



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 114**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04009160 .5**

86 Fecha de presentación : **16.04.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1469072**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

54 Título: **Medios y métodos para diagnosticar y tratar trastornos afectivos.**

30 Prioridad: **17.04.2003 EP 03008753**
04.09.2003 EP 03019626

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Affectis Pharmaceuticals AG.**
Kraepelinstrasse 2
80804 München, DE

72 Inventor/es: **Barden, Nicholas;**
Sillaber, Inge y
Páez-Pereda, Marcelo

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para diagnosticar y tratar trastornos afectivos.

5 La presente invención se refiere a usos de un agonista de P2X7R para la preparación de una composición farmacéutica para tratar enfermedades afectivas.

Hasta 10% de las personas que acuden a un médico padecen un trastorno afectivo (también conocido como trastorno del comportamiento o trastorno del estado de ánimo). Sin embargo, la mayoría de los casos siguen sin diagnóstico o se tratan de forma inadecuada. Los trastornos afectivos incluyen, entre otros, depresión, ansiedad y trastorno bipolar. Estas enfermedades están bien descritas en la bibliografía; véase, por ejemplo, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition Text Revision (DMS-IV-TR), American Psychiatric Press, 2000.

15 La depresión, también conocida como trastorno afectivo unipolar, se caracteriza por una combinación de síntomas tales como un estado de ánimo bajo, pérdida de energía, pérdida de interés, sensación de enfermedad física, pérdida de concentración, alteración del apetito, alteración del sueño y una ralentización de las funciones físicas y mentales que tienen como resultado una incesante sensación de desesperanza, impotencia, culpabilidad y ansiedad. Los subtipos principales de esta enfermedad son depresión mayor, distimia (depresión más leve) y depresión atípica. Otras formas importantes de depresión son el trastorno disfórico premenstrual y el trastorno afectivo estacional. El tratamiento actual de la depresión consiste en psicoterapia, fármacos antidepresivos o una combinación de ambos tratamientos. La mayoría de los fármacos antidepresivos se dirigen al transporte de los neurotransmisores serotonina y/o norepinefrina, o a la actividad de la enzima monoamina oxidasa. Incluyen: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluvoxamina), antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, amitriptilina, imipramina, desipramina, nortriptilina), inhibidores de la monoamina oxidasa (por ejemplo, fenelzina, isocarboxazid, 25 tranilcipromina) y antidepresivos de diseño tales como mirtazapina, reboxetina y nefazodona. Sin embargo, todos los fármacos antidepresivos existentes poseen inconvenientes tales como una larga latencia hasta la respuesta, un alto grado de no respondedores y efectos secundarios indeseables (*Holsboer*, Biol. Psychol. 57 (2001), 47-65). Por lo tanto, en la comunidad médica existe la necesidad de nuevos fármacos antidepresivos con un mejor perfil farmacológico (*Baldwin*, Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp. 16 (2001), S93-S99).

30 Los trastornos de ansiedad se definen por un estado de excitación excesiva o inapropiada caracterizado por sensación de aprensión, indecisión o miedo. Se clasifican de acuerdo con la gravedad y duración de sus síntomas y de las características afectivas específicas. Las categorías incluyen: (1) Trastorno de ansiedad generalizada, (2) trastorno de pánico, (3) fobias, (4) trastorno obsesivo-compulsivo, (5) trastorno de estrés postraumático y (6) trastorno de ansiedad de separación. El tratamiento convencional para la mayoría de los trastornos de ansiedad es una combinación de 35 terapia cognitiva-conductual con medicación antidepresiva. Las medicaciones adicionales incluyen benzodiazepinas y bupiriona.

El trastorno bipolar, también conocido como depresión maníaca, se caracteriza por oscilaciones del estado de ánimo entre periodos de manía (es decir, elevación del estado de ánimo incluyendo euforia exagerada, irritabilidad) y 40 periodos de depresión. El trastorno bipolar se clasifica de acuerdo con la gravedad de los síntomas. Los pacientes a los que se les ha diagnosticado un trastorno bipolar de tipo I padecen episodios maníacos o mixtos con o sin depresión mayor. En el trastorno bipolar de tipo II, los pacientes tienen episodios de hipomanía y episodios de depresión mayor. Con hipomanía, los síntomas de manía (euforia o irritabilidad) aparecen en formas más leves y son de menor duración. 45 Los fármacos actuales usados para tratar los trastornos bipolares son litio, valproato y lamotrigina, que estimula la liberación del neurotransmisor glutamato. Como ocurre con los fármacos antidepresivos, tardan semanas en ser eficaces y pueden producir efectos secundarios indeseables, por ejemplo, los altos niveles de litio en sangre pueden ser fatales.

Ciertas pruebas convincentes sugieren que los trastornos afectivos son enfermedades biológicas. Sin embargo, no 50 hay ningún ensayo de laboratorio ni otro procedimiento que pueda usar un médico común para realizar un diagnóstico definitivo. En su lugar, un médico con formación especial o un psiquiatra debe diagnosticar la enfermedad basándose en varios síntomas que aparecen conjuntamente. Este proceso a menudo requiere tiempo y es laborioso, requiriendo varias visitas para que el médico realice una historia cuidadosa de los síntomas que está experimentando actualmente el paciente así como de cualquier síntoma que haya tenido en el pasado. Por lo tanto, para la comunidad médica 55 tendría mucho interés un método fácil y eficaz para el diagnóstico preciso de trastornos afectivos (*Wittchen et al.*, J. Clin. Psychiatry 62, suppl. 26 (2001), 23-28).

