 GTTTTGTGGA CAAATGGTCG GCAACATTTC TTCTTTTATT CCTGACGTTG TGAAAGCTCG 1560
 45 CCTGGCTGCA TCGCTCCTTT TCTACCTTAT CGAACACCCA TCAGAAATTG ATAATTTGTC 1620
 CGAGGATGCT GTCACGAAGA AAATCTCTGG TCATATCTCG TTCCGCAATG TCTATTTCAA 1680
 50 TTATCCGACA AGAAGACAGA TCAGAGTACT CCGTGGACTT AACCTAGAGA TAAATCCTGG 1740
 CACGACGGTA GCGCTTGTG GGCAGTCTGG TTGTGAAAA AGCACTGTGA TGGCGTTGTT 1800

ES 2 294 813 T3

	GGAACGGTTT TACAATCAAA ACAAGGGCGT GATTACGGTG GACGGCGAAA ACATCAGAAA	1860
5	CATGAACATA CGCAATCTTC GTGAGCAAGT GTGTATTGTT AGCCAGGAAC CAACGCTGTT	1920
	CGACTGTACC ATCATGGAAA ACATCTGTTA CGGTCTCGAT GACCCCAAGC CGTCCTACGA	1980
10	ACAGGTTGTT GCTGCAGCAA AAATGGCGAA CATTACAAAT TTTGTGCTGG GACTACCAGA	2040
	GGGTTACGAT ACGCGTGTG GTGAAAAGG CACTCAGCTG TCAGGCGGAC AGAAGCAMCG	2100
15	AATAGCCATA GCCAGAGCGC TGATTGAGA TCCGCCTATA CTTCTGCTGG ATGAGGCGAC	2160
	AAGCGCGCTG GATACCGAGA GTGAAAAGT CGTGCAAGAC GCCCTAGAGG TTGCTCGCCA	2220
	AGGTAGAAGC TGCCTTGTA TGGCCATCG CCTTTCTACA ATTCAAGACA GTGACGTCAT	2280
20	AGTGATGATC CAGGAGGGA AAGCTACAGA CAGAGGCACT CATGAACATT TACTGATGAA	2340
	GAACGATCTA TACAAACGGC TATGCGAAG ACAACGACTC GTTGAATCAC AATGAGTTT	2400
25	TAGTGCCAAT CGATAGTGAT CGATAAGCTA TGGATTAGTC TTTAACAATT ACTGATCATA	2460
	TGACTCTATC TCGTGCTTAA TTATAATGTA CATATGTAAT GGTTTTGATC TTACATATCT	2520
30	TGTAATTGGT CCTCACTATC ATAATGCCTT TAGTAGTATA TTAACAGTTT TATTAATACA	2580
	ACTTAAGTAA CATATTAA CAATTTATTAA TATAACTTAA GTAAGATATT GACAGTTTTA	2640
35	TTAATTTGGA GGATTTATAA TAAACCTCG TGCCGCTCGT GCCGAAACGA TATCAAGC	2698

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 6:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1275 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 45 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

55

60

65

ES 2 294 813 T3

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

ES 2 294 813 T3

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

ES 2 294 813 T3

	Thr Met Glu Glu Val Gln Glu Ala Cys Arg Val Ala Asn Ala Ala Asp	
	500	505 510
5	Phe Thr Lys Arg Leu Pro Glu Gly Tyr Gly Thr Arg Val Gly Glu Arg	
	515	520 525
10	Gly Val Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg Ile Ala Ile Ala Arg	
	530	535 540
	Ala Ile Ile Lys Asn Pro Arg Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ser	
	545	550 555 560
15	Ala Leu Asp Thr Glu Ala Glu Ser Ile Val Gln Glu Ala Leu Glu Lys	
	565	570 575
20	Ala Gln Lys Gly Arg Thr Thr Val Ile Val Ala His Leu Arg Ser Thr	
	580	585 590
	Ile Arg Asn Val Asp Gln Ile Phe Val Phe Lys Asn Gly Thr Ile Val	
	595	600 605
25	Glu Gln Gly Thr His Ala Glu Leu Met Asn Lys Arg Gly Val Phe Phe	
	610	615 620
30	Glu Met Thr Gln Ala Gln Val Leu Arg Gln Glu Lys Glu Glu Glu Val	
	625	630 635 640
	Leu Asp Ser Asp Ala Glu Ser Asp Val Val Ser Pro Asp Ile Ala Leu	
	645	650 655
35	Pro His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Arg Lys Glu Ser Thr Arg Ser Ala	
	660	665 670
40	Ile Ser Ala Val Pro Ser Val Arg Ser Met Gln Ile Glu Met Glu Asp	
	675	680 685
	Leu Arg Ala Lys Pro Thr Pro Met Ser Lys Ile Phe Tyr Phe Asn Arg	
	690	695 700
45	Asp Lys Trp Gly Tyr Phe Ile Leu Gly Leu Ile Ala Cys Ile Ile Thr	
	705	710 715 720
50	Gly Thr Val Thr Pro Thr Phe Ala Val Leu Tyr Ala Gln Ile Ile Gln	
	725	730 735

