



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 236 682**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **92903304 .1**

96 Fecha de presentación : **21.01.1992**

97 Número de publicación de la solicitud: **0568575**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.1993**

54

Título: **Ensayo y modelo para la enfermedad de alzheimer.**

30

Prioridad: **21.01.1991 GB 9101307**
28.08.1991 GB 9118445

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.07.2005**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **31.03.2011**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **31.03.2011**

73

Titular/es: **ELAN PHARMACEUTICALS, Inc.**
800 Gateway Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Hardy, John, Anthony;**
Chartier-Harlin, Marie-Christine;
Goate, Alison, Mary;
Owen, Michael, John y
Mullan, Michael, John

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 236 682 T5

DESCRIPCIÓN

Ensayo y modelo para la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad progresiva conocida generalmente como demencia senil. En términos generales, la enfermedad se divide en dos categorías, particularmente de inicio tardío y de inicio temprano. El inicio tardío, que se produce en una edad avanzada (más de 65 años), puede deberse a una atrofia natural del cerebro que se produce a una mayor velocidad y en un grado más severo de lo normal. La enfermedad de Alzheimer de inicio temprano es mucho menos frecuente, pero muestra una demencia patológicamente idéntica con atrofia cerebral difusa que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre las edades de 35 y 60 años. Hay indicios de que una forma de este tipo de enfermedad de Alzheimer muestra una tendencia a desarrollarse en ciertas familias y, por lo tanto, se conoce como enfermedad de Alzheimer familiar (FAD).

En los dos tipos de enfermedad de Alzheimer la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y más extendidas en casos que comienzan en una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por dos tipos de lesiones en el cerebro, éstas son placas seniles y ovillos neurofibrilares.

15 Las placas seniles son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 150 μm con depósitos amiloides extracelulares en el centro. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína amiloide que constan de dos filamentos enrollados entre sí en parejas.

20 Las subunidad principal de la proteína, proteína β -amiloide, de los filamentos amiloides de las placas seniles es un pequeño polipéptido de alta agregación con una masa molecular relativa de aproximadamente 4.500. Esta proteína es un producto de escisión de una proteína precursora mucho mayor denominada proteína precursora de amiloide (APP).

25 En el momento actual, no se conoce ninguna terapia eficaz para las diversas formas de la enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, hay otras formas de demencia para las que se dispone de tratamiento y que producen un deterioro intelectual progresivo que se parece mucho a la demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, un ensayo de diagnóstico para la AD proporcionaría una herramienta valiosa en el diagnóstico y tratamiento de estas otras afecciones, al poder excluir la enfermedad de Alzheimer. También sería valioso que estuviera disponible una terapia adecuada.

30 También es importante el desarrollo de modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer que pueden usarse para definir adicionalmente los sucesos bioquímicos subyacentes implicados en la patogénesis de la AD. Supuestamente, tales modelos podrían emplearse, en una aplicación, para seleccionar agentes que alteren el curso degenerativo de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, podría usarse un sistema modelo de enfermedad de Alzheimer para investigar factores ambientales que indujeran o aceleraran la patogénesis de la AD. Por el contrario, podría usarse un modelo experimental para seleccionar agentes que inhibieran, previnieran o invirtieran la progresión de la AD. Presumiblemente, tales modelos podrían emplearse para desarrollar agentes farmacéuticos que fueran eficaces para prevenir, detener o invertir la AD.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP) humana mutante que se cosegrega con una predisposición genética a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, donde el alelo de la APP mutante tiene una sustitución de aminoácido, o una isoforma o fragmento de APP770 en la posición codificada por el codón 717 como se define en relación con APP770.

45 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una sonda polinucleotídica capaz de hibridar específicamente con un alelo de la proteína precursora de amiloide 770 (APP770) que presenta una mutación en el codón 717, de tal forma que puede identificarse una banda correspondiente al alelo de APP770 en una transferencia de Shouthern, mientras que no puede identificarse un alelo de tipo silvestre correspondiente o puede distinguirse del alelo de APP770 basándose en la intensidad de las señales.

50 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un hospedador transgénico que comprende un polinucleótido recombinante que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP) humana mutante que se cosegrega con una predisposición genética a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, sin que el hospedador sea un ser humano, donde el alelo de APP770 mutante tiene una sustitución de aminoácido en la posición codificada por el codón 717 como se define en relación con APP770 y donde, cuando el huésped es un animal, es un ratón.

55 De acuerdo con protocolos convencionales, ciertas células humanas cultivadas, cultivos primarios o líneas celulares inmortalizadas, pueden transfectarse, de forma transitoria o estable, con un alelo de APP mutante de forma que la célula humana cultivada exprese un polipéptido de APP mutante. Las células típicamente son células de

mamífero y preferiblemente células de mamífero del linaje neural, glial o astrocítico.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un agente capaz de tratar la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, que comprende:

poner en contacto un hospedador del tercer aspecto con el agente; y

5 controlar la expresión o el procesamiento de las proteínas codificadas por el alelo mutante.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un animal transgénico no humano que comprende un gen APP mutante como modelo para la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, donde el gen APP mutante tiene un codón 717 mutante.

10 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula primaria humana cultivada o una célula inmortalizada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un mutante de la posición 717 de la proteína precursora de amiloide humana 770 (APP770), o una isoforma de APP que tiene la mutación.

15 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico para determinar una predisposición heredada a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano en un sujeto, que comprende detectar en el sujeto la presencia de un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP), una isoforma o fragmento de la misma, donde dicho alelo, isoforma o fragmento de la misma tiene un polimorfismo de secuencia en una posición que corresponde al codón 717 de APP770, realizándose la etapa de detección sobre un material extraído y no devuelto al cuerpo del sujeto.

20 En un octavo aspecto, la invención, proporciona un método para el análisis genético de un sujeto humano, que comprende detectar la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo en el codón 717 de un gen APP770 de un gen de la proteína precursora de amiloide (APP) en el sujeto, realizándose la etapa de detección sobre un material extraído y no devuelto al cuerpo del sujeto. De esta manera, se proporcionan métodos para localizar la presencia de alteraciones genéticas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. Estos métodos de diagnóstico pueden usarse para predecir el desarrollo de la enfermedad antes del inicio, para una investigación genética o para detectar una mutación específica en un animal no humano experimental o en una célula.

25 En un noveno aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido sin proteínas humanas, que comprende una secuencia de núcleo:

Ile-Ala-Thr-Val-Ile-X-Ile-Thr-Leu- [SEC ID N°: 6]

donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales excepto valina.

Características preferidas de la invención se describen aquí en las reivindicaciones dependientes.

30 En un décimo aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia, en un ácido nucleico u otra muestra extraída de un sujeto, del gen para la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, que comprende identificar una alteración genética en una secuencia génica que codifica APP, donde la alteración genética es una mutación en el codón 717. Tales alteraciones genéticas pueden incluir mutaciones, inserciones o deleciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 La fig. 1 ilustra un primer árbol genealógico en el que la AD de inicio temprano aparentemente se hereda como un trastorno dominante autosómico. La edad media del inicio en esta familia es de 57 ± 5 años. Los símbolos negros indican individuos afectados y las líneas oblicuas indican individuos que han fallecido. Los pacientes del sexo femenino se indican por círculos y los del sexo masculino por cuadrados. En la presente generación se usan triángulos para mantener el anonimato. En la generación II, los cónyuges de los dos hermanos afectados eran hermanas. Se disponía de muestras de los trece individuos cuyos haplotipos se ilustran, de 19 niños más, de los cónyuges de estos individuos y de 7 individuos no afectados relacionados de manera más distante. Aparte del árbol genealógico se muestran ideogramas de los dos cromosomas 21 en cada individuo de la tercera generación en cuatro loci en el brazo largo del cromosoma. Los datos del árbol genealógico sugieren que los cromosomas negros se heredaban de los padres afectados.

45 La fig. 2 muestra una autorradiografía de un gel de secuenciación de parte del exón 17 del gen APP en un individuo normal y en un individuo afectado del árbol genealógico de la fig. 1 que muestra un solo cambio de pares de bases en el par de bases 2149 en el individuo afectado. Esta transición de C a T conduce a una sustitución de aminoácido de una valina por una isoleucina en el codón 717.

50 La fig. 3 muestra parte de la secuencia de aminoácidos codificada por los exones 16 y 17 del gen APP que muestra la mutación de valina a isoleucina (V a I) dentro del dominio transmembrana y la mutación que produce HCHWA-D (E a Q) en el dominio extracelular. La región sombreada del dominio transmembrana y los aminoácidos recuadrados del dominio extracelular representan la secuencia del péptido β - amiloide depositado. Adaptado de Kang *et al.*, (1987) *Nature* **325**:733.

La fig. 4 muestra productos de digestión de *BclI* del producto de PCR del exón 17 de individuos no afectados y afectados en la familia con AD de inicio temprano, que muestran la cosegregación del sitio de restricción y la enfermedad.

La fig. 5 muestra el árbol genealógico de la familia F19, junto con datos de D21S210.

5 La fig. 6 muestra secuencias del exón 17 de APP en un miembro afectado y no afectado de F19. En el miembro afectado, hay una transición G→T en la posición 2150.

La fig. 7 muestra la secuencia de APP695.

La fig. 8 muestra la secuencia de APP751.

La fig. 9 muestra la secuencia de APP770.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

La acumulación de la proteína β-amiloide (A4) en regiones cerebrales particulares es una de las características patológicas principales de la enfermedad de Alzheimer. La proteína β-amiloide es una proteína de aproximadamente 4 kD (de 39 a 42 aminoácidos) que procede, como producto de escisión interna, de una o más isoformas de una proteína precursora de amiloide (APP) de mayor tamaño. Hay al menos cinco isoformas distintas de APP que contienen 563, 695, 714, 751 y 770 aminoácidos, respectivamente (Wirak et al. (1991) *Science* **253**:323). Estas isoformas de APP se generan por ajuste alternativo de transcritos primarios de un solo gen, denominado el gen APP, que se localiza en el cromosoma humano 21. Se sabe que la mayoría de las isoformas de APP son proteínas transmembrana glicosiladas (Goldgaber et al. (1987) *Science* **235**:877) y que cuatro de las isoformas, AA563, APP714, APP751 y APP770, tienen un dominio inhibidor de proteasa que es homólogo al tipo Kunitz de inhibidores de proteasas de serina. El segmento β-amiloide (A4) comprende aproximadamente la mitad del dominio transmembrana y aproximadamente los primeros 28 aminoácidos del dominio extracelular de una isoforma de APP.

El procesamiento proteolítico de APP *in vivo* es un proceso fisiológico normal. En el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (Palmer et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* **86**:6338; Weidemann et al. (1989) *Cell* **57**:115) están presentes formas truncadas en el extremo carboxi-terminal de APP695, APP751 y APP770 y proceden de la escisión de la isoforma de APP en un sitio de escisión constitutivo dentro del dominio del péptido A4 de una isoforma de APP (Esch et al. (1990) *Science* **248**:1122). La escisión proteolítica normal en el sitio de escisión constitutiva produce un fragmento N-terminal soluble grande (de aproximadamente 100 kD) que contiene el dominio inhibidor de proteasa en algunas isoformas, y un fragmento C-terminal unido de la membrana de 9-10 kD que incluye la mayor parte del dominio A4.

La generación de la proteína β-amiloide (A4) patogénica parece ser el resultado del procesamiento proteolítico aberrante o alternativo de APP, de tal forma que no se produzca una escisión normal en el sitio constitutivo dentro del dominio A4, sino que más bien la escisión se produzca en dos sitios específicos que flanquean el dominio A4. Uno de estos sitios de escisión aberrantes está en el dominio transmembrana y el otro sitio de escisión aberrante está localizado aproximadamente en el extremo N de los primeros 28 aminoácidos del dominio extracelular (véase la fig. 3). Tal escisión proteolítica aberrante produce el polipéptido β-amiloide A4 que es propenso a formar agregados amiloidogénicos densos que son resistentes a la degradación proteolítica y a la eliminación. Los agregados β-amiloides resultantes supuestamente están implicados en la formación de las abundantes placas amiloides y amiloides cerebrovasculares que son las marcas neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los sitios de escisión aberrantes exactos no siempre son precisos; las moléculas β-amiloides aisladas a partir del cerebro de un paciente con AD muestran heterogeneidad N- y C-terminal. Por lo tanto, la ruta de escisión aberrante puede implicar proteólisis específica de secuencia seguida de actividad exopeptidasa (creando heterogeneidad terminal), o la proteólisis puede no tener especificidad de secuencia.

Se sabe que el gen APP está localizado en el cromosoma humano 21. En el cromosoma 21 se ha localizado un locus que se segrega con la enfermedad de Alzheimer familiar (Hyslop et al. (1987) *Science* **235**:885) próximo al gen APP. Previamente se ha informado sobre recombinantes entre el gen APP y el locus AD (Schellenberg et al. (1988) *Science* **241**:1507). Los datos parecían excluir el gen APP como sitio de mutación que podría causar FAD (Van Broekhoven et al. (1987) *Nature* **329**:153; Tanzi et al. (1987) *Nature* **329**:156).

La tecnología de ADN recombinante proporciona varias técnicas para analizar genes para localizar posibles mutaciones. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (Bell (1989) *Immunology Today*, **10**:351) puede usarse para amplificar secuencias específicas usando cebadores intrónicos, que después pueden analizarse por secuenciación directa.

Los investigadores que trabajaban en el área de la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch ("HCHWA-D") (Levy et al. (1990) *Science* **248**:11224) encontraron una sustitución de Glu por Gln en el resto 618 (usando el sistema de numeración de APP695) en APP que se considera que ocasiona la deposición de β-

amiloide en los vasos cerebrales de estos pacientes. Los presentes inventores han identificado una sustitución de una sola base, una transición de C a T en el par de bases 2149, que se ha encontrado en parte de la secuencia del gen APP en algunos casos de enfermedad de Alzheimer familiar. Esta transición de pares de bases conduce a una sustitución de aminoácido, es decir, de valina a isoleucina en el aminoácido 717 (APP₇₇₀) (véase Yoshikai *et al.* (1990) *Gene* 87:257), próxima al extremo C de la proteína β -amiloide. Esto sugiere que algunos casos de la enfermedad de Alzheimer se producen por mutaciones en el gen APP, y específicamente mutaciones que cambian el codón 717 de tal forma que codifique un aminoácido distinto de valina.