La mayoría de los pacientes que padecen trastornos afectivos tienen antecedentes familiares y los estudios realizados con gemelos idénticos sugieren un fuerte componente genético. Por ejemplo, el mapeo genético en una población 60 aislada del valle central de Costa Rica sugiere un locus para el trastorno bipolar severo en el cromosoma 18q22-q23 (*Freimer et al.*, Nature Genetics 12 (1996), 436-441). Además, los estudios genéticos realizados en la población Amish del Viejo Orden sugieren que ciertos genes en los cromosomas 6, 13 y 15 pueden contribuir a la susceptibilidad al trastorno bipolar afectivo (*Gitns et al.*, Nature Genetics 12 (1996), 431-435). Recientemente, una investigación de todo el genoma en una población homogénea encontrada en la región de Saguenay/Lac- St-Jean de Quebec sugiere la presencia de un locus importante para el trastorno bipolar en el cromosoma 12-q23-q24 (*Morissette et al.*, Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.) 88 (1999), 567-587). En este estudio también se encontraron loci de susceptibilidad 65 en los cromosomas 5 y 21. Otros grupos informan sobre unas pruebas mínimas de asociación en la región de 12q23 (*Kelsoe et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 585-590; *Sklar*, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3 (2002),

371-413). Dado los diversos loci mencionados en los estudios anteriores (por ejemplo, asociaciones con los cromosomas 5, 6, 12, 13, 15, 18 y 21), aún no se ha encontrado una asociación genética definitiva para las enfermedades afectivas.

De esta manera, aunque se ha supuesto que varios genes están asociados con los trastornos afectivos mencionados anteriormente, sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado ninguna correlación clara. Como no se dispone de ninguna medicación ni diagnóstico adecuado a nivel molecular para los trastornos afectivos, existe la necesidad de identificar un gen cuyas mutaciones produzcan el espectro entero de trastornos afectivos así como de proporcionar medicamentos y métodos para el diagnóstico y tratamiento de trastornos afectivos.

De esta manera, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios y métodos para diagnosticar trastornos afectivos.

La solución para dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

La presente invención describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo consistente en:

(a) una secuencia de nucleótidos genómica que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y que contiene una mutación en la región 5'UTR que corresponde a las posiciones 362, 532, 1100, 1122, 1171 ó 1702 de la secuencia genómica del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre como se representa en la SEC ID N°: 1, donde en dicha posición dicho nucleótido se ha reemplazado por otro nucleótido;

(b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos del canal iónico de apertura por ATP P2X7R, donde en el exón que se indica en la columna "Exón" de la siguiente Tabla A, el resto aminoacídico que se indica en la columna "Resto aminoacídico" de la Tabla A que corresponde a la posición indicada en la columna "Posición en tipo silvestre" de la Tabla A de la secuencia de aminoácidos del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre como se representa en la SEC ID N°: 3 ó 4 se ha reemplazado por otro resto aminoacídico.

TABLA A

Exón	Resto aminoacídico	Posición en tipo silvestre
exón 3	R (Arg)	117
exón 5	G (Gly)	150
exón 6	E (Glu)	186
exón 6	L (Leu)	191
exón 8	R (Arg)	270
exón 13	I (Ile)	568
exón13	R (Arg)	578

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y que contiene una mutación en el exón 5 u 8 correspondiente a la posición 32548 o la posición 37633 de la secuencia de nucleótidos del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre que se representa en la SEC ID N°: 1, donde en dicha posición dicho nucleótido se ha reemplazado por otro nucleótido;

(d) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R, donde los aminoácidos que corresponden a las posiciones 488 a 494 del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 3 ó 4 se han delecionado;

(e) una secuencia de nucleótidos genómica que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R, donde en el intrón indicado en la columna "Intrón" de la siguiente Tabla B, el nucleótido indicado en la columna "Nucleótido reemplazado" de la Tabla B que corresponde a la posición indicada en la columna "Posición en tipo silvestre" de la Tabla B de la secuencia de nucleótidos del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 1 se ha reemplazado por otro nucleótido.

TABLA B

Intrón	NUCLEÓTIDO REEMPLAZADO	Posición en tipo silvestre
intrón 1	G	3166
intrón 1	C	24778
intrón 1	C	24830
intrón 3	A	26308
intrón 3	G	26422
intrón 4	G	32394
intrón 4	T	32434
intrón 5	A	32783
intrón 6	G	35641
intrón 6	A	35725
intrón 6	T	36001
intrón 7	G	36378
intrón 7	T	36387
intrón 7	G	36398
intrón 9	C	47214
intrón 11	T	47563
intrón 12	C	54307
intrón 12	G	54308

(f) una secuencia de nucleótidos genómica decodifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y que contiene una mutación en la región 3'UTR que corresponde a la posición 55169, 55170, 55171, 55917 ó 54925 de la secuencia de nucleótidos del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 1, donde en dicha posición, dicho nucleótido se ha reemplazado por otro nucleótido;

(g) una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 20 ó 21 nucleótidos y que comprende las mutaciones o deleciones definidas en una cualquiera de (a) a (f);

(h) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de nucleótidos como la mostrada en una cualquiera de las SEC ID N°: 13 a 51;

(j) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 5 a 12;

(j) una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos definida en una cualquiera de (a) a (g) o con la secuencia de nucleótidos de (h) y que tiene una mutación como se ha definido en una cualquiera de (a) a (f); y

(k) una secuencia de ácido nucleico que está degenerada como resultado del código genético con respecto a la secuencia de ácido nucleico como se ha definido en (j).