ES 2 294 813 T3

	Val Tyr Ser Glu Pro Val Asp Gln Met Lys Gly His Val Leu Phe Trp	
	740	745 750
5	Cys Gly Ala Phe Ile Val Ile Gly Leu Val His Ala Phe Ala Phe Phe	
	755	760 765
10	Phe Ser Ala Ile Cys Leu Gly Arg Cys Gly Glu Ala Leu Thr Lys Lys	
	770	775 780
	Leu Arg Phe Glu Ala Phe Lys Asn Leu Leu Arg Gln Asn Val Gly Phe	
	785	790 795 800
15	Tyr Asp Asp Ile Arg His Gly Thr Gly Lys Leu Cys Thr Arg Phe Ala	
	805	810 815
20	Thr Asp Ala Pro Asn Val Arg Tyr Val Phe Thr Arg Leu Pro Gly Val	
	820	825 830
	Leu Ser Ser Val Val Thr Ile Ile Gly Ala Leu Val Ile Gly Phe Ile	
	835	840 845
25	Phe Gly Trp Gln Leu Ala Leu Ile Leu Met Val Met Val Pro Leu Ile	
	850	855 860
30	Ile Gly Ser Gly Tyr Phe Glu Met Arg Met Gln Phe Gly Lys Lys Met	
	865	870 875 880
	Arg Asp Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ala Gly Lys Val Ala Ser Gln Ala	
	885	890 895
35	Val Glu Asn Ile Arg Thr Val His Ala Leu Asn Arg Gln Glu Gln Phe	
	900	905 910
40	His Phe Met Tyr Cys Glu Tyr Leu Lys Glu Pro Tyr Arg Glu Asn Leu	
	915	920 925
	Cys Gln Ala His Thr Tyr Gly Gly Val Phe Ala Phe Ser Gln Ser Leu	
45	930	935 940
	Leu Phe Phe Met Tyr Ala Val Ala Phe Trp Ile Gly Ala Ile Phe Val	
	945	950 955 960
50	Asp Asn His Ser Met Gln Pro Ile Asp Val Tyr Arg Val Phe Phe Ala	
	965	970 975