Además, se ha encontrado una sustitución de una sola base adicional, una transición de T a G en el par de bases adyacente 2150, en parte de la secuencia del gen APP en otros casos de enfermedad de Alzheimer familiar. Esta transición de pares de bases conduce a una sustitución de aminoácido diferente, particularmente de valina a glicina, en el aminoácido 717, reforzando de esta manera el argumento de que algunos casos de la enfermedad de Alzheimer se producen por mutaciones en el gen APP, específicamente en el codón 717.

Ahora está claro que una mutación en el locus del gen APP que tiene como resultado una sustitución de valina por isoleucina en el codón 717 (resto 642 en APP695) produce AD en algunas familias (Goate *et al.* (1991) *Nature* 349: 704). Ahora se ha identificado una segunda variante alélica de APP donde la valina se sustituye por glicina en el codón 717, y está tan asociada al fenotipo AD que indica que las variantes alélicas en el codón 717 del gen APP, particularmente las que codifican un aminoácido distinto de valina, y más particularmente las que codifican una isoleucina, glicina o fenilalanina, son alelos patogénicos y/o patognomónicos (Chartier-Harlin *et al.* (1991) *Nature* 353:844).

La proteólisis en cualquier lado de la región β -amiloide (A4) de APP puede mejorarse o alterarse cualitativamente por las mutaciones específicas en el codón 717, aumentando la velocidad de deposición y agregación de β -amiloide. Tales mutaciones del codón 717 pueden aumentar la formación de β -amiloide proporcionando un sustrato peor para la ruta proteolítica principal (escisión en el sitio constitutivo) o un sustrato mejor para una ruta de escisión alternativa competitiva (en sitios de escisión aberrantes).

DEFINICIONES

A lo largo de esta memoria descriptiva se usan varios términos y expresiones, y para facilitar su comprensión, se proporcionan las siguientes definiciones:

Como se usa en este documento, "exón" se refiere a cualquier segmento de un gen interrumpido que se representa en el producto de ARN maduro.

Como se usa en este documento, "intrón" se refiere a un segmento de un gen interrumpido que no se representa en el producto de ARN maduro. Los intrones forman parte del transcrito nuclear primario, pero se unen para producir ARNm, que después se transporta al citoplasma.

Como se usa en este documento, la frase "secuencia génica que codifica el precursor de la proteína amiloide" puede interpretarse como la secuencia de ADN y ADNc detallada por Yoshikai *et al.* (1990) *Gene* 87:257 y Kang *et al.*, *loc. cit.*, junto con la secuencia de ADN del promotor descrito por Salbaum *et al.* (1988) *EMBO* 7(9):2807.

Como se usa en este documento, los términos "marcador" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable (por ejemplo, por la incorporación de un nucleótido radiomarcado o por marcaje terminal con un fosfato radiomarcado terminal). El ADN o el ARN típicamente se marcan por la incorporación de un nucleótido radiomarcado (H^3 , C^{14} , S^{35} , P^{32}) o un nucleótido biotinilado que puede detectarse por avidina marcada (por ejemplo, avidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática) o un nucleótido digoxigeninilado que puede detectarse por un anticuerpo específico marcado.

Como se usan en este documento, "isoforma", "APP" e "isoforma de APP" se refieren a un polipéptido que se codifica por al menos un exón del gen APP (Kitaguchi *et al.*, (1998) *Nature* 331:530; Ponte *et al.*, *ibid.*, p.525; R.E. Tanzi, *ibid.*, p.528; de Sauvage and Octave (1989) *Science* 245:651; Golde *et al.* (1990) *Neuron* 4:253). Una isoforma de APP puede codificarse por un alelo de APP (o un exón del mismo) que está asociado con una forma de enfermedad de Alzheimer o que no está asociado con un fenotipo de enfermedad AD.

La expresión "gen β -amiloide" se usa en este documento como sinónimo de gen APP, ya que el β -amiloide es un producto proteico producido por una escisión post-traducciona de un producto génico de APP.

Como se usa en este documento, "fragmento" se refiere a un polipéptido de al menos aproximadamente 9 aminoácidos, típicamente de 50 a 75, o más, donde el polipéptido contiene una secuencia nuclear de aminoácidos (indicada en orden en la dirección desde el extremo amino al extremo carboxi):

-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-X-IleThr-Leu- [SEC ID N°: 6]

donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales excepto valina y particularmente donde X es isoleucina, glicina o fenilalanina. Un fragmento puede ser una isoforma de APP truncada, una isoforma de APP

modificada (tal como por sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos fuera de la secuencia de núcleo) u otra secuencia polipeptídica variante, pero no es una isoforma de APP natural o un polipéptido β -amiloide que esté presente en un individuo humano, afectado o no por AD. Si se desea, el fragmento puede fusionarse en cualquier extremo a aminoácidos adicionales, que pueden ser de 1 a 20, típicamente de 50 a 100, pero también hasta 250 a 500 o más.

Como se usa en este documento, "APP751" y "APP770" se refieren, respectivamente, a los polipéptidos con 751 y 770 restos aminoacídicos de longitud codificados por el gen APP humano (Ponte et al, loc. cit.; Kitaguchi et al. loc cit.; Tanzi et al. loc. cit.).

Como se usa en este documento "codón 717" se refiere al codón (es decir, la secuencia trinucleotídica) que codifica la 717 posición de aminoácidos en APP770, o la posición de aminoácidos en un isoforma o fragmento de APP que corresponde a la 717ª posición en APP770. Por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento de 670 restos de longitud que se produce truncando APP770 retirando los 100 aminoácidos N-terminales, tiene su 617ª posición de aminoácidos correspondiente al codón 717. De hecho, como se usa en este documento, codón 717 se refiere al codón que codifica el 698º resto aminoacídico de APP751 [SEC ID N°: 2] y el 642º resto aminoacídico de APP695 [SEQ ID N°: 1].

Como se usa en este documento, "isoforma o fragmento de APP humana" se refiere a una isoforma o fragmento de APP que contiene una secuencia de al menos 9 aminoácidos consecutivos que es idéntica a una secuencia en una proteína APP770, APP751 o APP695 humana que existe de forma natural en un individuo humano, y donde en una proteína APP que existe de manera natural en una especie no humana no está presente una secuencia idéntica.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en fase de lectura.

La expresión "corresponde a" se usa en este documento para significar que una secuencia es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada evolutivamente de manera estricta) con todo o una porción de una secuencia de referencia. Por el contrario, la expresión "complementario a" se usa en este documento para hacer referencia a que la secuencia complementaria es homóloga a todo o a una porción de una secuencia de referencia. Con fines ilustrativos, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

La expresión "mejora de la transcripción" se usa en ese documento para hacer referencia a la propiedad funcional de producir un aumento en la velocidad de transcripción de secuencias unidas que contienen un promotor funcional.

El término "agente" se usa en este documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente de mamífero). Los agentes se evalúan con respecto a la actividad biológica potencial por inclusión en ensayos de selección descritos mas adelante.

Como se usa en este documento, el término "mutante" se refiere a alelos de APP que tienen mutaciones de sentido erróneo que son patognomónicas para una predisposición genética para el desarrollo de AD; específicamente, una mutación en el codón 717 (como se indica por la secuencia de aminoácidos en APP770) del gen APP, de tal forma que el codón 717 codifique uno de los 19 aminoácidos que no son valina (es decir, glicina, metionina, alanina, serina, isoleucina, leucina, treonina, prolina, histidina, cisteína, tirosina, fenilalanina, ácido glutámico, triptófano, arginina, ácido aspártico, asparagina, lisina y glutamina), pero preferiblemente isoleucina, glicina o fenilalanina. De esta manera, un polipéptido APP770 mutante es un polipéptido APP770 que tiene un resto aminoacídico en la posición 717 que no es valina. Otras isoformas de APP mutante comprenden un aminoácido que no es valina en la posición del resto aminoacídico que corresponde al codón 717 (es decir, que se codifica por el codón 717). De manera similar, un alelo de APP mutante o un alelo del codón 717 de APP variante es un alelo de APP que codifica un aminoácido distinto de valina en el codón 717 (con referencia a la traducción deducida de APP770 humana como se describe en la definición del "codón 717", supra), preferiblemente, isoleucina, glicina o fenilalanina. Por lo tanto, un alelo de APP que codifica valina en el codón 717 es un alelo de APP de "tipo silvestre".

Será evidente para un especialista en la técnica que en los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos. Sin embargo, tales sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos no deben alterar substancialmente la capacidad del polinucleótido de hibridar con una de las secuencias polinucleotídicas mostradas en las figs. 5 y 6 en condiciones de hibridación que sean suficientemente rigurosas como para producir una hibridación específica.

"Hibridación específica" se define en este documento como la formación de híbridos entre un polinucleótido sonda (por ejemplo, un polinucleótido de la invención que puede incluir sustituciones, deleciones y/o adiciones) y

un polinucleótido diana específico (por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia), donde la sonda preferentemente hibrida con la diana específica de forma que, por ejemplo, pueda identificarse un banda correspondiente a un alelo de APP variante o un fragmento de restricción del mismo, en una transferencia de Southern, mientras que no se identifica un alelo de APP del tipo silvestre correspondiente (es decir, uno que codifica valina en el codón 717) o puede distinguirse de un alelo de APP variante basándose en la intensidad de la señal. Pueden diseñarse sondas de hibridación capaces de hibridar de manera específica para detectar un desacoplamiento de una sola base de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos en Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. y Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA; Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437; Kwok et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:999; Miyada et al. (1987) Methods Enzymol. 154:94. En condiciones convencionales (NaCl 1 M), se calcula que la T_m para los oligonucleótidos es $[4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})]$. Aunque las condiciones de PCR difieren de las condiciones convencionales, esta T_m se usa como guía para las estabilidades relativas esperadas de los oligonucleótidos. Los cebadores específicos de alelo son típicamente de 13-15 nucleótidos de longitud, algunas veces de 16-21 nucleótidos de longitud o más; cuando se usan cebadores cortos, tales como un cebador de 14 nucleótidos de longitud, se usan temperaturas de templado bajas, típicamente de 44 a 50°C, ocasionalmente algo mayores o menores dependiendo de la composición básica de la secuencia o secuencias.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Detección de Alelos de APP Mutante en el Codón 717

En una realización de la invención, el método implica identificar una alteración genética en el aminoácido 717, que puede hacer que la Val consenso se cambie, por ejemplo, por otro resto hidrófobo. Esto se realizará en una muestra extraída del sujeto. Los restos hidrófobos incluyen Leu, Ala, Ile y Gly, teniendo los tres primeros cadenas laterales alifáticas. Phe también tiene un resto hidrófobo que puede ser apropiado. Como se ha indicado anteriormente, los restos preferidos incluyen Ile, Gly y Phe (Murrell *et al.*, (1991) *Science* 254:97).

El hecho de que estas mutaciones descritas anteriormente estén en el mismo codón puede ser una coincidencia, pero parece poco probable en una base estadística. Hay dos posibilidades que pueden explicar estos datos. En primer lugar, la sustitución del resto de valina en el codón 717 puede producir una mayor deposición de beta-amiloide debido a cambios en el metabolismo de APP. En segundo lugar, la variación en la secuencia alrededor de esta posición puede producir una mayor traducción de ARNm de APP y de esta forma producir AD por una ruta análoga a la ruta por la que se cree que se produce la AD en el síndrome de Down (Tanzi y Hyman (1991) *Nature* 350:564 y Rumble *et al.* (1989) *N. Engl. J. Med.* 320:1446). Ciertos estudios de hibridación *in situ* han demostrado que las mutaciones de APP717 no alteran la expresión de APP (Harrison *et al.* (1991) *Neurorep.* 2:152).

Las mutaciones V717I (APP 717 Val→Ile), V717G (APP 717 Val→Gly) y V717F (APP 717 Val→Phe) desestabilizarían una supuesta estructura de tallo-bucle y destruirían un posible elemento de respuesta al hierro entre los pares de bases 2131 y 2156 (Tanzi y Hyman, *loc. cit.*). Hay otras posibles mutaciones que también podrían romper esta estructura, siendo muchas de ellas silenciosas a nivel de la proteína; aunque estas mutaciones indicadas específicamente han implicado un cambio en el mismo aminoácido, y no se han presentado cambios silenciosos o cambios en otros aminoácidos antes del trabajo descrito en este documento. El examen de los datos de secuencia de otras 10 especies de mamífero (Johnstone *et al.*, (1991) *Mol. Brain Res.* 10:299) demuestra que aunque en todas ellas se conserva el resto de valina en el codón 717, no se prevería la existencia de la supuesta estructura de tallo-bucle postulada a partir de la secuencia humana (Tanzi y Hyman *loc. cit.*) en vacas u ovejas; y en cerdos y ratones no está presente la secuencia consenso para los elementos que responden al hierro. Finalmente, se cree que tales estructuras de bucle-lazo modulan la traducción de genes alterando la estabilidad del ARNm (Klausner y Harford (1989) *Science* 246:870); sin embargo, Harrison y colaboradores (Harrison *et al. loc. cit.*) han demostrado por hibridación *in situ* que los ARNm de APP no se alteran en gran medida en el cerebro de un individuo con la mutación V717I. Por estas razones, se cree que probablemente las alteraciones en la velocidad de traducción de APP producidas por las mutaciones específicas identificadas no son la clave de su patogenicidad.

El hecho de que las mutaciones específicas descritas impliquen diferentes cambios (Val→Ile, Val→Gly y Val→Phe) sugiere que ni la hidrofobia de la cadena lateral ni el volumen de la cadena lateral es el punto crucial. Todos los ejemplos de alelos de APP que codifican un aminoácido distinto de valina en el codón 717 se cosegregan con FAD; lo que sugiere que la valina que existe en la posición 717 en APP770 de tipo silvestre o APP751 es un resto aminoacídico crítico para el procesamiento proteolítico de APP no patogénico (es decir, por la ruta de escisión constitutiva).