Sorprendentemente, se ha descubierto que ciertas mutaciones en el gen P2X7R que codifican el canal iónico de apertura por ATP P2X7R pueden producir el espectro entero de trastornos afectivos. Se han identificado seis mutaciones diferentes en la 5'UTR del gen P2X7R, siete mutaciones diferentes en los exones 3, 5, 6, 8 y 13 del gen P2X7R que conducen al reemplazo del aminoácido correspondiente en la secuencia de tipo silvestre de P2X7R representada en la SEC ID N°: 3 ó 4 y dos mutaciones en los exones 5 y 8 de dicho gen, respectivamente, que conducen a un reemplazo

de un nucleótido por otro nucleótido, una delección de nucleótidos en el exón 13 de dicho gen, 18 mutaciones en los intrones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 y 12 y 5 mutaciones en la 3'UTR del gen P2X7R, que se co-segregan con el estado de afección en 41 familias no relacionadas que padecen trastornos afectivos. La expresión "trastorno afectivo", cuando se usa en el contexto de la presente invención, pretende incluir, pero sin limitación, depresión, ansiedad, trastorno unipolar, trastorno bipolar de tipo I, trastorno bipolar de tipo II, manía, trastorno hiperactivo con déficit de atención, abuso de sustancias y cualquier otro trastorno que afecte al comportamiento normal o estado de ánimo de un individuo.

Cada mutación produce alteraciones que pueden explicar trastornos afectivos como se muestra en los ejemplos presentados más adelante.

P2X7R es un canal iónico de apertura por ATP que pertenece a la familia de canales ionotrópicos P2X. El gen se aisló por primera vez a partir de cerebro de rata (*Surprenant et al.*, (1996), 272, 735-738; número de acceso del GenBank NM_019256) y posteriormente a partir de una biblioteca de monocitos humanos (*Rassendren et al.*, J. Biol. Chem. 272 (1997), 5482-5486; números de acceso del GenBank NM_002562, Y09561) gracias a su homología de secuencia con los otros miembros de la familia P2X. Posteriormente se descubrió que P2X7R correspondía al receptor P2Z no identificado que media la acción de permeabilización del ATP en mastocitos y macrófagos (*Dahlqvist y Diamant*, Acta Physiol. Scand. 34 (1974), 368-384; *Steinberg y Silverstein*, J. Biol. Chem. 262 (1987), 3118-3122; *Gordon*, Biochem. J. 233 (1986), 309-319). El P2X7R tiene dos dominios transmembrana hidrófobos, un bucle extracelular y forma canales iónicos transmembrana. Los receptores P2X7 parecen funcionar sólo en forma homooligomérica y tienen un perfil farmacológico notablemente diferente de otros homo- o heterómeros P2X (*North y Surprenant*, Annual. Rev. Pharmacology Toxicology 40 (2000), 563-580). P2X7R requiere niveles de ATP superiores a 1 mM para conseguir la activación, mientras que otros receptores P2X se activan a concentraciones de ATP $\leq 100 \mu\text{M}$ (*Steinberg et al.*, J. Biol. Chem. 262 (1987), 8884-8888; *Greenberg et al.*, J. Biol. Chem. 263 (1988), 10337-10343) 32). Aunque todos los receptores P2X muestran propiedades semejantes a canales no selectivos después de la unión, los canales formados por el P2X7R pueden transformarse rápidamente en poros que pueden permitir el paso de moléculas de hasta 900 Dalton (*Virginio et al.*, J. Physiol. 519 (1999), 335-346).

P2X7R se expresa en células hematopoyéticas, mastocitos y macrófagos (*Surprenant et al.*, Science 272 (1996), 3118-3122), donde se organiza en forma tetramérica o hexamérica (*Kim et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001), 23262-23267). P2X7R está implicado, entre otras cosas, en la regulación de la función inmune y la respuesta inflamatoria.

La activación de P2X7R por ATP en los macrófagos está asociada con la estimulación mitogénica de células T (*Baricordi et al.*, Blood 87 (1996), 682-690), la liberación de citoquinas tales como interleuquina-1 β (*Griffiths et al.*, J. Immunol. 154 (1995), 2821-2828) y la formación de policlones de macrófagos (*Falzone et al.*, J. Clin. Invest. 95 (1995), 1207-1216). La estimulación del P2X7R con ATP también puede producir muerte celular al desencadenar flujos masivos de iones a través de la membrana (particularmente la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ y la salida de K⁺) y la formación de poros no selectivos de la membrana plasmática (*Di Virgilio et al.*, Cell Death Differ. 5 (1998), 191-199).