ES 2 294 813 T3

	Phe Met Phe Cys Gly Gln Met Val Gly Asn Ile Ser Ser Phe Ile Pro		
	980	985	990
5	Asp Val Val Lys Ala Arg Leu Ala Ala Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Ile		
	995	1000	1005
10	Glu His Pro Ser Glu Ile Asp Asn Leu Ser Glu Asp Gly Val Thr Lys		
	1010	1015	1020
	Lys Ile Ser Gly His Ile Ser Phe Arg Asn Val Tyr Phe Asn Tyr Pro		
	1025	1030	1035 1040
15	Thr Arg Arg Gln Ile Arg Val Leu Arg Gly Leu Asn Leu Glu Ile Asn		
	1045	1050	1055
20	Pro Gly Thr Thr Val Ala Leu Val Gly Gln Ser Gly Cys Gly Lys Ser		
	1060	1065	1070
	Thr Val Met Ala Leu Leu Glu Arg Phe Tyr Asn Gln Asn Lys Gly Val		
	1075	1080	1085
25	Ile Thr Val Asp Gly Glu Asn Ile Arg Asn Met Asn Ile Arg Asn Leu		
	1090	1095	1100
30	Arg Glu Gln Val Cys Ile Val Ser Gln Glu Pro Thr Leu Phe Asp Cys		
	1105	1110	1115 1120
	Thr Ile Met Glu Asn Ile Cys Tyr Gly Leu Asp Asp Pro Lys Pro Ser		
	1125	1130	1135
35	Tyr Glu Gln Val Val Ala Ala Ala Lys Met Ala Asn Ile His Asn Phe		
	1140	1145	1150
40	Val Leu Gly Leu Pro Glu Gly Tyr Asp Thr Arg Val Gly Glu Lys Gly		
	1155	1160	1165
	Thr Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg Ile Ala Ile Ala Arg Ala		
	1170	1175	1180
45	Leu Ile Arg Asp Pro Pro Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala		
	1185	1190	1195 1200
50	Leu Asp Thr Glu Ser Glu Lys Ile Val Gln Asp Ala Leu Glu Val Ala		
	1205	1210	1215
	Arg Gln Gly Arg Thr Cys Leu Val Ile Ala His Arg Leu Ser Thr Ile		
	1220	1225	1230
55	Gln Asp Ser Asp Val Ile Val Met Ile Gln Glu Gly Lys Ala Thr Asp		
	1235	1240	1245
60	Arg Gly Thr His Glu His Leu Leu Met Lys Asn Asp Leu Tyr Lys Arg		
	1250	1255	1260
65	Leu Cys Glu Thr Gln Arg Leu Val Glu Ser Gln		
	1265	1270	1275

ES 2 294 813 T3

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3512 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

```

CCCGTTGTTG CCGGTGCTAT AGCGGAGGAG ACTTTCTCAT CGATACGAAC CGTACACTCG      60
TTATGTGGCC ATAAAAGAGA GCTAACAAGG CAGCGTTGGA GAAAGGACGT CAGACAGGCC      120
TTGTCAAATA TTTCTATATG GGTGTTGGTG TGAGATTGGG TCAGATGTGT ACCTATGTGT      180
CCTACGCCCTT GGCTTTTTTG TATGGCAGTG TACTGATCAT CAACGACCCT GCATTGGATC      240
GTGGCCGAAT TTTCACAGTC TTTTGTCTGT GATGTCCGGC TCAGCAGCTC TCGGCACATG      300
TCTGCCACAT CTTAACACCA TATCCATCGC TCGAGGAGCG GTACGAAGTG TACTGTCACT      360
GATTAATAGT CGTCCAAAAA TCGATCCCTA TTCGTTAGAT GGCATTGTGC TCAACAATAT      420
GAGAGGATCT ATTGCTTCA AGAACGTGCA TTTCTCCTAT CCTTCCCGAA GAACATTGCA      480
GATATTGAAA GGTGTGTCAC TGCAAGTGTC GGCTGGCCAA AAAATTGCTT TGGTGGGTTC      540
AAGCGGTTGT GGAAAGTCAA CGATCGTCAA TTTATTATTG AGATTTTATG ATCCGACAAG      600
GGGAAAGGTA ACCATAGATG ATATTGATGT GTGTGATCTC AACGTGCAAA AACTTCGTGA      660