La ruta metabólica principal para la molécula de APP implica escisión dentro del fragmento beta-amiloide (Esch *et al. loc. cit.*). Para generar beta-amiloide, debe haber una segunda ruta en la que la APP se escinde fuera de esta secuencia. Tal escisión probablemente dejaría un resto de la molécula de APP que contiene el fragmento beta-amiloide incluido en la membrana. Posiblemente, el fragmento que contiene el beta-amiloide que se genera por la segunda ruta se degrada por la acción de la peptidasa; las mutaciones indicadas pueden ser patogénicas porque los péptidos que las contienen pueden ser más resistentes a las acciones de esta peptidasa. Por lo tanto, las alteraciones genéticas en el gen APP que producen propiedades de degradación alteradas (generalmente

reducidas) son particularmente importantes en la aplicación de la invención. Hay varias metodologías disponibles de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse para detectar e identificar una mutación genética responsable de la enfermedad de Alzheimer. Éstas incluyen sondeo directo, metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y análisis conformacional de una sola cadena (SSCA).

La detección de mutaciones puntuales usando sondeo directo implica el uso de sondas oligonucleotídicas que pueden prepararse sintéticamente o por desplazamiento de mella (nick translation). Las sondas de ADN pueden marcarse de manera adecuada usando, por ejemplo, un radiomarcador, un marcador enzimático, un marcador fluorescente, un marcador de biotina-avidina y similares para una visualización posterior, por ejemplo, en un procedimiento de hibridación de transferencia de Southern. La sonda marcada se hace reaccionar con el ADN de la muestra unido a un sustrato de nitrocelulosa o de Nylon 66. Las áreas que llevan secuencias de ADN complementarias a la sonda de ADN marcada se marcan por sí mismas como consecuencia de la reacción de rehibridación. Las áreas del filtro que presentan tal marcaje después pueden visualizarse, por ejemplo, por autorradiografía.

Las técnicas de sondeo alternativas, tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) implican el uso de sondas de desacoplamiento, es decir, sondas que tienen una complementariedad completa con la diana excepto en el punto de la mutación. La secuencia diana después se deja hibridar tanto con oligonucleótidos que tienen complementariedad completa como con oligonucleótidos que contienen un desacoplamiento, en condiciones que distinguen entre los dos. Manipulando las condiciones de reacción es posible obtener hibridación sólo cuando hay una complementariedad completa. Si está presente un desacoplamiento, entonces la hibridación se reduce significativamente.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que amplifica secuencias de ADN específicas con una eficacia notable. Los ciclos repetidos de desnaturalización, templado con cebadores y extensión realizados con un enzima Taq polimerasa estable térmicamente produce aumentos exponenciales en la concentración de secuencias de ADN deseadas.

Como se conoce la secuencia de nucleótidos que codifica el precursor de la proteína amiloide de AD (Kang *et al. loc. cit.*, y Yoshikai, anteriormente), es posible preparar oligonucleótidos sintéticos complementarios a secuencias que flanquean el ADN de interés. Cada oligonucleótido es complementario a una de las dos cadenas. El ADN después se desnaturaliza a altas temperaturas (por ejemplo, a 95°C) y después se rehibrida en presencia de un gran exceso molar de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos, orientados con sus extremos 3' dirigidos entre sí, hibridan con cadenas opuestas de la secuencia diana y ceban una extensión enzimática a lo largo de la plantilla de ácido nucleico en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfato. El producto terminal después se desnaturaliza de nuevo para otro ciclo. Después de haber repetido este ciclo de 3 etapas varias veces, puede conseguirse la amplificación de un segmento de ADN en más de un millón de veces. El ADN resultante después puede secuenciarse directamente para localizar cualquier alteración genética. Como alternativa, es posible preparar oligonucleótidos que sólo se unan al ADN alterado, de forma que la PCR sólo produzca la multiplicación del ADN si está presente la mutación. Después de la PCR, puede usarse una hibridación de oligonucleótidos específica de alelo (Dihella *et al.* (1988) Lancet 1:497) para detectar la mutación puntual de AD. Como alternativa, puede emplearse una adaptación de la amplificación denominada por PCR de alelos específicos (PASA); esto usa una amplificación diferencial para una distinción rápida y fiable entre alelos que difieren en un solo par de bases.

En aún otro método, la PCR puede continuarse por digestión con endonucleasas de restricción con un análisis posterior de los productos resultantes. La sustitución de C por T en el par de bases 2149, encontrada como resultado de la secuenciación del exón 17, crea un sitio de restricción *Bcl*I. La creación de este sitio de reconocimiento por endonucleasas de restricción facilita la detección de la mutación de AD usando análisis de RFLP o por detección de la presencia o ausencia de un sitio *Bcl*I polimórfico en un producto de PCR que incluye el codón 717.

Para el análisis de RFLP, se obtiene ADN, por ejemplo, a partir de la sangre del sujeto que se sospecha que tiene AD y a partir de un sujeto normal, se digiere con la endonucleasa de restricción *Bcl*I y posteriormente se separa basándose en el tamaño usando electroforesis en gel de agarosa. Después puede usarse la técnica de transferencia de Southern para detectar, por hibridación con sondas marcadas, los productos de digestión por endonucleasas. Después pueden compararse los patrones obtenidos a partir de la transferencia de Southern. Usando tal estrategia, se detecta el ADN que incluye una mutación de Alzheimer que crea o elimina un sitio de restricción en el codón 717, tal como el sitio *Bcl*I, determinando el número de bandas detectadas y comparando este número con un alelo de referencia que tiene un alelo del codón 717 que codifica valina.

De forma correspondiente, la sustitución de T por G en el par de bases 2150 crea un sitio de restricción *Sfa*NI (GCATC), que puede explotarse de una manera similar a la descrita anteriormente, *mutatis mutandis*. La creación similar de sitios de restricción adicionales por sustituciones de nucleótidos dentro del codón 717, donde el codón 717 codifica un aminoácido distinto de valina, puede calcularse fácilmente haciendo referencia al código genético y una lista de secuencias de nucleótidos reconocidas por endonucleasas de restricción (Promega Protocols and Applications Guide, (1991) Promega Corporation, Madison, Wisconsin).

El análisis conformacional de una sola cadena (SSCA) (Orita *et al.* (1989) *Genomics* 5:874 y Orita *et al.* (1990) *Genomics* 6:271) ofrece un método relativamente rápido para detectar cambios de secuencia que pueden ser apropiados al menos en algunos casos.

5 La amplificación por PCR de alelos específicos (PASA) es un método rápido para detectar mutaciones de una sola base o polimorfismos (Newton *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2503; Nichols *et al.* (1989) *Genomics* 5:535; Okayama *et al.* (1989) *J. Lab. Clin. Med.* 114:105; Sarkar *et al.* (1990) *Anal. Biochem.* 186:64; Sommer *et al.* (1989) *Mayo Clin. Proc.* 64:1361; Wu (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2757; y Dutton *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:700). PASA (también conocido como amplificación específica de alelo) implica la amplificación con dos cebadores oligonucleotídicos de tal forma que uno sea específico de alelo. El alelo deseado se amplifica eficazmente, mientras que el otro alelo o alelos se amplifican de forma deficiente porque no se acopla con una base en o cerca del extremo 3' del cebador específico de alelo. De esta manera, puede usarse PASA o el método relacionado de PAMSA para amplificar específicamente uno o más alelos del codón 717 de APP variante. Cuando tal amplificación se realiza en el material genético (o ARN) obtenido a partir de un individuo, puede servir como un método para detectar la presencia de uno o más alelos del codón 717 de APP variante en un individuo.

15 De manera similar, se ha usado un método conocido como reacción en cadena de la ligasa (LCR) para detectar satisfactoriamente una sustitución de una sola base en un alelo de hemoglobina que produce anemia de células falciformes (Barany *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:189; Weiss (1991) *Science* 254:1292). Las sondas de LCR pueden combinarse o formar múltiplex para la selección simultánea de múltiples mutaciones diferentes. De esta manera, un método para seleccionar alelos del codón 717 de APP variante es formar múltiplex de al menos dos, y preferiblemente todas, las sondas de LCR que detectarán un alelo de APP que tiene un codón 20 717 que no codifica valina, pero que codifica un aminoácido. El código genético universal proporciona las secuencias degeneradas de todos los aminoácidos que no son valina codificados, de forma que el diseño de la sonda de LCR para detectar cualquier alelo del codón 717 de una variante particular sea sencillo, y se pueden seleccionar grupos de múltiplex de tales sondas de LCR a la discreción del especialista para su uso deseado particular.

25 Cuando se realizan diagnósticos usando cualquiera de las técnicas anteriores o variaciones de las mismas, es preferible examinar varios individuos. Estos pueden incluir un progenitor no afectado, un progenitor afectado, un hermano afectado, un hermano no afectado así como quizás otros miembros de la familia más lejanos.

Animales y Líneas Celulares Modelo

30 Habiendo identificado las mutaciones específicas en el codón 717 del gen β -amiloidé como causa de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD), es posible, usando manipulación genética, desarrollar sistemas modelo transgénicos y/o sistemas de células enteras que contengan el gen FAD mutado (o una porción del mismo) para uso, por ejemplo, como sistemas modelo para seleccionar fármacos y evaluar la eficacia de los fármacos. Además, tales sistemas modelo proporcionan una herramienta para definir la bioquímica subyacente de APP y el metabolismo β -amiloidé, que de esta manera proporciona una base para un diseño racional de fármacos.

35 Un tipo de sistema celular puede tener origen natural. Para esto, deben obtenerse muestras de sangre del sujeto afectado para proporcionar las células necesarias que pueden transformarse permanentemente en una línea celular linfoblastoide usando, por ejemplo, virus de Epstein-Barr.

40 Una vez establecidas, tales líneas celulares pueden cultivarse de manera continua en cultivos en suspensión y pueden usarse para una diversidad de experimentos *in vitro* para estudiar la expresión y el procesamiento de APP.

45 Como la mutación FAD es dominante, un método alternativo para construir una línea celular es obtener por ingeniería genética un gen mutado, o una porción del mismo que incluye el codón 717, en una línea celular establecida (de manera estable o transitoria) elegida. Sisodia (1990) (*Science* 248:492) ha descrito la inserción de un gen APP normal, por transfección, en células de mamífero. Oltersdorf *et al.* ((1990) *J. Biol. Chem.* 265:4492) describen la inserción de APP en líneas de células eucariotas inmortalizadas.

Los sistemas de expresión de baculovirus son útiles para la expresión de alto nivel de genes heterólogos en células eucariotas. Knops *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266(11):7285 describen la expresión de APP usando tal sistema.

50 En otro uso del presente método, es posible escindir el gen mutado (es decir, un gen del codón 717 de APP variante) para uso en la creación de animales transgénicos que contengan el gen mutado. Por ejemplo, puede clonarse un alelo 717 del codón APP de la variante humana entera y aislarse, en partes o en su totalidad, en un vector de clonación (por ejemplo, λ Charon35, cósmido o cromosoma artificial de levadura). El gen del codón 717 de la APP variante humana, en partes o en su totalidad, puede transferirse a un animal hospedador no humano, tal como un ratón. Como resultado de la transferencia, el animal no humano transgénico resultante preferiblemente expresará uno o más polipéptidos del codón 717 de APP variante. Más preferiblemente, un animal no humano transgénico de 55 la invención expresará uno o más polipéptidos del codón 717 de APP variante de una manera específica de neuronas (Wirak *et al.* (1991) *EMBO* 10:289). Esto puede conseguirse transfiriendo substancialmente el gen APP humano entero (que codifica un mutante del codón 717) que incluye la secuencia de 4,5 kilobases que está

adyacente y cadena arriba del primer sitio de inicio de la transcripción principal de APP.

Como alternativa, se pueden diseñar minigenes que codifiquen polipéptidos del codón 717 de APP variante. Tales minigenes pueden contener una secuencia de ADNc que codifica un polipéptido del codón 717 de APP variante, preferiblemente de longitud completa, una combinación de exones del gen de APP, o una combinación de los mismos, unida a una secuencia señal de poliadenilación cadena abajo y un promotor cadena arriba (y preferiblemente un potenciador). Tal construcción de minigenes, cuando se introduce en un hospedador transgénico apropiado (por ejemplo un ratón o rata), expresará un polipéptido del codón 717 de APP variante codificado, mas preferiblemente un polipéptido del codón 717 de APP variante que contiene un resto de isoleucina, glicina o fenilalanina en el codón 717 de APP770 o la posición correspondiente en una isoforma o fragmento de APP.

Una estrategia para crear animales transgénicos es dirigir una mutación al gen deseado por recombinación homóloga en una línea de células madre embrionarias (ES) *in vitro* seguido de microinyección de la línea celular ES modificada en un blastocisto del hospedador y la posterior incubación en una madre de acogida (véase Frohman y Martin (1989) *Cell* 56:145). Como alternativa, puede usarse la técnica de microinyección del gen mutado, o una porción del mismo, en un embrión de una célula seguido de incubación en una madre de acogida. En Wirak *et al.* (1991) *EMBO*, 10(2):289; Schilling *et al.* (1991) *Gene* 98(2):225; Quon *et al.* (1991) *Nature* 352:239; Wirak *et al.* (1991) *Science* 253:323; y Kawabata *et al.* (1991) *Nature* 354:476 se describen diversos usos de animales transgénicos, particularmente animales transgénicos que expresan una isoforma o fragmento de APP de tipo silvestre. En la técnica se conocen otros métodos para producir animales transgénicos.

Como alternativa, puede usarse mutagénesis de localización dirigida y/o conversión génica para mutar un alelo de un gen APP murino (o de otro animal no humano), endógeno o transfectado, de tal forma que el alelo mutado no codifique valina en la posición del codón en el gen APP de ratón que corresponde al codón 717 (de APP770) del gen APP humano (tal posición se identifica fácilmente por acoplamiento de homología del gen APP murino o la proteína APP al gen APP o la proteína APP770 humana). Preferiblemente, tal alelo murino mutado codificaría isoleucina o glicina o fenilalanina en la posición del codón correspondiente.

Agentes Terapéuticos

Habiendo detectado la mutación genética en la secuencia génica que codifica la proteína β -amiloide en un individuo que aún no presenta signos evidentes de AD familiar, usando el método de la presente invención, es posible emplear terapia génica, en forma de implantes génicos, para prevenir el desarrollo de la enfermedad.