En el cerebro, originalmente se pensó que P2X7R estaba restringido a la microglía (macrófagos residentes del cerebro) y a las células endoteliales en lugar de a las neuronas (*Collo et al.*, Neuropharmacology 36 (1997), 1277-1283) lo que sugiere un papel de P2X7R en la neurodegeneración. Sin embargo, desde entonces P2X7R también se ha encontrado en neuronas de retina de rata (*Brandle et al.*, Brain Research Molecular Brain Res. 62 (1998), 106-109), células de ganglios cocleares (*Brandle et al.*, Neuroscience Letters 273 (1999), 105-108) y terminales presinápticas de neuronas a lo largo del tronco cerebral y la médula espinal (*Deuchards et al.*, J. Neurosci. 21 (2001), 7143-7152). Los estudios posteriores también sugieren que P2X7R regula la liberación de neurotransmisores tales como glutamato y GABA en neuronas del hipocampo (*Armstrong et al.*, J. Neuroscience 22 (2002), 5938-5945, *Sperlágh et al.*, J. Neurochem. 81 (2002), 1196-1211). La organización de P2X7R en células gliales y astrocitos del cerebro parece monomérica (*Kim et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001), 23262-23267).

Se han identificado varios agonistas y antagonistas de P2X7R. El Azul Brillante (Brilliant Blue) (*Jiang et al.*, Mol. Pharmacol. 58 (2000), 82-88), las isoquinolinas 1-[N,O-Bis(5-isoquinolinosulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina y N-[1-[N-metil-p-(5-isoquinolinosulfonil)bencil]-2-(4-fenilpiperazina)etil]-5-isoquinolinosulfonamida (*Humphreys et al.*, Mol. Pharmacol., 54 (1998), 22-32), algunos derivados de adamantano (documentos WO 99/29660, WO 99/29661, WO 00/61569, WO 01/42194, WO 01/44170, WO 01/44213), ciertos compuestos de fenilo sustituidos (documento WO 00/71529) y ciertos derivados de piperidina y piperazina (documento WO 01/46200) son antagonistas de P2X7R mientras que el ATP oxidado (oATP) actúa como un inhibidor irreversible del receptor (*Chen et al.*, J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203). Algunos de estos antagonistas actualmente se están evaluando para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, inmunes y cardiovasculares. BzATP (2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) actúa como agonista de P2X7R (*North y Surprenant*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580). El documento WO 99/55901 describe un método para identificar compuestos que modulan la actividad de un purinorreceptor de mamífero seleccionado entre el grupo compuesto por P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7 y sugiere un papel de dichos purinorreceptores en la terapia de trastornos del comportamiento tales como epilepsia, depresión y enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento.

Los ratones mutantes que carecen de P2X7R están sanos, son fértiles y no demuestran ningún fenotipo patente. Sin embargo, a diferencia de sus homólogos de tipo silvestre, los macrófagos peritoneales activados por LPS procedentes de animales P2X7R^{-/-} no pueden general interleuquina-1 β madura (IL-1 β) cuando se exponen al ATP, lo que sugiere una incapacidad de los macrófagos peritoneales de liberar IL-1 en respuesta al ATP (*Solle et al.*, J. Biol. Chem. 276

(2001), 125-132). No se realizó un estudio detallado del comportamiento de los ratones P2X7R^{-/-}. En seres humanos, un polimorfismo de Glu-496 a Ala conduce a la pérdida de función de P2X7 (*Gu et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001), 11135-11142) y está asociado con leucemia linfocítica crónica de células B (*Thunberg, et al.* The Lancet 360 (2002), 1935-1939). Se han notificado polimorfismos adicionales en la supuesta región promotora de P2X7R, y en la región codificante (*Li et al.*, FEBS Lett. 531 (2002), 127-131, EP 1199372).

A pesar de la abundante bibliografía en relación con P2X7R, nunca se ha sugerido o mencionado en la técnica anterior un papel en trastornos afectivos.

Antes de describir la presente invención con detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos particulares descritos en este documento ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada tiene el fin de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un especialista habitual en la técnica.

Preferiblemente, los términos usados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", *Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H.* eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que se presentan a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o etapa indicado o un grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

A lo largo del texto de esta memoria descriptiva se citan varios documentos.

Debe indicarse que cuando se usan en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de estos reactivos diferentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos por los especialistas en la técnica que podrían modificar o sustituir a los métodos descritos en este documento.

Cuando se usa en este documento, la expresión "secuencia de ácido nucleico" significa la secuencia de bases que comprenden bases de purina y pirimidina que están constituidas por moléculas de ácido nucleico, con lo que dichas bases representan la estructura primaria de una molécula de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico incluyen ADN, ADNc, ADN genómico, ARN, formas sintéticas y polímeros mixtos, cadenas con sentido y antisentido, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o modificadas, como apreciarán fácilmente los especialistas en la técnica.

Cuando se usa en este documento, el término "polipéptido" significa un péptido, una proteína o un polipéptido que incluye cadenas de aminoácidos de una longitud dada, donde los restos aminoacídicos se unen por enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, también se describen en este documento peptidomiméticos de estas proteínas/polipéptidos donde ciertos aminoácidos y/o enlaces peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales, así como aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como selenocisteína. Con el término polipéptidos se pueden designar péptidos, oligopéptidos y proteínas. Los términos polipéptido y proteína a menudo se usan indistintamente en este documento. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Estas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación.

El término "posición", cuando se usa en este documento, significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en este documento o la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico representada en este documento.