```

ES 2 294 813 T3

	ACAAATCGGT GTTGTTAGTC AGGAACCAGT GCTTTTCGAT GGCACACTAT TCGAAAATAT	720
5	CAAGATGGGT TATGAACAGG CCACAATGGA GGAGGTCCAA GAAGCGTGCC GTGTGGCGAA	780
	TGCTGCCGAC TTCATCAAAC GACTTCCAGA AGGTTACGGC ACCCGAGTTG GTGAACGTGG	840
10	TGTGCACTTA AGTGGCGGAC AAAAGCAGCG AATTGCCATA GCTCGTCCGA TCATCAAGAA	900
	CCCTCGCATA CTGCTGCTCG ATGAAGCCAC CAGTGTCTTA GACACAGAAG CGGAATCAAT	960
15	CGTGCAAGAG GCTCTGGAGA AGGCTCAAAA AGGGAGAACA ACCGTCATTG TAGCGCATCG	1020
	TCTGTCTACT ATCAGAAACG TGGATCAGAT TTTCGTTTTT AAGAACGGAA CGATCGTTGA	1080
20	GCAGGGCACT CATGCCGAGT TGATGAACAA ACGTGGAGTA TTCTTTGAAA TGAICTAAGC	1140
	ACAAGTCCTC CGACAAGAGA AGGAAGAGGA AGTTTTAGAA AATACGGAAC CAGTAGCGAA	1200
25	GTGTCAAGAG GATCCCTCC CTGCTCCTGA TGTCACTATT TTGGCTCCCC ATGAGGAACA	1260
	ACCGGAGCTA CCTAGCCCGC CGGGTCGGTT AGAAAATACA AAGCAACATG AGCATCTCTG	1320
30	AATGTCTTTG TCTGAGATAG CGATGCGGAA TCCGATGTCG TGTCACCGGA TATTGCATTA	1380
	CCCCATCTTA GTTCACTTCG ATCCCGTAAA GAATCCACAA GAAGTGCTAT CTCCGCGGTC	1440
35	CCCAGCGTTC GAAGTATGCA AATCGAAATG GAGGACCTTC GTGCCAAACC AACTCCAATG	1500
	TCGAAAATTT TCTATTTTAA CCGTGACAAA TGGGCATATT TCATTTTGGG ACTCATCGCC	1560
40	TGTATATTAA CTGGAAGTGT TACACCGACA TTGTCAGTTT TATATGCGCA GATCATAAG	1620
	GTATACTCGG AACCTGTTGA TCAAATGAAA GGCCATGTGC TGTTCTGGTG TGGAGCTTTC	1680
45	ATCGTCATTG GTCTCGTACA CGCTTTTTCG TTCTTTTCTT CGGCTATTTG TTTGGGACGT	1740
	TGCGGCGAAG CGTTAACGAA AAAATTACGT TTCGAGGCGT TCAAGAACCT TCTGCGACAG	1800
50	GATGTGGGAT TCTACGACGA TATCCGACAC GGTACCGTA AACTCTGTAC GCGATTGCT	1860
	ACAGATGCAC CCAATGTCCG ATATGTGTTC ACTCGACTTC CGGGTGTGCT TTCATCGGTG	1920
55	GTGACCATAA TTGGAGCTTT GGTATTGGA TTCATCTTCG GGTGGCAGCT GGCTTTGATT	1980
60	CTTATGGTGA TGGTACCGTT GATCATCGGT AGTGGATACT TCGAGATGCG CATGCAGTTT	2040
65		