Otras realizaciones dirigidas al la modulación de la producción de proteínas APP variantes incluyen métodos que emplean polinucleótidos antisentido específicos complementarios a todo o parte de una secuencia de APP variante, o para algunas realizaciones una secuencia de APP de tipo silvestre. Tales polinucleótidos antisentido de complementariedad pueden incluir sustituciones, adiciones, deleciones o transposiciones de nucleótidos, siempre que se mantenga la hibridación específica con la secuencia diana relevante, es decir, una secuencia del codón 717 de la APP variante, como una propiedad del polinucleótido. De esta manera, un polinucleótido antisentido preferiblemente debe unirse a una secuencia de APP variante (es decir, el codón 717 no codifica valina) en comparación con una APP de tipo silvestre (es decir, el codón 717 codifica valina). Es evidente que el polinucleótido antisentido debe reflejar la secuencia de nucleótidos exacta del alelo variante (o el alelo de tipo silvestre cuando se desee) y no una secuencia degenerada.

Los polinucleótidos antisentido complementarios incluyen oligonucleótidos de ARN o ADN antisentido solubles que pueden hibridar específicamente con una especie de ARNm de APP variante e impedir la transcripción de la especie de ARNm y/o la traducción del polipéptido codificado (Ching *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10006; Broder *et al.* (1990) *Ann. Int. Med.* 113:604; Loreau *et al.* (1990) *FEBS Letters* 274:53-56); Holcenberg *et al.*, documento WO91/11535; documento U.S. N° 7.530.165 ("New human CRIPTO gene" - disponible para el público a través de Derwent Publications Ltd., Rochdale House, 128 Theobalds Road, Londres, Reino Unido); documentos WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641; y EP 386563. Por lo tanto, los polinucleótidos antisentido inhiben la producción de los polipéptidos de APP variante. Los polinucleótidos antisentido preferiblemente pueden inhibir la transcripción y/o la traducción de un ARNm correspondiente a un polipéptido variante (o de tipo silvestre) puede inhibir la activación de linfocitos T.

Pueden producirse polinucleótidos antisentido a partir de un cassette de expresión heterólogo en una célula transfectante o célula o animal transgénico, tal como una célula neural, glial o astrocítica transgénica, preferiblemente cuando el cassette de expresión contiene una secuencia que promueve la expresión específica del tipo celular (Wirak *et al. loc. cit.*). Como alternativa, los polinucleótidos antisentido pueden comprender oligonucleótidos solubles que se administran al medio externo, en el medio de cultivo *in vitro* o en el sistema circulatorio o fluido intersticial *in vivo*. Se ha demostrado que los polinucleótidos antisentido solubles presentes en el medio externo consiguen entrar en el citoplasma e inhiben la traducción de especies de ARNm específicas. En algunas realizaciones, los polinucleótidos antisentido comprenden restos de metilfosfonato. En relación con métodos generales relacionados con polinucleótidos antisentido, véase *Antisense RNA and DNA*, (1988), D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Antígenos de APP Mutante y Anticuerpos Monoclonales

En aún otro aspecto de la invención, habiendo detectado una alteración genética en una secuencia génica que codifica APP, es posible obtener muestras de la proteína β -amiloide alterada a partir de la misma fuente. Esta proteína puede proceder del tejido cerebral del un sujeto al que se le ha diagnosticado enfermedad de Alzheimer o, mas preferiblemente, se produce por métodos de ADN recombinante o se sintetiza por síntesis química directa en un soporte sólido. Tales polipéptidos contendrán una secuencia de aminoácidos de un alelo variante de APP que incluye el codón 717. Son ejemplos de tales secuencias:

- | | | |
|----|---|-----------------|
| 5 | (a) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Gly-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 7] |
| | (b) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Met-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 8] |
| | (c) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Ala-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 9] |
| 10 | (d) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Ser-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 10] |
| | (e) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Ile-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 11] |
| | (f) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Leu-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 12] |
| | (g) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Thr-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 13] |
| | (h) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Pro-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 14] |
| 15 | (i) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-His-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 15] |
| | (j) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Cys-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 16] |
| | (k) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Tyr-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 17] |
| | (l) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Phe-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 18] |
| | (m) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Glu-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 19] |
| 20 | (n) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Trp-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 20] |
| | (o) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Arg-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 21] |
| | (p) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Asp-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 22] |
| | (q) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Asn-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 23] |
| | (r) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Lys-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 24] |
| 25 | (s) -Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Gln-Ile-Thr-Leu- | [SEC ID Nº: 25] |

Usando tal material polipeptídico, es posible preparar antisueros y anticuerpos monoclonales usando, por ejemplo, el método de Kohler y Milstein ((1975) *Nature* **256**:495). Después, tales anticuerpos monoclonales pueden constituir la base de un ensayo de diagnóstico.

30 Tales polipéptidos de APP variante pueden usarse para inmunizar a un animal para la producción de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden comprender un antisuero policlonal o pueden comprender un anticuerpo monoclonal producido por células de hibridoma. Como métodos generales para preparar anticuerpos, véase Antibodies: A Laboratory Manual, (1988) E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

35 Por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento producido de forma recombinante de un polipéptido del codón 717 de APP variante puede inyectarse en un ratón junto con un adyuvante para generar una respuesta inmune. Pueden recogerse inmunoglobulinas murinas que se unen al fragmento recombinante con una afinidad de unión de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a partir del ratón inmunizado como antisuero y pueden purificarse adicionalmente por cromatografía de afinidad u otros medios. Además, se recogen células de bazo del ratón y se fusionan con células de mieloma para producir un banco de células de hibridoma secretoras de anticuerpo. En el banco de hibridomas
40 pueden seleccionarse clones que se secreten inmunoglobulinas que se unan al fragmento producido de forma recombinante con una afinidad de al menos $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Más específicamente, se seleccionan inmunoglobulinas que se unen al polipéptido del codón 717 de APP variante pero que tienen una reactividad cruzada limitada con un polipéptido APP de tipo silvestre (es decir, el codón 717 codifica valina), por preabsorción con APP de tipo silvestre o por selección en líneas de células de hibridoma idiotipos específicos que preferentemente se unen a la variante en
45 comparación con el tipo silvestre.

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención capaces de expresar finalmente los polipéptidos de APP variante deseados pueden formarse a partir de una diversidad de polinucleótidos diferentes (ADN genómico o ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos etc.), así como por una diversidad de técnicas diferentes.

5 Como se ha indicado previamente, las secuencias de ADN se expresarán en hospedadores después de que las secuencias se hayan unido operativamente a (es decir, colocado par asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión típicamente se pueden replicar en los organismos hospedadores como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a tetraciclina o resistencia a higromicina, para permitir la detección y/o selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.704.362).

10 Los polinucleótidos que codifican un polipéptido del codón 717 de la APP variante pueden incluir secuencias que faciliten la transcripción (secuencias de expresión) y la traducción de las secuencias codificantes, de tal forma que se produzca el producto polipeptídico codificado. La construcción de tales polinucleótidos es bien conocida en la técnica y se describe adicionalmente en Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. Por ejemplo, pero sin limitación, tales polinucleótidos pueden incluir un promotor, un sitio de terminación de la transcripción (sitio de poliadenilación en hospedadores de expresión eucariotas), un sitio de unión a ribosomas y, opcionalmente, un potenciador para uso en hospedadores de expresión eucariotas y, opcionalmente, secuencias necesarias para replicación de un vector.

20 E. coli es un hospedador procarionta útil particularmente para clonar las secuencias de ADN de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y diversas especies de Pseudomonas. En estos hospedadores procariontas, también se pueden realizar vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitio de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

25 Para la expresión también pueden usarse otros microbios, tales como levaduras. Saccharomyces es un hospedador preferido, teniendo los vectores adecuados secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfogliceratoquinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, cuando se desee.

30 Además de microorganismos, también pueden usarse cultivos de células de tejidos de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase Winnacker, "From Genes to Clones," VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Actualmente se prefieren células eucariotas, porque en la técnica se han desarrollado varias líneas de células hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas humanas intactas e incluyen las líneas de células CHO, diversas líneas de células COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, células Jurkat, etc. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al. (1986) Immuno. Rev. 89:49, y sitios de información del procesamiento necesario, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de ajuste de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Son secuencias de control de la expresión preferidas promotores derivados de genes de inmunoglobulinas, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino y similares. Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés (por ejemplo, polipéptidos que codifican un polipéptido APP variante) pueden transferirse a la célula hospedadora por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza transfección con cloruro cálcico para células procariontas, mientras que para otros hospedadores celulares puede usarse tratamiento con fosfato cálcico o electroporación. (Véase, en general, Maniatis, et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1982).

35 Como alternativa, puede usarse recombinación homóloga para insertar una secuencia mutante de APP en el genoma de un hospedador en un sitio específico, por ejemplo, en un locus APP del hospedador. En un tipo de recombinación homóloga, se reemplazan una o mas secuencias del hospedador; por ejemplo, se reemplaza un alelo de APP del hospedador (o porción del mismo) por un alelo de APP mutante (o porción del mismo). Además de tales métodos de reemplazo de genes, puede usarse recombinación homóloga para dirigir un alelo de APP mutante a un sitio específico distinto de un locus APP del hospedador. Puede usarse recombinación homóloga para producir animales no humanos transgénicos y/o células que incorporen alelos de APP mutante.

40 El método se presta fácilmente a la formulación de kits de ensayo que pueden utilizarse en diagnóstico. Tal kit comprendería un soporte compartimentalizado para recibir uno o mas recipientes, donde un primer recipiente puede contener sondas de ADN marcadas convenientemente. Otros recipientes pueden contener reactivos útiles en la localización de las sondas marcadas, tales como substratos enzimáticos. Otros recipientes pueden contener un enzima de restricción (tal como BclI), tampones y similares, junto con instrucciones para su uso.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención al ejemplo específico proporcionado.

EJEMPLO 1 - Detección de la mutación Val→Ile en el gen β -amiloide (APP)

5 Se examinó la segregación de AD y marcadores a lo largo del brazo largo del cromosoma 21 en una sola familia con enfermedad de Alzheimer confirmada por autopsia (véase la fig 1). Se disponía de muestras de ADN de un total de 6 individuos afectados y 33 individuos no afectados y con riesgo.

10 El gen APP en un miembro de la familia afectado se analizó por secuenciación directa por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores intrónicos (Gyllensten, U. en PCR Technology, Ed. Erlich, H.A., Stockton Press, 45-60, 1989; Yoshikai *et al.* (1990) *Gene* 87:257). (Fig. 2). Los cebadores se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante usando un Gene Assembler Plus (Farmacia LKB).

La PCR se realizó usando los siguientes cebadores intrónicos para amplificar el exón 17 del gen APP:

[A] 5'-CCTCATCCAAATGTCCCGTCATT-3' [SEC ID N°: 26] y

[B] 5'-GCCTAATTCTCTCATAGTCTTAATTCCCAC-3' [SEC ID N°: 27]

15 Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 10 minutos para la desnaturalización; después 35 ciclos de 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 3 minutos, 94°C durante 1,5 minutos; y un solo ciclo de 72°C durante 10 minutos. La reacción se realizó usando tris-HCl 10 mM pH 8,3, cloruro potásico 50 mM, gelatina al 0,01%, cloruro de magnesio 1,5 mM, una concentración 200 μ M de dNTP, 50 pmoles de cada cebador de PCR y una unidad de Taq polimerasa. El volumen de reacción final total fue de 25 μ l.

20 Después se realizó una segunda reacción de PCR con una concentración final de 50 pmol de cebador [A] y 0,5 pmol de cebador [B]. El producto de PCR se purificó en un microconcentrador centricon 100 (Amicon) y se usó directamente para la secuenciación con el kit SEQUENASE (versión 2.0, United States Biochemical Corp; la palabra SEQUENASE es una marca comercial) siguiendo el protocolo del fabricante.

Primero se secuenció el exón 17 porque codifica parte del péptido β -amiloide y es el sitio de la mutación (en APP693) que conduce a hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (HCHWA-D).

25 La secuenciación del exón 17 reveló una transición de C a T en el par de bases 2149, que producía un cambio de valina a isoleucina en el aminoácido 717 (fig 2 y fig 3).

Esta transición de C a T crea un sitio de restricción *Bcl*I que permite la detección dentro del producto de PCR (fig 4). Se realizaron digestiones con *Bcl*I a 50°C durante 2-4 horas, como se recomienda por el fabricante, y después se sometieron a electroforesis en agarosa al 3%.

30 La selección por PCR 100 individuos normales no relacionados y 14 casos (9 familias) de enfermedad familiar de inicio tardío no pudo demostrar esta sustitución. La selección de 11 casos (9 familias) de enfermedad familiar de inicio temprano reveló el sitio de restricción *Bcl*I en dos individuos afectados de una familia no relacionada. Los datos genéticos demuestran que los loci de la enfermedad están asociados a la mutación de sentido erróneo. Además, la incapacidad de detectar este polimorfismo en 200 cromosomas normales confirma la
35 opinión de que es una mutación patógena.

40 La sustitución de valina por isoleucina se produce dentro del dominio transmembrana a una distancia de dos restos del extremo C-terminal del péptido β -amiloide. El análisis informático predice que la sustitución hace que el dominio transmembrana sea más hidrófobo y, de esta forma, podría anclar la proteína más firmemente dentro de la membrana. La posición de la sustitución, a una distancia de 2 restos del extremo C del péptido β -amiloide, puede tener significado con respecto al origen del péptido depositado. Este hallazgo asocia la enfermedad de Alzheimer a HCHWA-D, una enfermedad en la que la deposición amiloide se debe a una mutación mas próxima al extremo N-terminal pero dentro del péptido β -amiloide (Levy *et al. loc. cit.*)

EJEMPLO 2 - Preparación de una línea celular que contiene un gen β -amiloide (APP) defectuoso

45 Se recogen 10 ml de sangre reciente de cada individuo que padece enfermedad de Alzheimer familiar. Se purifican los linfocitos a partir de la sangre en un gradiente de Percoll y se mezclan con virus de Epstein-Barr (EBV). Las células después se cultivan en placas con medio suplementado con un 10% de suero de ternero fetal, antibióticos, glutamina y ciclosporina A para destruir los linfocitos T. Los linfocitos B que se infectan por EBV se immortalizan y establecen una línea celular permanente derivada de las células B del paciente.

50 Se ha depositado una línea de células linfoblastoides, AC21, en la European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down.