La expresión "canal iónico de apertura por ATP P2X7R" de acuerdo con esta invención indica un polipéptido que puede clasificarse como un miembro de la familia de receptores ionotrópicos P2X. También se conocen como receptores purinérgicos. Los receptores P2X son canales iónicos de apertura por ligando. El ligando para estos receptores puede ser ATP y/u otro nucleótido natural tal como ADP, UTP y UDP, o un nucleótido sintético tal como 2-metil ATP. Los criterios para la clasificación son: (1) una homología de secuencia que es mayor de 39% en la familia o en diferentes especies; (2) un mecanismo de transducción de señales que implica conductancia de iones (*Khakh et al.*, Pharmacol Rev. 253 (2001), 107-18). Por consiguiente, la expresión "canal iónico de apertura por ATP P2X7R" es equivalente a las expresiones "receptor ionotrópico" o "receptor purinérgico". Preferiblemente, la expresión "canal iónico de apertura por ATP P2X7R" indica un polipéptido que puede clasificarse como un canal iónico de apertura por ATP P2X7R basándose en una o más características estructurales y/o funcionales, preferiblemente las descritas anteriormente. Las características estructurales se refieren a ciertas características estructurales que permiten clasificar un polipéptido como una proteína P2X7R. Una de estas características es la secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, un polipéptido se clasifica como un canal iónico de apertura por ATP P2X7R si muestra un cierto grado de identidad de secuencia a lo largo de su longitud con la secuencia de aminoácidos de

la proteína P2X7R humana representada en la SEC ID N°: 3 ó 4. Este grado de identidad de secuencia es al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%. Se prefiere particularmente que el grado de identidad de secuencia sea de al menos 65%.

Además, las características estructurales de las proteínas P2X7R son dos dominios transmembrana hidrófobos y un bucle extracelular que podría analizarse usando el programa TMPRED (*Hofmann Biol. Chem.* 347 (1993), 166) o TMHMM (*Krogh J. Mol. Bio.* 305 (2001), 567-580). Además, P2X7R puede existir como un solo polipéptido, como un dímero, tetrámero o similar.

De esta manera, en el contexto de la presente invención, una proteína se clasifica preferiblemente como una proteína P2X7R si presenta al menos una de las características estructurales mencionadas anteriormente. Las características funcionales se refieren a las propiedades relacionadas con la actividad biológica de la proteína P2X7R. En particular, P2X7R es un canal iónico de apertura por ATP que permite que los iones de calcio y sodio pasen desde la solución extracelular a la solución intracelular, y permite que los iones de potasio pasen desde la solución intracelular a la solución extracelular. Además, el canal iónico de apertura por ATP P2X7R forma naturalmente una forma homooligomérica. Las características de las proteínas receptoras P2X7R pueden determinarse como se menciona más adelante en este documento. La expresión "canales iónicos de apertura por ATP P2X7R" comprende formas funcionales y no funcionales de los canales iónicos de apertura por ATP P2X7R. Se entiende que un canal iónico de apertura por ATP P2X7R funcional es una proteína P2X7R que tiene al menos una de las características funcionales mencionadas anteriormente que puede medirse por métodos conocidos en la técnica. Un canal iónico de apertura por ATP P2X7R no funcional es una proteína que puede clasificarse como una proteína P2X7R debido a las características estructurales que se han descrito anteriormente pero que ha perdido al menos una, preferiblemente todas las características funcionales de una proteína P2X7R como se ha descrito anteriormente. La no funcionalidad de la proteína P2X7R puede determinarse, por ejemplo, midiendo si los iones de calcio y sodio pueden entrar en las células o si los iones de potasio pueden salir de las células. De esta manera, es posible determinar la aparición de una mutación en el canal iónico de apertura por ATP P2X7R midiendo la entrada o salida de calcio y/o sodio de las células. Las células que llevan una mutación en el gen P2X7R muestran una entrada y/o salida alterada de iones en comparación con las células que llevan una proteína P2X7R de tipo silvestre.

Además, hay diferentes métodos que podrían usarse para determinar si P2X7R es funcional o no funcional, por ejemplo, está alterado. Un método consiste en medir la velocidad de incorporación inducida por ATP de etidio en las células, por ejemplo, células aisladas a partir de un individuo. El etidio se incorpora en las células a través de poros P2X7R, cuando la formación de los poros se activa por ATP. Las células después se incuban con o sin ATP en presencia de etidio, y después se analizan por citometría de flujo. La fluorescencia de etidio se mide y se compara en presencia o ausencia de ATP. Si P2X7R tiene menos actividad, la fluorescencia de etidio inducida por ATP será menor que en las células de control. Este método se usó para verificar la actividad de P2X7R en linfocitos B y linfocitos T aislados de pacientes con leucemia (*Wiley et al., Lancet* 359 (2002), 1114-1119). En resumen, se incuban células aisladas en 1 ml de cloruro potásico tamponado con Hepes a 37°C con agitación continua. Después se añade etidio a una concentración de 25 mol/l, seguido 40 segundos después por la adición de 10 µl de una solución madre de ATP a una concentración de 100 mmol/l. Las células se analizan a 1.000 acontecimientos/s por citometría de flujo usando un citómetro de flujo Coulter Elite (Coulter, Hialeah, FL) con una excitación láser de argón a 488 nm. La emisión fluorescente se recogió usando un filtro de paso largo de 590 nm. La intensidad lineal de fluorescencia del canal medio para cada subpoblación abierta en intervalos sucesivos de 5 s se analizó con el uso de un software Win-MDI (Joseph Trotter, versión 2.7) y se representó frente al tiempo.