ES 2 294 813 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

```

GGTAAGGAGA TGCCTGACAC AGAGCTTCTT GAAGAGGCTG GGAAAGTTGC CTCTCAAGCC 2100
GTGGAGAACA TTCGTACCGT GCATGCCCTG AATAGGCAAG AGCAGTTCCA TTTCATGTAT 2160
TGCGAGTATT TGAAGGAACC CTATCGAGAA AATCTTTGCC AGGCGCACAC CTACGGGGGT 2220
GTATTCGCGT TCTCACAATC GTTGTIATTC TTTATGTATG CTGTAGCATT TTGGATTGGT 2280
GCAATCTTCG TGGACAACCA CAGCATGCAA CCGATTGACG TTTACCGAGT ATTTTTCGCG 2340
TTTCATGTTTT GTGGACAAAT GGTGGGCAAC ATTTCTTCTT TTATTCCTGA CGTTGTGAAA 2400
GCTCGCCTGG CTGCATCGCT CCTTTTCTAC CTTATCGAAC ACCCATCAGA AATTGATAAT 2460
TTGTCCGAGG ATGGTGTAC GAAGAAAATC TCTGGTCATA TCTCGTTCCG CATTGTCTAT 2520
TTCAATTATC CGACAAGAAG ACAGATCAGA GTACTCCGTG GACTTAACCT AGAGATAAAT 2580
CCTGGCAGCA AGGTAGCGCT TGTGGGCAG TCTGGTTGTG GAAAAGCAC TGTGATGGCG 2640
TTGTTGGAAC GGTTTTACAA TCAAAACAAG GGCCTGATTA CGGTGGACGG CGAAACATC 2700
AGAAACATGA ACATACGCAA TCTTCGTGAG CAAGTGTGTA TTGTAAGCCA GGAACCAACG 2760
CTGTTGCACT GTACCATCAT GGAAAACATC TGTTACGGTC TCGATGACCC CAAGCCGTCC 2820
TACGAACAGG TTGTTGCTGC AGCAAAAATG GCGACATTG ACAATTTTGT GCTGGGACTA 2880
CCAGAGGGTT ACGATACGCG TGTGGTGAG AAAGGCACTC AGCTGTCAGG CGGACAGAAG 2940
CAACGAATAG CCATAGCCAG AGCGCTGATT CGAGATCCGC CTATACTTCT GCTGGATGAG 3000
GCGACAAGCG CGCTGGATAC CGAGAGTGAA AAGATCGTGC AAGACGCCCT AGAGGTTGCT 3060
CGCCAAGGTA GAACGTGCCT TGTAATTGCC CATCGCCTTT CTACAATTCA AGACAGTGAC 3120
GTCATAGTGA TGATCCAGGA GGGGAAAGCT ACAGACAGAG GCACTCATGA ACATTTACTG 3180
ATGAAGAACG ATCTATACAA ACGGCTATGC GAAACACAAC GACTCGTTGA ATCACAATGA 3240
GTTTTTAGTG CCAATCGATA GTGATCGATA AGCTATGGAT TAGTCTTTAA CACTTACTGA 3300
TCACAAATTT TATCTCGTGC TTTATTCTAA TGTACATATG TAACGGTTTT GATCTTACAT 3360
ATCTTGTAAT TGGTCCTCAC TATCATAATG CCTTTAGTAG TACATTAACA GTTTTATTAA 3420
TACAACTTAA GTAACATATT AACAAITTTA TTAATATAAC TTAAGTAAGA TATTGACAGT 3480
TTTATTAAAT TGGAGGATTT ATAATAAAAC TT 3512
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2681 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble

ES 2 294 813 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

CCCCTACTTC GGAAGGTTAC GGCACCCGAG TAGGTGAACG TGGTGTACAA CTAAGTGGCG      60
GACAAAAGCA GCGCATCGCT ATTGCTCGCG CCATCATTAA AAACCCTCGT ATACTTCTGC      120
TTGACGAAGC CACCAGTGCT CTGGACACAG AGGCGGAATC AATTGTGCAA GAAGCTCTCG      180
AGAAAGCTCA AAAAGGACGA ACGACCGTCA TTGTAGCGCA TCGCCTATCT ACCATCAGAA      240
ATGTCGATCA AATTTTCGTC TTCAAGAATG AAACGATTGT TGAGCAGGGT ACACATGCAG      300
AGTTGATGAA CAAACGAGGA GTGTTCTTTG AAATGACTCA AGCACAGGTC CTTCGACAAG      360
AAAAGGAAGA GGAGGTCTTA GAAAATACGG AACCAGTAGC GAAGTGTCAA GAGGCATCCT      420
TTCTGTCTCC TGATGTCACT ATTTTGACTC CCCATGACGA ACAACCCGAG CTACTTAGCC      480
CGCCGGATAG CGATGCGGAA TCCGACGTCA TGTACCGGA TCTTGGCTTA CCCCATCTTA      540
GTTCACTTCG ATCACGTAAA GAGTCCACAA GAAGTGCTAT TTCCGAGTC CCCAGCGTTC      600
GGAGTATGCA GATCGAAATG GAGGACCTTC GTGCCAAACC GACTCCGATG TCGAAAATTT      660
TCTATTTCAA CCGTGACAAA TGGGGATTTT TCATTTTGGG ACTCATCGCC TGTATTATAA      720
CTGGAAGTGT TACACCGACA TTTGCAGTTT TATATGCGCA GATCATACAG GTATACTCGG      780
AACCTGTTGA TCAAATGAAA GGCCATGTGC TGTTTTGGTG TGGAGCTTTC ATCGTCATTG      840
GTCTCGTACA CGCATTGCG TTCTTTTCTT CGGCCATTG TCTGGGACGT TCGGGCGAAG      900