EJEMPLO 3 - Detección de una mutación Val→Gly en el gen β-amiloide (APP)

Se identificó una genealogía, denominada F19 y mostrada en la fig 5, que tiene AD confirmada por autopsia con un inicio temprano de 59 ± 4 años observando que un alelo del marcador de repetición dinucleotídico de alto polimorfismo GT12 (D21S210), que está localizado cerca del gen APP, se co-segregaba con la enfermedad. El análisis de asociación proporcionó una puntuación máxima de lod entre el marcador y la enfermedad de 3,02 a una fracción de recombinación de cero, como muestra la siguiente tabla:

Theta	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Lod	3,02	2,97	2,75	2,47	1,86	1,22	0,6

Las puntuaciones de lod se calcularon con 7 clases de responsabilidad que modelaban penetrancias dependientes de la edad de 0,01 a 0,95 con una proporción de fenocopia de 0,001 y una frecuencia génica de 0,001 usando MLINK del paquete LINKAGE (Lathrop *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3443).

Se determinaron 17 secuencias de exones de APP en un miembro afectado y en un miembro no afectado de F19. En el miembro afectado, hubo una transición de G→T en la posición 2150, como puede verse en la fig. 6.

La amplificación del exón 17 se realizó como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior y Chartier-Harlin *et al.* (1991) *Neurosci. Letts.* **129**:134, con las siguientes modificaciones: (a) las secuencias de los cebadores de amplificación fueron:

ATA-ACC-TCA-TCC-AAA-TGT-CCC-C [SEQ ID N°: 28] y

GTA-ACC-CAA-GCA-TCA-TGG-AAG-C [SEQ ID N°: 29] y

(b) las condiciones de PCR fueron 94°C/10 minutos y después 35 ciclos de 60°C/1 minuto, 72°C/1 minuto, 94°C/1 minuto, seguido de 72°C/5 minutos.

Se usaron 50 pmol del segundo cebador para generar un producto monocatenario, que después se purificó (Chartier-Harlin *et al. loc. cit.*). El producto purificado se secuenció con el kit SEQUENASE (2.0) (Trade mark; USB) usando un cebador de secuencia:

AAA-TGA-AAT-TCT-TCT-AAT-TGC-G [SEQ ID N°: 30].

La presencia de la transición T→C crea artefactos de gel que se resolvieron por la inclusión de inosina (kit SEQUENASE) en la reacción de secuenciación.

La secuenciación directa de los exones 7 y 16 de individuos afectados de F19 (Chartier-Harlin *et al. loc. cit.*) demuestra que tenían una secuencia normal y SSCA (Orita *et al. loc. cit.*) y Orita *et al.* no pudieron identificar cambios en los exones 2, 3, 7, 9, 12, 13 o 15. La técnica SSCA del exón 17 detecta Val→Ile de APP693 (Levy, *et al. loc. cit.* y Hardy *et al.* (1991) *Lancet* **337**:1342-1343) y APP717 en condiciones de selección convencionales y, cuando se modifica APP717, Val→Gly.

EJEMPLO 4 - Producción de Animales Transgénicos con el Alelo de APP Mutante

Generación de las construcciones: El vector plink se construyó por clonación de un poliengarce entre los sitios PvuII y EcoRI de pBR322, de tal forma que el extremo HindIII del poliengarce fuera adyacente al sitio PvuII. La unión destruyó los sitios EcoRI y PvuII asociados con los segmentos de pBR322. El fragmento HpaI-EcoRI de 700 pb de pSV2neo (Southern y Berg (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327) que contiene la señal de poliadenilación de SV40 se clonó en los sitios HpaI-EcoRI de plink para generar pNotSV. El fragmento XhoI-PstI de 200 pb de pL2 que contenía el sitio de ajuste 16S/1gS de SV40 (Okayama y Berg (1983) *Mol. Cell Biol.* **3**:280) se aisló, los extremos se hicieron romos con Klenow, y después se clonó en el sitio HpaI de pNotSV para generar pSplice. El fragmento NruI-SpeI de 2,3 kb de pAPP695 que contenía la región codificante del ADNc para APP (Tanzi *et al.* (1987) *Science* **235**:880) se clonó en el sitio NruI-SpeI de pSplice para generar pd695. Se usó la misma estrategia para generar pd751 usando el ADNc para APP751 (Tanzi *et al.* (1988) *Nature* **331**:528). En los vectores pd695 y pd751 se han insertado diversos promotores usando el sitio único NruI o los sitios HindIII y NruI.

Generación de pshAPP695 & pshAPP751: La construcción pAmyproBam se generó por clonación del fragmento BamHI de 1,5 kb del ADNc de APP en el sitio BamHI de puc19 xHamy. El fragmento HindIII-Asp718 de 700 pb del pAmyproBam (similar al fragmento BamHI-Asp718 de 700 pb descrito en Salbaum *et al.* (1988) *EMBO* **7**:2807) se clonó en los sitios HindIII-Asp718 de pd695 y pd751 para producir pshAPP695 y pshAPP751.

pAPP695 y pAPP751: Los vectores pAPP695 y pAPP751 se generaron por una unión de 3 vías del fragmento EcoRI-XhoI de 3,0 kb de pAmyProBam, el fragmento XhoI-SpeI de 1,5 kb del ADNc de APP751, y el sitio SpeI-EcoRI de pd751.

Generación de pNSE751 (+47): El pNSE751 (+47) se construyó usando una unión de 3 vías del

fragmento HindIII-KpnI de pNSE6 (Forss-Petter *et al.* (1990) *Neuron* 5:187). El fragmento KpnI-BstYI de pNSE6 y un fragmento parcial BamHI (-47 nucleótidos con respecto al ATG)-HindIII de pAPP751. Esto ocasionó la generación de un fragmento KpnI que se clonó en los sitios KpnI de pNSE751 (+47). La fusión BstYI/Bam produce la pérdida de los dos sitios.

5 Generación de pNSE751: Este vector se generó usando un protocolo de PCR de dos etapas de 4 cebadores (Higuchi *et al.* (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:7351) que produjo una fusión directa del codón de iniciación de NSE a la región codificante de APP. Se usaron oligonucleótidos C2, 1072, 1073 y A2 (véanse las secuencias de nucleótidos, mas adelante) para generar el producto de PCR. El fragmento KpnI se generó por digestión con el enzima de restricción. El fragmento KpnI se usó para reemplazar un fragmento similar en pNSE751 (+47).

10 Generación de pNSE751-Hardy y pNSE751-Dutch: Las mutaciones Hardy (APP642 Val→Ile de APP695) y Dutch (APP618 Gln→Glu de APP695) se introdujeron usando un protocolo de dos PCR de cuatro cebadores. Las dos series de reacciones usaron los mismos "cebadores exteriores", conteniendo los "cebadores interiores" las mutaciones apropiadas. Esto tuvo como resultado la generación de un fragmento BglII-SpeI después de la digestión, que contenía la mutación Dutch o Hardy. El fragmento BglII-SpeI de pNSE751 se reemplazó por el fragmento mutado para generar el vector apropiado. La presencia de la mutación se confirmó por análisis de secuencia de los vectores.

15 Generación de pNSE751-Hardy y pNSE751-Dutch: Las mutaciones Hardy VI (APP642 V a I), y Hardy VG (APP642 V a G), y Dutch (APP618 E a Q) se introdujeron usando el protocolo de PCR de dos etapas de 4 cebadores (Higuchi *et al.* (1988)). El mutante Hardy VI se generó usando cebadores 117/738, 922, 923 y 785; el mutante Hardy VG se generó usando los cebadores 117/738, 1105, 1106 y 785; el mutante Dutch se generó usando los cebadores 117/738, 1010, 1011 y 785. En todas estas mutaciones, el fragmento BglII-SpeI de 700 pb se aisló por digestión del producto de PCR con enzimas de restricción, y después se clonó en los mismos sitios de pNSE751. Las mutaciones se confirmaron por análisis de secuencia.

20 Generación de pNFH751: El gen NFH humano (Lees *et al.* (1988) *EMBO* 7(7):1947) se aisló a partir de una biblioteca genómica usando un ADNc de NFH de rata como sonda (Lieberburg *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acids. Res. USA* 86:2463). Se subclonó un fragmento SstI en el vector pSK. Se generó un par de cebadores de PCR para poner un sitio NruI en el extremo 3' del fragmento amplificado de 150 pb inmediatamente cadena arriba del codón de iniciación del gen NFH. El extremo 5' contiene un sitio KpnI a 150 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación. La construcción final de pNFH751 se generó por una unión de 3 vías del fragmento HindIII-KpnI de 5,5 b de pNFH8.8, el fragmento KpnI-NruI generado por PRC y el fragmento HindIII-NruI de pd751. La secuencia que rodeaba a la fusión generada por PCR en el codón de iniciación se confirmó por análisis de secuencia. Las variantes Dutch y Hardy de pNFH751 se generaron por sustitución del fragmento BglII-SpeI de 600 pb desde un vector mutado con la secuencia confirmada para el mismo fragmento de pNFH751. La presencia de la mutación se confirmó por hibridación con el oligómero mutado o por análisis de la secuencia.

25 Generación de pThy751: El vector pThy751 se generó por una unión de 3 vías. El fragmento Hind III-Bam HI de pThy8.2 que se aisló a partir de una biblioteca genómica humana (Chang *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3819), el fragmento sintético ThyAPP, y el fragmento HindIII-NruI de pd751.

ThyAPP:

CAGACTGAGATCCCAGAACCCTAGGTCTGACTCTAGGGTCTTGG [SEC ID N°: 31]

30 Generación de pThyC100: Esta construcción pThyC100 se generó por una unión de tres vías. El fragmento HindIII-BamHI de 3,6 kb de pThy8.2, el fragmento sintético ThyAPP2, y el fragmento HindIII-BglII de pd751 o pNSE751 Dutch o pNSE751 Hardy se unieron para producir PThyC100.

ThyAPP2:

CAGACTGAGATCCCAGAACCGATCCTAGGTCTGACTCTAGGGTCTTGG [SEC ID N°: 32]

35 La región alrededor del codón de iniciación se confirmó por análisis de la secuencia.

Preparación de ADN para inyección: El transgen para inyección se aisló a partir del vector correspondiente de interés para la digestión con NotI y electroforesis en gel. El transgen se purificó usando el kit Gene Clean (Bio101), y después se purificó adicionalmente en un Elutip o se purificó por HPCL en una columna Nucleogen 4000.

40 Microinyección: El transgen se inyectó a 2-20 mcg/ml en el pronúcleo mas conveniente (normalmente el pronúcleo masculino) de embriones de una célula FBV o B6D2F2 (Manipulating the Mouse Embryo, B. Hogan, F. Constantini, E. Lacy, *Cold Spring Harbor*, 1986). Los embriones inyectados se cultivaron durante una noche. Se implantaron embriones que se dividieron hasta la fase de 2 células en ratones CD1 hembra pseudopreñadas. Los ratones se destetaron a aproximadamente 21 días. Se obtuvieron muestras de ADN a partir de biopsias de la cola y se analizaron por transferencia de Southern usando una sonda específica del transgen (normalmente la secuencia señal de poliadenilación y de ajuste 3' de SV40). Se identificaron los ratones transgénicos que llevaban al menos

una copia del transgen.

Uso de ratones transgénicos: Puede usarse un ratón que exprese el gen hAPP o sus variantes para ensayar la patogénesis de la deposición amiloide y la intervención terapéutica diseñada para modular la deposición amiloide.

- 5 El análisis bioquímico de los ratones transgénicos revela posibles intermedios en el catabolismo de APP que son precursores probables de la proteína beta-amiloide. Este análisis puede realizarse en el animal o en cultivos de tejido primarios de las células de expresión.

- 10 El animal puede usarse para ensayar agentes terapéuticos potenciales. El grupo de ensayo de ratones se trata con el compuesto de ensayo administrado de una forma apropiada para un periodo establecido. Al final del periodo de ensayo, se evalúa el comportamiento de los animales, su bioquímica y su histología para detectar cualquier posible efecto del compuesto de ensayo. El protocolo exacto depende del mecanismo previsto de acción del compuesto de ensayo. Usando esta estrategia pueden identificarse compuestos que pueden tener utilidad en el tratamiento de la AD.