Otro método para determinar la actividad de P2X7R es medir la entrada de calcio en células aisladas incubadas con colorantes fluorescentes que emiten sólo tras la unión al calcio. Las células tienen que cargarse con el colorante y después tiene que estimularse la entrada de calcio. Los ejemplos de estos colorantes incluyen Fura-2, Calcium green, calcium orange, calcium crimson (todos disponibles en Molecular Probes). Los métodos para medir el transporte de calcio son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, *Takahashi et al., Physiol Rev.* 79 (1999), 1089-1125. Además, la entrada de calcio en las células produce cambios en el potencial eléctrico de la membrana. Estos cambios pueden medirse por electrofisiología (pinzamiento de voltaje) o usando colorantes que son sensibles al cambio de voltaje. Estos métodos también son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, *González et al., DDT* 4 (1999), 431-439; *González y Tsien, Chemistry & Biology* 4 (1997), 269-277; *González y Tsien, Biophysical Journal* 69 (1995), 1272-1280.

Otro método es medir la captación de ¹³³Ba²¹. Ba²¹ es un buen sustituto de Ca²¹ y una vez dentro de la célula ni se bombea ni se atrapa por ATPasas de transporte. La captación de Ba²¹ puede medirse durante 60 s usando ¹³³BaCl₂ (concentración final, 0,2 mM). A tiempo 0, se añade una solución madre precalentada de ¹³³Ba²¹ (0,4 mM y 1 µCi/ml) en volúmenes iguales a células aisladas precalentadas en KCl 150 mM con HEPES (pH 7,4) a 37°C. Se añade ATP (1 mM) 10 minutos antes o simultáneamente con el isótopo ¹³³Ba²¹. Se toman alícuotas de 0,8 ml en puntos de tiempo entre 0 y 60 s y se mezclan inmediatamente con 0,2 ml de MgCl₂ 50 mM enfriado con hielo (en medio KCl-HEPES) que previamente se había depositado en capas sobre 250 µl de mezcla de aceite (ftalato de di-n-butilo y ftalato de di-iso-octilo, 7:3 vol/vol) y después se centrifugan a 8.000 g durante 30 s. Los sobrenadantes y el aceite se aspiran y los sedimentos celulares se cuentan en un contador gamma automático Wallac Wizard 3 o en cualquier otra unidad de medición gamma adecuada.

Se encontró que ciertas mutaciones de diferentes tipos en el gen P2X7R están asociadas con la aparición de trastornos afectivos. El primer tipo de mutaciones son mutaciones en la 5'UTR. Son ejemplos de estas mutaciones reemplazos de un solo nucleótido en posiciones correspondientes a las posiciones 362, 532, 1100, 1122, 1171 o 1702 de la secuencia genómica del canal iónico de apertura por ATP de tipo silvestre P2X7R como se describe en la SEC ID N°: 1.

La posición con respecto a las secuencias de nucleótidos mencionadas en este documento se refiere a la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1. Esta secuencia representa la secuencia de ácido nucleico del gen P2X7R que codifica el canal iónico de apertura por ATP P2X7R. Es posible que el especialista en la técnica identifique la posición en la secuencia genómica correspondiente a una posición en la SEC ID N°: 1 alineando las secuencias. Además, las localizaciones exactas de los exones e intrones se indican en la SEC ID N°: 1 presentada más adelante en este documento. Además, el especialista en la técnica puede identificar exones e intrones del gen P2X7R comparando la SEC ID N°: 1 con la SEC ID N°: 2 que muestra la secuencia de ADNc del gen P2X7R.

Preferiblemente, en la posición 362 de la 5'UTR de la secuencia genómica del gen P2X7R representada en la SEC ID N°: 1, una timina (T) se reemplaza por otro nucleótido, preferiblemente una base de purina. Más preferiblemente, en dicha posición dicha timidina se reemplaza por una base de pirimidina. De una forma particularmente preferida, dicha timina se reemplaza por una citosina (C).

En la posición 532 de la 5'UTR de la secuencia genómica del gen P2X7R representada en la SEC ID N°: 1, una timina (T) preferiblemente se reemplaza por otro nucleótido, preferiblemente una base de pirimidina. Más preferiblemente, en dicha posición dicha timina se reemplaza por una base de purina. De una forma particularmente preferida, dicha timina se reemplaza por una guanina (G).

Los restos de adenina (A) en las posiciones 1100 y 1122, respectivamente, en la 5'UTR de la secuencia genómica del gen P2X7R preferiblemente se reemplaza por una base de pirimidina. Más preferiblemente, dicha adenina se reemplaza por una base de purina y de una forma particularmente preferida dicha adenina se reemplaza por una guanina (G).

En la posición 1171 de la 5'UTR de la secuencia genómica del gen P2X7R representada en la SEC ID N°: 1, una citidina (C) se reemplaza por otro nucleótido, preferiblemente por una base de pirimidina. Más preferiblemente, dicha citidina se reemplaza por una base de purina e incluso más preferiblemente dicha citidina se reemplaza por una guanina (G).