```

ES 2 294 813 T3

	CTTTAACGAA GAAGTTACGT TTCGAGGCGT TCAAGAACCT TCTCCGACAA GATGTGGGAT	960
5	TCTACGACGA TATCCGACAC GGTACCGGTA AACTCTGTAC GCGATTGCT ACAGATGCAC	1020
	CCAATGTTCT ATATGTGTTT ACTCGACTTC CGGGTGACTT TTCATCGGTG GTGACCATAA	1080
10	TCGGAGCTTT GGTATTGGA TTTATTTTCG GGTGGCAGCT GGCCTTGATT CTTATGGTCA	1140
	TGGTACCGTT GATCATTGGC AGTGGATACT TCGAGATGCG CATGCAGTTT GGTAAAAAGA	1200
15	TGCGTGACAC AGAGCTTCTT GAAGAGGCTG GGAAAGTTGC CTCACAAGCC GTAGAGAATA	1260
	TTCGTACCGT ACATGCCCTG AATCGGCAAG AGCAGTTCCA TTTATGTAC TCGGAGTATT	1320
20	TGAAGGAACC CTATCGAGAG AATCTTTGCC AGGCGCACAC TTACGGGGGT GTATTGCGGT	1380
	TTTCACAGTC GTTGTATTTC TTTATGTATG CTGTAGCATT TTGGATTGGT GCAATCTTCG	1440
25	TGGACAACCA CAGCATGCAA CCGATTGATG TTTACCGAGT ATTTTTCGCG TTCATGTTTT	1500
	GTGGACAAAT GGTGGCAAC ATTTCGTCTT TCATCCCTGA TGTGTGAAA GCTCGCCTGG	1560
30	CTGCATCGCT CCTTTTCTAC CTCATCGAAC ACCCATCAGA AATTGATAAC TTGTCCGAGG	1620
	ATGGTGTCAA GAAGAAAATC TCTGGTCACA TCTCGTTCCG CAATGTCTAT TTCAATTACC	1680
35	CGACGAGAAG GCAGATCAGA GTACTCCGTG GACTTAACTT AGAGATAAAT CCTGGCACGA	1740
	CGGTAGCGCT TGTGGACAA TCTGGTTGTG GAAAAAGCAC TGTGATGGCG TTGTTGGAAC	1800
40	GCTTTTACAA TCAAAACAAG GCGGTGATTA CGGTTGACGG CGAAAACATC AGAAACATGA	1860
	ACATACGCAA TCTCCGTGAG CAAGTATGTA TAGTCAGCCA GGAACCAACA CTGTTGCACT	1920
45	GTACCATCAT GGAAAACATC TGTACGGAC TCGATGACCC CAAACCGTCC TACGAACAGG	1980
	TTGTTGCGGC AGCAAAAATG GCGAACATCC ACAATTTTGT GCTGGGACTG CCAGAGGGTT	2040
50	ATGACACGCG TGTGGCGAG AAAGGCACTC AGCTGTCAGG CGGACAAAAG CAAAGAATAG	2100
	CCATAGCCCG AGCGCTGATC CGAGATCCGC CTATACTTCT GCTGGATGAG GCGACAAGCG	2160
55	CTCTGGACAC GGAGAGTGAG AAGATCGTGC AAGACGCCCT AGAGGTTGCT CGCCAAAGTA	2220
	GAACGTGCCT TGTAAATTGCC CACCGCCTTT CTACAATTCA AGACAGTGAC GTCATAGTGA	2280
60		
65		

ES 2 294 813 T3

	TGATCCAGGA GGGAAAAGCT ACAGACAGAG GCACTCATGA ACATTACTG ATGAAGAACG	2340
5	ATCTATACAA ACGGCTATGC GAAACACAAC GACTCGTTGA ATCACAATGA GTTTTTAGTG	2400
	CCGATCGATA GTGATCGATA AGCTATGGAT TAGTCTTCAA CACTTACTGA TCATATGACT	2460
10	ATCTCGTGCT TTATTATAAT GTACATATGT AATGGTTTTG ATGTAAGTTA AGTTATAATT	2520
	GGTCTTCACT ATCATAATGC CTTTAGTAAT GCATTAACAC TTTTATAATA TAACTTGAAT	2580
15	AACATATGCA CAGTTTTATT AATATAACTT AAATAAGATA TTGACAGTTT TATTAAATTTG	2640
	GAGAATTTAT AATGAAACTT CTGGATTCCT GCAGCCCGGG G	2681

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

GAAATGACTC AAGCACAAG

19

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

AGACAAAGAC ATTCAGAG

18

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

ACNGTNGCNY TNGTNGG

17

ES 2 294 813 T3

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

15

GCNSWNGTNG CYTCRTC

17

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65