15 LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: Imperial College of Science, Technology & Medicine (no US)
- (B) CALLE: Sherfield Building, Exhibition Road,
- 20 (C) CIUDAD: Londres
- (E) PAÍS: GB
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): SW7 2AZ
- (A) NOMBRE: HARDY, John Anthony (sólo US)
- (B) CALLE: 187 Drakefell Road
- 25 (C) CIUDAD: Londres
- (E) PAÍS: GB
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): SE4
- (A) NOMBRE: GOATE, Alison Mary (sólo US)
- (B) CALLE: 100 High Street, Hampton Wick,
- 30 (C) CIUDAD: Kingston-on-Thames
- (D) ESTADO: Surrey
- (E) PAÍS: GB
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): KT1 4DQ
- (A) NOMBRE: MULLAN, Michael John (sólo US)
- 35 (B) CALLE: Suncoast Gerontology Ctr, 12901 Bruce B. Downs Blvd. MDC 50,
- (C) CIUDAD: Tampa
- (D) ESTADO: Florida
- (E) PAÍS: US
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 33612
- 40 (A) NOMBRE: CHARTIER-HARLIN, Marie-Christine (sólo US)
- (B) CALLE: 63 Francis Road

- 5
- (C) CIUDAD: Londres
 - (E) PAÍS: GB
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): E10 6PN
 - (A) NOMBRE: OWEN, Michael John (solo US)
 - (B) CALLE: Four Hedges, Castlehill, Llanblethian,
 - (C) CIUDAD: Cowbridge
 - (D) ESTADO: South Glamorgan
 - (E) PAÍS: GB
- 10
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Ensayo y Modelo para la Enfermedad de Alzheimer
 - (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 44
 - (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR: No aplicable
 - (v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
 - NÚMERO DE SOLICITUD: WO PCT/GB92/_____
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1:
- 15
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 695 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 20
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

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

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480
 Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540
 Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685
 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 690 695

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 751 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

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

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300
 Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320
 Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335
 Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Ile Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr
 340 345 350
 Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu
 355 360 365
 His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg
 370 375 380
 Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln
 385 390 395 400
 Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe
 405 410 415
 Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln
 420 425 430
 Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp
 435 440 445
 Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val
 450 455 460
 Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg
 465 470 475 480
 Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val
 485 490 495
 Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met
 500 505 510
 Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu
 515 520 525

Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp
 530 535 540
 Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn
 545 550 555 560
 Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro
 565 570 575
 Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly
 580 585 590
 Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp
 595 600 605
 Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg
 610 615 620
 Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr
 625 630 635 640
 Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe
 645 650 655
 Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 660 665 670
 Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
 675 680 685
 Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu
 690 695 700
 Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp
 705 710 715 720
 Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn
 725 730 735
 Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 740 745 750

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 770 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:

5

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

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540
 Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575
 Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590
 Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605
 Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620
 Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640
 Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655
 Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685
 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700
 Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
 725 730 735
 Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 740 745 750
 Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765
 Gln Asn
 770

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2088 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

ATGCTGCCCC	GTTTGGCACT	GCTCCTGCTG	GCCGCCTGGA	CGGCTCGGGC	GCTGGAGGTA	60
CCCACTGATG	GTAATGCTGG	CCTGCTGGCT	GAACCCCA	TTGCCATGTT	CTGTGGCAGA	120
CTGAACATGC	ACATGAATGT	CCAGAATGGG	AAGTGGGATT	CAGATCCATC	AGGGACCAAA	180
ACCTGCATTG	ATACCAAGGA	AGGCATCCTG	CAGTATTGCC	AAGAAGTCTA	CCCTGAACTG	240
CAGATCACCA	ATGTGGTAGA	AGCCAACCAA	CCAGTGACCA	TCCAGAACTG	GTGCAAGCGG	300
GGCCGCAAGC	AGTGCAAGAC	CCATCCCCAC	PTTGTGATTC	CCTACCGCTG	CTTAGTTGGT	360
GAGTTTGTAA	GTGATGCCCT	TCTCGTTCCT	GACAAGTGCA	AATTCTTACA	CCAGGAGAGG	420
ATGGATGTTT	GCGAAACTCA	TCTTCACTGG	CACACCGTCG	CCAAAGAGAC	ATGCAGTGAG	480
AAGAGTACCA	ACTTGCATGA	CTACGGCATG	TTGCTGCCCT	GCGGAATTGA	CAAGTTCCGA	540
GGGGTAGAGT	TTGTGTGTTG	CCCACTGGCT	GAAGAAAGTG	ACAATGTGGA	TTCTGCTGAT	600
GCGGAGGAGG	ATGACTCGGA	TGTCTGGTGG	GGCGGAGCAG	ACACAGACTA	TGCAGATGGG	660
AGTGAAGACA	AAGTAGTAGA	AGTAGCAGAG	GAGGAAGAAG	TGGCTGAGGT	GGAAGAAGAA	720
GAAGCCGATG	ATGACGAGGA	CGATGAGGAT	GGTGATGAGG	TAGAGGAAGA	GGCTGAGGAA	780
CCCTACGAAG	AAGCCACAGA	GAGAACCACC	AGCATTGCCA	CCACCACCAC	CACCACCACA	840
GAGTCTGTGG	AAGAGGTGGT	TCGAGTTCCT	ACAACAGCAG	CCAGTACCCC	TGATGCCGTT	900
GACAAGTATC	TCGAGACACC	TGGGGATGAG	AATGAACATG	CCCATTTCCA	GAAAGCCAAA	960
GAGAGGCTTG	AGGCCAAGCA	CCGAGAGAGA	ATGTCCCAGG	TCATGAGAGA	ATGGGAAGAG	1020
GCAGAACGTC	AAGCAAAGAA	CTTGCCTAAA	GCTGATAAGA	AGGCAGTTAT	CCAGCATTTT	1080
CAGGAGAAAG	TGGAATCTTT	GGAACAGGAA	GCAGCCAACG	AGAGACAGCA	GCTGGTGGAG	1140
ACACACATGG	CCAGAGTGGA	AGCCATGCTC	AATGACCGCC	GCCGCCTGGC	CCTGGAGAAC	1200
TACATCACCG	CTCTGCAGGC	TGTTCTCCTC	CGGCCTCGTC	ACGTGTTCAA	TATGCTAAAG	1260

AAGTATGTCC	GCGCAGAACA	GAAGGACAGA	CAGCACACCC	TAAAGCATTT	CGAGCATGTG	1320
CGCATGGTGG	ATCCCAAGAA	AGCCGCTCAG	ATCCGGTCCC	AGGTTATGAC	ACACCTCCGT	1380
GTGATTTATG	AGCGCATGAA	TCAGTCTCTC	TCCCTGCTCT	ACAACGTGCC	TGCAGTGGCC	1440
GAGGAGATTC	AGGATGAAGT	TGATGAGCTG	CTTCAGAAAG	AGCAAACTA	TTCAGATGAC	1500
GTCTTGGCCA	ACATGATTAG	TGAACCAAGG	ATCAGTTACG	GAAACGATGC	TCTCATGCCA	1560
TCTTTGACCG	AAACGAAAAC	CACCGTGGAG	CTCCTTCCCG	TGAATGGAGA	GTTTCAGCCTG	1620
GACGATCTCC	AGCCGTGGCA	TTCTTTTGGG	GCTGACTCTG	TGCCAGCCAA	CACAGAAAAC	1680
GAAGTTGAGC	CTGTTGATGC	CCGCCCTGCT	GCCGACCGAG	GACTGACCAC	TCGACCAGGT	1740
TCTGGGTTGA	CAAATATCAA	GACGGAGGAG	ATCTCTGAAG	TGAAGATGGA	TGCAGAATTC	1800
CGACATGACT	CAGGATATGA	AGTTCATCAT	CAAAAATTGG	TGTTCTTTGC	AGAAGATGTG	1860
GGTTCAAACA	AAGGTGCAAT	CATTGGAATC	ATGGTGGGCG	GTGTTGTCAT	AGCGACAGTG	1920
ATCGTCATCA	CCTTGGTGAT	GCTGAAGAAG	AAACAGTACA	CATCCATTCA	TCATGGTGTG	1980
GTGGAGGTTG	ACGCCGCTGT	CACCCAGAG	GAGCGCCACC	TGTCCAAGAT	GCAGCAGAAC	2040
GGCTACGAAA	ATCCAACCTA	CAAGTTCTTT	GAGCAGATGC	AGAACTAG		2088

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2265 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:

5

ATGCTGCCCG	GTTTGGCACT	GCTCCTGCTG	GCCGCCTGGA	CGGCTCGGGC	GCTGGAGGTA	60
CCCCTGATG	GTAATGCTGG	CCTGCTGGCT	GAACCCAGAG	TTGCCATGTT	CTGTGGCAGA	120
CTGAACATGC	ACATGAATGT	CCAGAATGGG	AAGTGGGATT	CAGATCCATC	AGGGACCAAA	180
ACCTGCATTG	ATACCAAGGA	AGGCATCCTG	CAGTATTGCC	AAGAAGTCTA	CCCTGAACTG	240
CAGATCACCA	ATGTGGTAGA	AGCCAACCAA	CCAGTGACCA	TCCAGAACTG	GTGCAAGCGG	300
GGCCGCAAGC	AGTGCAAGAC	CCATCCCCAC	TTTGTGATTC	CCTACCGCTG	CTTAGTTGGT	360
GAGTTTGTA	GTGTGCCCT	TCTCGTTCCT	GACAAGTGCA	AATTCTTACA	CCAGGAGAGG	420
ATGGATGTTT	GCGAAACTCA	TCTTCACTGG	CACACCGTCG	CCAAAGAGAC	ATGCAGTGAG	480
AAGAGTACCA	ACTTGCATGA	CTACGGCATG	TTGCTGCCCT	GCGGAATTGA	CAAGTTCGGA	540
GGGGTAGAGT	TTGTGTGTG	CCCCTGGCT	GAAGAAAGTG	ACAATGTGGA	TTCTGCTGAT	600
GCGGAGGAGG	ATGACTCGGA	TGTCTGGTGG	GGCGGAGCAG	ACACAGACTA	TGCAGATGGG	660
AGTGAAGACA	AAGTAGTAGA	AGTAGCAGAG	GAGGAAGAAG	TGGCTGAGGT	GGAAGAAGAA	720
GAAGCCGATG	ATGACCAGGA	CGATGAGGAT	GGTGATGAGG	TAGAGGAAGA	GGCTGAGGAA	780
CCCTACGAAG	AAGCCACAGA	GAGAACCACC	AGCATTGCCA	CCACCACCAC	CACCACCACA	840
GAGTCTGTGG	AAGAGGTGGT	TCGAGAGGTG	TGCTCTGAAC	AAGCCGAGAG	GGGGCCGTGC	900
CGAGCAATGA	TCTCCCGCTG	GTACTTTGAT	GTGACTGAAG	GGAAGTGTGC	CCCATTCTTT	960
TACGGCCGAT	GTGGCGGCAA	CCGGAACAAC	CGGAACAAC	TTGACACAGA	AGAGTACTGC	1020
ATGGCCGTGT	GTGGCAGCGC	CATTCCTACA	ACAGCAGCCA	GTACCCCTGA	TGCCGTTGAC	1080
AAGTATCTCG	AGACACCTGG	GGATGAGAAT	GAACATGCCC	ATTTCCAGAA	AGCCAAAGAG	1140
AGGCTTGAGG	CCAAGCACCG	AGAGAGAATG	TCCCAGGTCA	TGAGAGAATG	GGAAGAGGCA	1200
GAACGTCAAG	CAAAGAACTT	GCCTAAAGCT	GATAAGAAGG	CAGTTATCCA	GCATTTCCAG	1260

GAGAAAGTGG AATCTTTGGA ACAGGAAGCA GCCAACGAGA GACAGCAGCT GGTGGAGACA 1320
CACATGGCCA GAGTGAAGC CATGCTCAAT GACCGCCGCC GCCTGGCCCT GGAGAACTAC 1380
ATCACCGCTC TGCAGGCTGT TCCTCCTCGG CCTCGTCACG TGTTCAATAT GCTAAAGAAG 1440
TATGTCCGCG CAGAACAGAA GGACAGACAG CACACCCTAA AGCATTTCGA GCATGTGCGC 1500
ATGGTGGATC CCAAGAAAGC CGCTCAGATC CGGTCCCAGG TTATGACACA CCTCCGTGTG 1560
ATTTATGAGC GCATGAATCA GTCTCTCTCC CTGCTCTACA ACGTGCCTGC AGTGCCGAG 1620
GAGATTCAGG ATGAAGTTGA TGAGCTGCTT CAGAAAGAGC AAAACTATT CAGATGACGTC 1680
TTGGCCAACA TGATTAGTGA ACCAAGGATC AGTTACGGAA ACGATGCTCT CATGCCATCT 1740
TTGACCGAAA CGAAAACCAC CGTGGAGCTC CTTCCCCTGA ATGGAGAGTT CAGCCTGGAC 1800
GATCTCCAGC CGTGGCATTC TTTTGGGGCT GACTCTGTGC CAGCCAACAC AGAAAACGAA 1860
GTTGAGCCTG TTGATGCCCG CCCTGCTGCC GACCGAGGAC TGACCACTCG ACCAGGTTCT 1920
GGGTTGACAA ATATCAAGAC GGAGGAGATC TCTGAAGTGA AGATGGATGC AGAATTCCGA 1980
CATGACTCAG GATATGAAGT TCATCATCAA AAATTGGTGT TCTTTCAGA AGATGTGGGT 2040
TCAAACAAAG GTGCAATCAT TGGACTCATG GTGGGCGGTG TTGTCATAGC GACAGTGATC 2100
GTCATCACCT TGGTGATGCT GAAGAAGAAA CAGTACACAT CCATTCATCA TGGTGTGGTG 2160
GAGGTTGACG CCGCTGTCAC CCCAGAGGAG CGCCACCTGT CCAAGATGCA GCAGAACGGC 2220
TACGAAAATC CAACCTACAA GTTCTTTGAG CAGATGCAGA ACTAG 2265

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:

Ile Ala Thr Val Ile Xaa Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:

Ile Ala Thr Val Ile Gly Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:

Ile Ala Thr Val Ile Met Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9:

Ile Ala Thr Val Ile Ala Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:

Ile Ala Thr Val Ile Ser Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:

Ile Ala Thr Val Ile Ile Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12:

Ile Ala Thr Val Ile Leu Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13:

Ile Ala Thr Val Ile Thr Ile Thr Leu
1 5

- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14:

Ile Ala Thr Val Ile Pro Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15:

Ile Ala Thr Val Ile His Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16:

Ile Ala Thr Val Ile Cys Ile Thr Leu
1 5

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17:

Ile Ala Thr Val Ile Tyr Ile Thr Leu
1 5

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 18:

- 5
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18:

Ile Ala Thr Val Ile Phe Ile Thr Leu
1 5

- 10
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19:
- 15

Ile Ala Thr Val Ile Glu Ile Thr Leu
1 5

- 20
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 20:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 20:
- 25

Ile Ala Thr Val Ile Trp Ile Thr Leu
1 5

- 30
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 21:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 21:

Ile Ala Thr Val Ile Arg Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 22:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 22:

Ile Ala Thr Val Ile Asp Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 23:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 23:

Ile Ala Thr Val Ile Asn Ile Thr Leu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 24:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 24:

Ile Ala Thr Val Ile Lys Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 25:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 25:

Ile Ala Thr Val Ile Gln Ile Thr Leu
1 5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 26:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 26:

CCTCATCAA ATGTCCCCGT CATT

24

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 27:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 27:

GCCTAATTCT CTCATAGTCT TAATTCCCAC

30

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 28:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico

- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 28:

ATAACCTCAT CCAAATGTCC CC

22

5

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 29:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 29:

10

GTAACCCAAG CATCATGGAA GC

22

15

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 30:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 22 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 30:

20

AAATGAAATT CTTCTAATTG CG

22

25

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 31:
 - (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 44 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 31:

30

CAGACTGAGA TCCCAGAACC CTAGGTCTGA CTCTAGGGTC TTGG

44

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 32:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 48 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (Cebador)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 32:
- CAGACTGAGA TCCCAGAACC GATCCTAGGT CTGACTCTAG GGTCTTGG** **48**
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 33:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 33:
- CGACCAGGTT GTGGGTTGAC AAATA** **25**
- 20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 34:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 29 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 34:
- AATCTATTCA TGCACTAGTT TGATACAGC** **29**
- 30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 35:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 35:

ACAGTGATCA TCATCACCTT G

21

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 36:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 36:

5

CAAGGTGATG ATGATCACTG T

21

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 37:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 28 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 37:

10

15

AGCGACAGTG ATCGGCATCA CCTTGGTG

28

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 38:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 28 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 38:

20

25

CACCCAGGTG ATGCCGATCA CTGTCGCT

28

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 39:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla

30

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 39:

ACCCACATCT TGTGCAAAGA ACAC

24

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 40:

GTGTTCTTTG CACAAGATGT GGGT

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 41:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 41:

CCCAGCCATC ATGCTGCCCCG GGTGGC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 42:

GCCAACCCGG GCAGCATGAT GACTGGGATC TC

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 43:
ACCTGCCACT ATACTGGAAT A **21**
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 44:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 44:
 15 **TGTGCATGTT CAGTCTGCCA C** **21**

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un proceso para preparar un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP) humana mutante que se cosegrega con una predisposición genética a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, comprendiendo el proceso el acoplamiento de sucesivos nucleótidos entre sí, donde el alelo de APP mutante tiene una substitución de aminoácidos en la posición codificada por el codón 717 definido en relación con APP770, comprendiendo el proceso el acoplamiento de nucleótidos sucesivos entre sí.
- 2.- Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la APP es APP770.
- 3.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el aminoácido en la posición codificada por el codón 717 es una isoleucina.
- 10 4.- Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la secuencia de ácido nucleico es un ADNc.
- 15 5.- Un proceso para preparar una sonda polinucleotídica capaz de hibridar específicamente con un alelo de la proteína precursora de amiloide 770 (APP770) que presenta una mutación en el codón 717, de tal forma que puede identificarse una banda correspondiente al alelo de APP 770 en una transferencia de Southern, mientras que no puede identificarse un alelo de tipo silvestre correspondiente o puede discriminarse del alelo de APP770 basándose en la intensidad de la señal, comprendiendo el proceso el acoplamiento de sucesivos nucleótidos entre sí.
- 20 6.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el codón 717 del alelo mutante codifica una isoleucina.
- 7.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, donde la sonda está marcada.
- 25 8.- Un hospedador transgénico que comprende un polinucleótido recombinante que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP) humana mutante que se cosegrega con una predisposición genética a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, sin que el hospedador sea un ser humano, donde el alelo de APP mutante tiene una substitución de aminoácidos en la posición codificada por el codón 717 como se define en relación con APP770 y donde, cuando el huésped es un animal el huésped es un ratón.
- 9.- Un hospedador de acuerdo con la reivindicación 8, donde el aminoácido en la posición codificada por el codón 717 es una isoleucina.
- 30 10.- Un hospedador de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que es una línea celular eucariota primaria o inmortalizada.
- 11.- Un hospedador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el alelo mutante APP es APP770.
- 35 12.- Uso de un animal transgénico no humano que comprende un gen de APP mutante como modelo para la enfermedad de Alzheimer, donde el gen APP mutante tiene un codón 717 mutante.
- 13.- Una célula primaria o inmortalizada humana cultivada, que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica un mutante de la posición 717 de la proteína precursora de amiloide (APP770) humana o una isoforma de APP que tiene la mutación.
- 40 14.- Un método para seleccionar un agente capaz de tratar la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, que comprende:
poner en contacto un hospedador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 con el agente; y controlar la expresión o procesar las proteínas codificadas por el gen mutante.
- 45 15.- Un método para detectar la presencia, en un ácido nucleico u otra muestra extraída de un sujeto, del gen para la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, que comprende identificar una alteración genética en una secuencia génica que codifica la proteína precursora de amiloide (APP), donde la alteración genética es una mutación en el codón 717.
- 16.- Un método de acuerdo con la reivindicación 15, donde el aminoácido en la posición codificada por el codón 717 es una isoleucina.
- 17.- Un método de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde el APP es APP770.
- 18.- Un método de diagnóstico para determinar una predisposición heredada a la enfermedad de

Alzheimer de inicio temprano en un sujeto, que comprende detectar en el sujeto la presencia de un alelo de la proteína precursora de amiloide (APP), donde dicho alelo tiene un polimorfismo de secuencia en una posición correspondiente al codón 717 de APP770, realizándose la etapa de detección sobre el material extraído y no devuelto al cuerpo del sujeto.

5 19.- Un método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el polimorfismo de secuencia es una sustitución de nucleótidos, donde en el codón 717 de APP770 está substituida una isoleucina.

20.- Un método de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, donde el polimorfismo de secuencia es una sustitución de un solo nucleótido.

10 21.- Un método de acuerdo con la reivindicación 18, 19 o 20, donde la etapa de detección comprende secuenciar un segmento de ADN genómico del cromosoma 21 del sujeto, que codifica dicho alelo.

15 22.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde la etapa de detección comprende (i) mezclar una muestra de ácido nucleico del sujeto con una o mas sondas polinucleotídicas capaces de hibridar selectivamente con un alelo del gen APP en una reacción tal que puede identificarse una banda correspondiente al alelo de APP770 en una transferencia de Southern, mientras que no puede identificarse un alelo de tipo silvestre correspondiente o puede distinguirse del alelo de APP770 basándose en la intensidad de la señal, y (ii) controlar la reacción para determinar la presencia del alelo del gen en la muestra, indicando de esta manera si el sujeto tiene riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer.

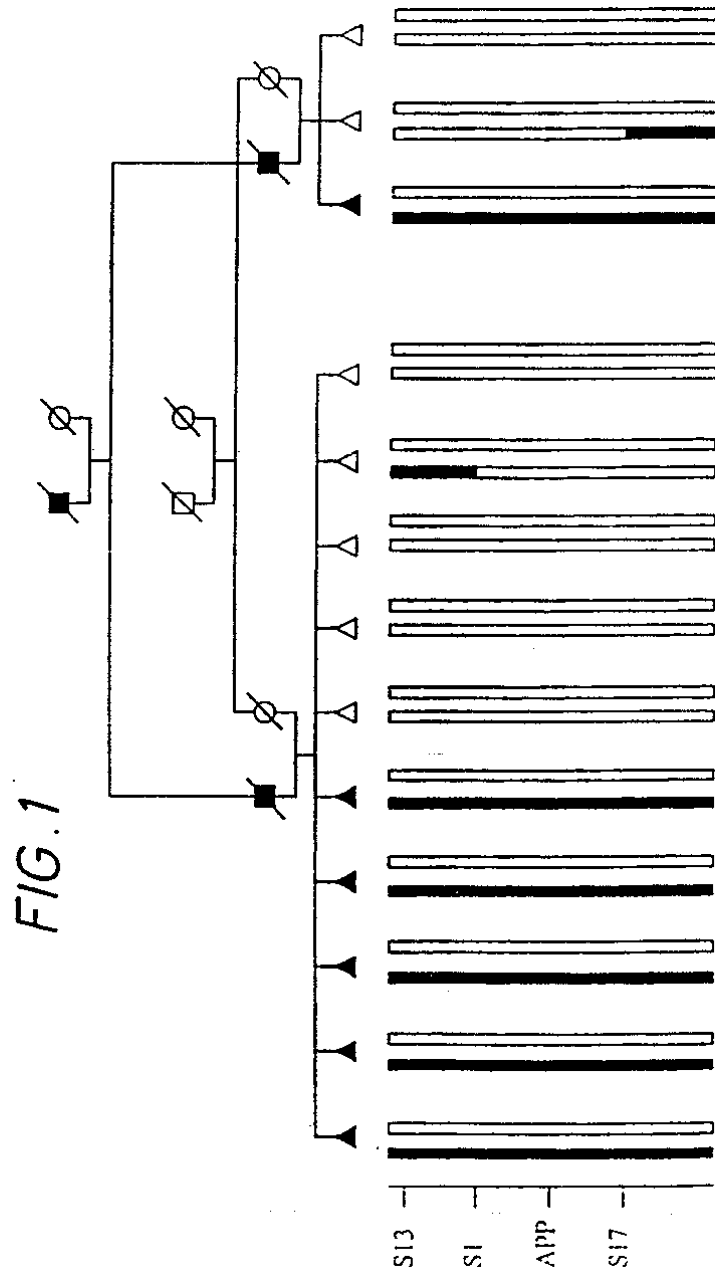
20 23.- Un método para el análisis genético de un ser humano que comprende detectar la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo en el codón 717 de un gen APP770 de un gen de la proteína precursora de amiloide (APP) en el sujeto, realizándose la etapa de detección sobre un material extraído y no devuelto al cuerpo del sujeto.

24.- Un proceso para preparar una composición que comprende un polipéptido sin proteínas humanas, comprendiendo el polipéptido una secuencia de núcleo:

Ile-Ala-Thr-Val-Ile-X-Ile-Thr-Leu- [SEC ID N°: 6]

25 donde X es cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales excepto valina, comprendiendo el proceso el acoplamiento de aminoácidos sucesivos entre sí.