La guanina en la posición 1702 en la 5'UTR de la secuencia genómica del gen P2X7R representada en la SEC ID N°: 1 se reemplaza por otro nucleótido, preferiblemente por una base de pirimidina. Más preferiblemente, dicha guanina se reemplaza por una base de purina y de una forma particularmente preferida se reemplaza por una adenina (A).

Un segundo tipo de mutación encontrada en el gen P2X7R son mutaciones en exones que conducen a sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos correspondiente. Éstas son las mutaciones indicadas en el punto (b) mostrado anteriormente. En este contexto, la expresión "un resto aminoacídico como se indica en la columna "Resto aminoacídico" de la Tabla A que corresponde a la posición X del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre que se representa en la columna "Posición en tipo silvestre" tiene el siguiente significado: El resto aminoacídico en cuestión estaría localizado en la posición X en la secuencia de la SEC ID N°: 3 ó 4 si la secuencia en la que aparece dicho resto aminoacídico se compara y alinea con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 ó 4. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 3 ó 4 es la secuencia de aminoácidos del gen P2X7R humano y se usa como secuencia de referencia en este documento.

Para determinar si un resto aminoacídico o un resto nucleotídico en una secuencia de P2X7R dada corresponde a cierta posición en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, 3 ó 4, el especialista puede usar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, alineamientos, de forma manual o usando programas informáticos tales como los mencionados más adelante en relación con la definición del término "hibridación" y grados de homología.

Por ejemplo, BLAST2.0, que son las siglas de Basic Local Alignment Search Tool (herramienta para búsqueda de alineamiento local básico) (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), puede usarse para buscar alineamientos de secuencia locales. BLAST produce alineamientos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos para determinar similitudes de secuencia. Debido a la naturaleza local de los alineamientos, BLAST es especialmente útil para determinar correspondencias exactas o para identificar secuencias similares. La unidad fundamental de salida del algoritmo BLAST es el Par de Segmentos de Alta Puntuación (HSP). Un HSP consiste en dos fragmentos de secuencia de longitudes arbitrarias pero iguales, cuyo alineamiento es máximo localmente y para los cuales la puntuación de alineamiento satisface o excede una puntuación umbral o límite establecida por el usuario. La estrategia BLAST sirve para buscar HSP entre una secuencia problema y una secuencia de una base de datos, para evaluar el significado estadístico de cualquier correspondencia encontrada y para presentar sólo las correspondencias que satisfacen el umbral de significado seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral de significado estadístico para presentar correspondencias de secuencias de la base de datos. E se interpreta como límite superior de la secuencia esperada de probabilidad de aparición

de un HSP (o serie de HSP) dentro del contexto de la búsqueda de la base de datos entera. Cualquier secuencia de la base de datos cuya correspondencia satisfaga E se presenta en el resultado del programa.

Se usan técnicas informáticas análogas que usan BLAST (*Altschul* (1997), loc. cit.; *Altschul* (1993), loc. cit.; *Altschul* (1990), loc. cit.) para buscar moléculas idénticas o relacionadas en bases de datos de nucleótidos tales como GenBank o EMBL. Este análisis es mucho más rápido que las hibridaciones múltiples basadas en la membrana. Además, la sensibilidad de la búsqueda informática puede modificarse para determinar si cualquier correspondencia particular se clasifica como exacta o similar. La base de la búsqueda es la puntuación del producto que se define como:

$$\frac{\% \text{ identidad de secuencia} \times \% \text{ puntuación BLAST máxima}}{100}$$

y tiene en cuenta tanto el grado de similitud entre las dos secuencias como la longitud de la correspondencia de secuencia. Por ejemplo, con una puntuación de producto de 40, la correspondencia será exacta dentro de un error de 1-2%; y a 70, la correspondencia será exacta. Las moléculas similares normalmente se identifican seleccionando las que muestran puntuaciones de producto entre 15 y 40, aunque puntuaciones menores pueden identificar moléculas relacionadas.

Como se ha mencionado anteriormente, el segundo grupo de mutaciones identificadas en el gen P2X7R son mutaciones en los exones del gen P2X7R que conducen a sustituciones de aminoácidos. A este respecto, la SEC ID N°: 2 muestra la secuencia de ADNc del gen P2X7R. En el exón 3, en la posición 117 de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre correspondiente de P2X7R representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, un resto de arginina (R) se reemplaza por otro resto aminoacídico, preferiblemente por un resto aminoacídico alifático, ácido o básico. Más preferiblemente, por un resto aminoacídico aromático que, de una forma particularmente preferida, es triptófano (W). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 5.

En el exón 5, en la posición 150 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, un resto de glicina (G) se reemplaza por otro resto aminoacídico, preferiblemente por un resto aminoacídico alifático, aromático o ácido. Más preferiblemente, por un resto aminoacídico básico y de una forma particularmente preferida por una arginina (R). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 6.

En la posición 186 en el exón 6 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, un resto de glutamato (E) se reemplaza por otro resto aminoacídico, preferiblemente por un resto aminoacídico alifático, aromático o ácido. Más preferiblemente, dicho glutamato se reemplaza por un resto aminoacídico básico que de una forma particularmente preferida es una lisina (K). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 7.