Siguen 29 páginas de dibujos



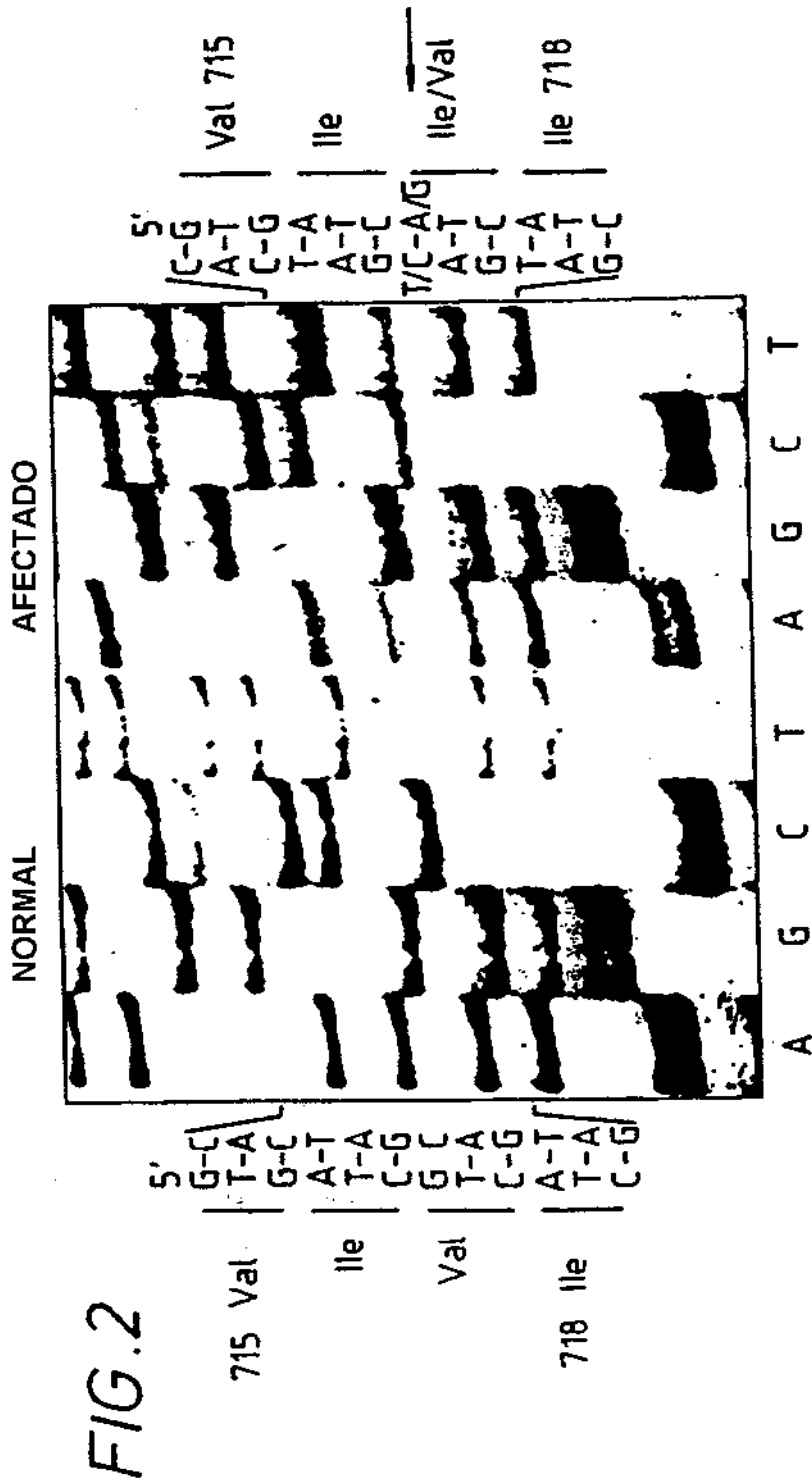


FIG. 3

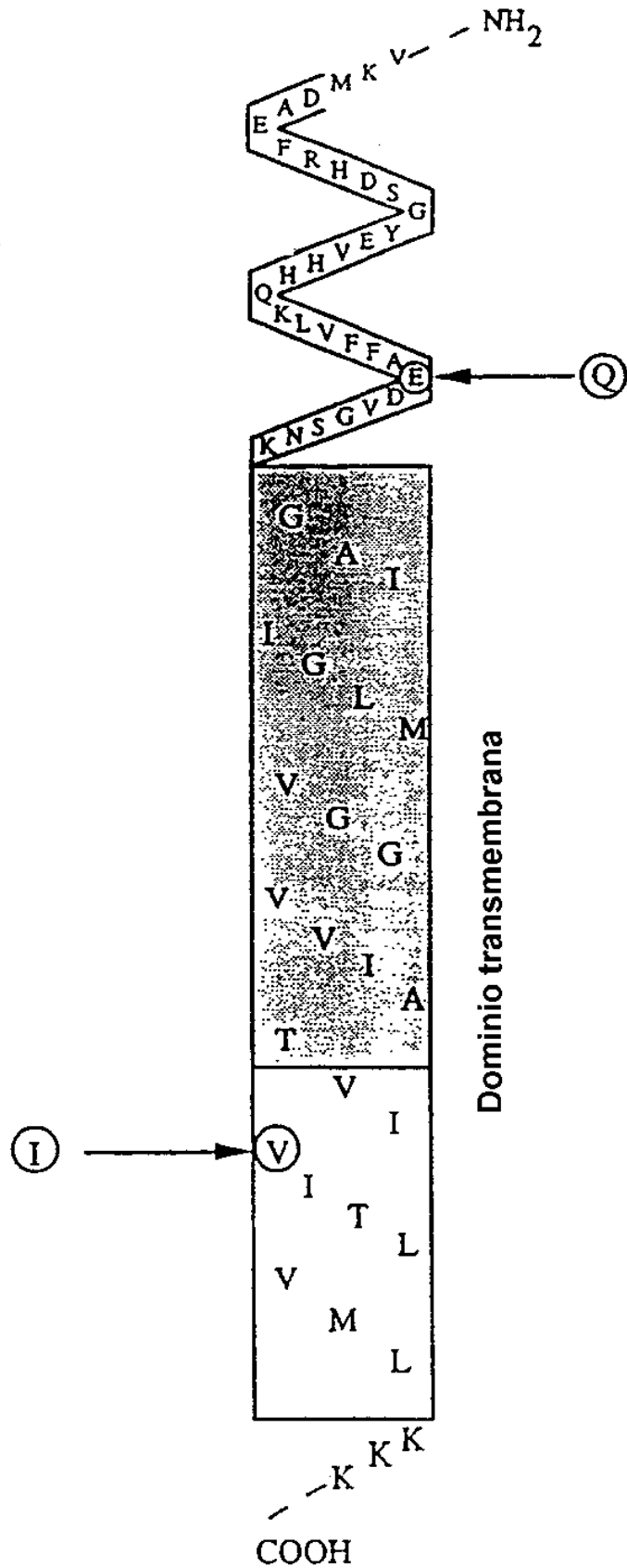


FIG 4

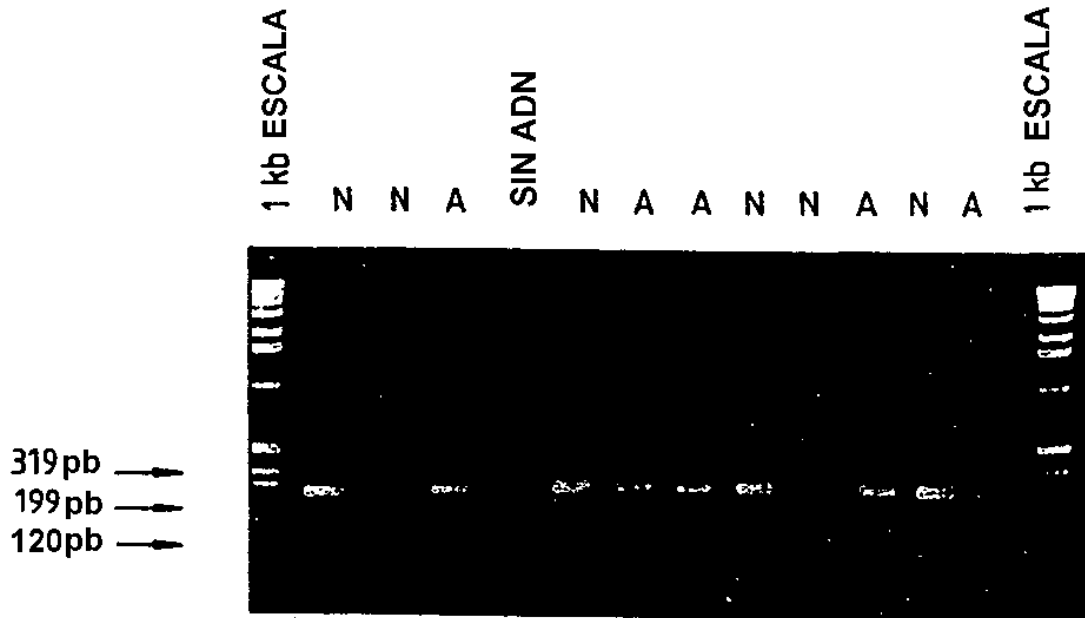


FIG. 5

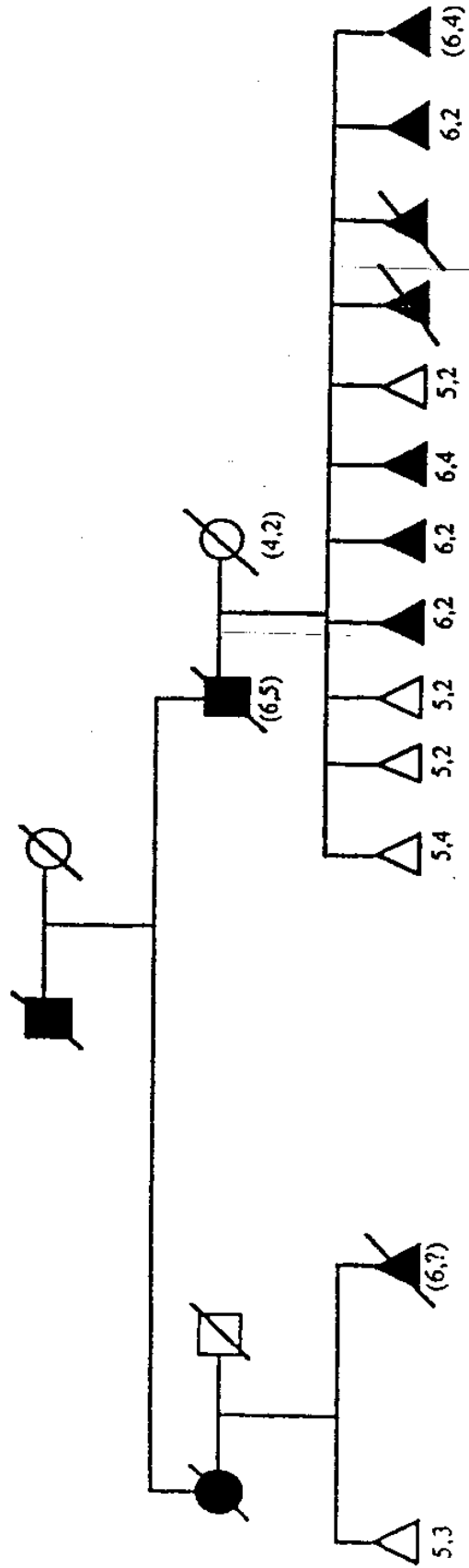


FIG. 6

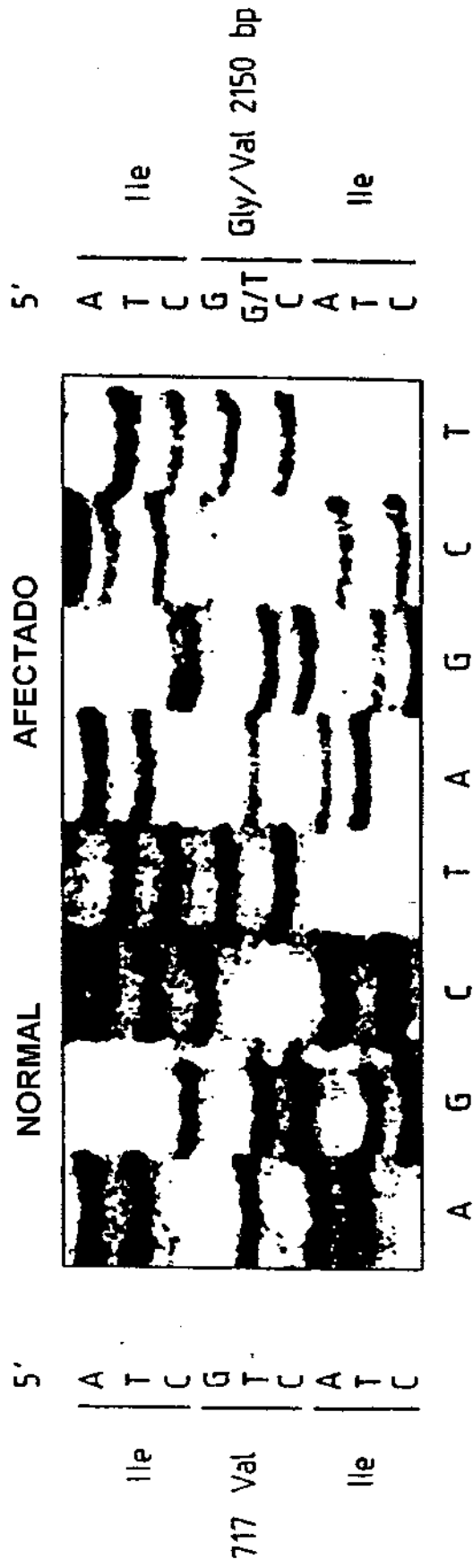


FIG. 7 (1/7)

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

FIG. 7 (2/7)

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

FIG. 7 (317)

Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys
210						215					220				
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu
225					230					235					240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu
					245				250						255
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile
					260				265						270
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg
					275			280				285			
Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu
290							295				300				

FIG. 7 (4/7)

Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys	320
305	310
Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg	335
325	330
Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp	350
340	345
Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu	365
355	360
Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala	380
370	375
Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn	400
385	390
	395

FIG. 7 (5/7)

Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe
				405					410					415	
Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His
			420					425					430		
Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala
			435				440					445			
Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu
		450				455					460				
Arg	Met	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala
					470					475					480
Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn
					485					490					495

FIG. 7 (6/7)

Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Arg Ile Ser	500	505	510
Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr	515	520	525
Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln	530	535	540
Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn	545	550	555
Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr	565	570	575
Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser	580	585	590

FIG. 7 (717)

Glu Val	Lys Met	Ala Glu	Phe Arg	His Asp	Ser Gly	Tyr Glu	Val
	595		600		605		
His His	Gln Lys	Leu Val	Phe Phe	Ala Glu	Asp Val	Gly Ser	Asn Lys
610		615			620		
Gly Ala	Ile Ile	Gly Leu	Met Val	Gly Gly	Val Val	Ile Ala	Thr Val
625		630			635		640
Ile Val	Ile Thr	Leu Val	Met Leu	Lys Lys	Gln Tyr	Thr Ser	Ile
	645			650			655
His His	Gly Val	Glu Val	Asp Ala	Ala Val	Thr Pro	Glu Glu	Arg
	660		665			670	
His Leu	Ser Lys	Met Gln	Gln Asn	Gly Tyr	Glu Asn	Pro Thr	Tyr Lys
	675		680			685	
Phe Phe	Glu Gln	Met Gln	Asn				
690			695				

FIG. 8(1/8)

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

FIG. 8(2/8)

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

FIG. 8(3/8)

Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys
	210					215					220				
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu
225					230					235					240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu
										250					255
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile
										265					270
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg
											280				285
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile
	290										295				300

FIG. 8 (4/8)

Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe
305					310					315					320
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr
				325					330						335
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Ile	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr
			340					345						350	
Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asn	Glu
		355				360						365			
His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Lys	His	Arg
					375						380				
Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Gln
385					390					395					400

FIG. 8 (5/8)

Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	His	Phe	
				405				410					415		
Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln
			420				425						430		
Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met	Leu	Asn	Asp
			435				440						445		
Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val
			450				455					460			
Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg
					470					475					480
Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val
				485					490					495	

 FIG. 8 (6/8)

Arg Met Val Asp	Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	Gln Val Met
500	505	510
Thr His Leu Arg	Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	Leu Ser Leu
515	520	525
Leu Tyr Asn Val	Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	Glu Val Asp
530	535	540
Glu Leu Leu Gln	Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	Leu Ala Asn
545	550	560
Met Ile Ser Glu	Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	Leu Met Pro
565	570	575
Ser Leu Thr Glu	Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro	Val Asn Gly
580	585	590

FIG. 8 (7/8)

Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Val	Asn	Gly
			580					585							590
Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Pro	Trp	His	Ser	Phe	Gly	Ala	Asp
		595					600					605			
Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Val	Glu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg
	610						615				620				
Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr
	625				630					635				640	
Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp	Ala	Glu	Phe
					645					650				655	

FIG. 8 (8/8)

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
 660 665 670
 Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
 675 680 685
 Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu
 690 695 700
 Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp
 705 710 715 720
 Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn
 725 730 735
 Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 740 745 750

FIG. 9(1/8)

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

FIG. 9 (2/8)

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

FIG. 9(3/8)

Trp	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys
210					215					220				
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu
225					230				235					240
Glu	Ala	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu
					245				250					255
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser
									265					270
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Val	Val	Arg
									280					285
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met
290									295					300

FIG. 9 (4/8)

Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe
305					310					315					320
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr
				325					330					335	
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr
			340					345					350		
Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala
		355					360				365				
Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp
		370				375					380				
Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala
385					390					395					400

FIG. 9(5/8)

Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala
									410						415
Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile
			420					425					430		
Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn
			435				440					445			
Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met
							455				460				
Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu
465					470					475					480
Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys
							485			490					495

FIG. 9(6/8)

Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe
			500					505					510		
Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	Gln	Ile	Arg	Ser
		515					520					525			
Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Ser
		530					535					540			
Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	Glu	Ile	Gln	ASP
545					550					555					560
Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asp	Val
				565					570					575	
Leu	Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr	Gly	Asn	Asp	Ala
			580					585					590		

FIG. 9(7/8)

Leu Met	Pro Ser	Leu Thr	Glu Thr	Lys Thr	Thr Val	Glu Leu	Leu Leu	Pro
595			600			605		
Val Asn	Gly Glu	Phe Ser	Leu Asp	Asp Leu	Gln Pro	Trp His	Ser Ser	Phe
610			615		620			
Gly Ala	Asp Ser	Val Pro	Ala Asn	Thr Glu	Asn Glu	Val Glu	Pro Val	640
625			630		635			
Asp Ala	Arg Pro	Ala Ala	Asp Arg	Gly Leu	Thr Thr	Arg Pro	Gly Ser	
		645		650			655	
Gly Leu	Thr Asn	Ile Lys	Thr Glu	Glu Ile	Ser Glu	Val Lys	Met Asp	
		660		665			670	
Ala Glu	Phe Arg	His Asp	Ser Gly	Tyr Glu	Val His	His Gln	Lys Leu	
		675		680			685	
Val Phe	Phe Ala	Glu Asp	Val Gly	Ser Asn	Lys Gly	Ala Ile	Ile Gly	
690			695		700			

FIG. 9 (8/8)

Val Phe Phe Ala Glu Asp	Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly	
690	700	
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu		
705	715	720
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val		
	730	735
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met		
	745	750
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met		
	760	765
Gln Asn		
770		