En el exón 6 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4 en la posición 191, un resto de leucina (L) se reemplaza por otro resto aminoacídico. Dicho resto aminoacídico preferiblemente es un resto aminoacídico alifático, ácido o básico. Más preferiblemente, dicho resto aminoacídico es un resto aminoacídico aromático que de una forma particularmente preferida es una prolina (P). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 8.

En el exón 8 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, en la posición 270 un resto de arginina (R) se reemplaza por otro resto aminoacídico. Dicho resto aminoacídico preferiblemente es un resto aminoacídico aromático, ácido o básico. Más preferiblemente, dicho resto aminoacídico es un resto aminoacídico alifático que, de una forma particularmente preferida, es una cisteína (C). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 9.

En la posición 568 en el exón 13 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, un resto de isoleucina (I) se reemplaza por otro resto aminoacídico. Más preferiblemente, dicha isoleucina se reemplaza por un resto aminoacídico aromático, básico o ácido. Incluso más preferiblemente, dicha isoleucina se reemplaza por un resto aminoacídico alifático que, de una manera particularmente preferida, es una asparagina (N). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 10.

En el exón 13, en la posición 578 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, un resto de arginina (R) se reemplaza por otro resto aminoacídico. Dicho resto aminoacídico preferiblemente es un resto aminoacídico aromático, ácido o básico. Más preferiblemente es un resto aminoacídico alifático y particularmente se prefiere que sea un resto de glutamina (Q). El polipéptido resultante se muestra en la SEC ID N°: 12.

Se prevé que las mutaciones mencionadas anteriormente en los exones del gen P2X7R se producen debido a mutaciones puntuales producidas, por ejemplo, por medios químicos y/o físicos o por una imprecisión del complejo de replicación seguido de un fallo de la maquinaria de reparación de una célula, que pueden dar como resultado un cambio de un solo codón. Son posible tipos de mutaciones puntuales transiciones, es decir el cambio de una base de purina o pirimidina por otra base de purina o pirimidina, por ejemplo, adenina por guanina o timidina por citosina, o transversiones, es decir, el cambio de una base de purina o pirimidina por otra base de pirimidina o purina, por ejemplo

adenina por timidina o guanina por citosina. Además, una mutación puntual también puede deberse a una inserción o delección de uno o más nucleótidos.

Las mutaciones que conducen al reemplazo de los aminoácidos mencionados anteriormente y más adelante se indican en la Tabla 1 mostrada posteriormente.

El tercer grupo de mutaciones en el gen P2X7R se ha identificado en los exones 5 y 8 del gen P2X7R representado en la SEC ID N°: 1 y son silenciosas, es decir, no conducen a cambios de aminoácidos. En particular, en la posición 32548 del exón 5 de la secuencia genómica de tipo silvestre del gen P2X7R representada en la SEC ID N°: 1, un resto de citidina se reemplaza por otro nucleótido. Dicho nucleótido preferiblemente es una base de pirimidina y de una forma particularmente preferida una timina. El cambio del resto de citidina en la posición 32548 en el exón 5 del gen P2X7R por otro nucleótido preferiblemente no conduce al reemplazo del aminoácido cisteína por otro resto aminoacídico.

En el exón 8 del gen P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 1, en la posición 37633 un resto de citidina se reemplaza por otro resto nucleotídico. Dicho resto nucleotídico preferiblemente es una base de pirimidina y de una forma particularmente preferida timina. Debido a este reemplazo, el aminoácido aspartato (D) codificado por el codón respectivo en el que ha tenido lugar en la posición 37633 un reemplazo, preferiblemente no se reemplaza por otro resto aminoacídico.

Las mutaciones mencionadas anteriormente en los exones 5 y 8 en las posiciones 32548 y 37633, respectivamente, del gen P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 1 son mutaciones en la tercera posición de un codón triplete, es decir, en la base oscilante (wobble), que conducen a las denominadas mutaciones silenciosas. Las mutaciones silenciosas normalmente no conducen a un cambio del aminoácido debido a la degeneración del código genético, es decir, 64 tripletes codifican los 20 aminoácidos naturales. Sin embargo, dichas mutaciones silenciosas conducen a un cambio en el codón que codifica sus aminoácidos respectivos en la medida en la que el codón recién generado puede no ajustarse tan bien al uso de codones de un organismo. Particularmente, el codón recién generado no se traduce por el ribosoma con la misma eficacia que el codón "antiguo". Esto puede producir cantidades insuficientes del polipéptido correspondiente produciendo un fenotipo distinto.

El cuarto grupo de mutaciones en el gen P2X7R descrito anteriormente en este documento en el punto (d) es una delección de 7 aminoácidos que corresponden a las posiciones 488 a 494 de la secuencia de aminoácidos de P2X7R de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4. De esta manera, la presente solicitud también describe secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína P2X7R en la que se delecionan aminoácidos correspondientes a las posiciones 488 a 494 del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 3 ó 4. Esto significa que se deleciona un fragmento que incluye las posiciones de aminoácidos 488 a 494 de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre correspondiente representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, con lo que se obtiene un polipéptido acortado. Se representa un ejemplo de este polipéptido acortado en la SEC ID N°: 11. Este tipo de mutación como se describe en este documento preferiblemente codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R no funcional. La delección de un fragmento que incluye los aminoácidos 488 a 494 de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4 es el resultado de una delección en el exón 13. La proteína resultante representada en la SEC ID N°: 11 carece de los aminoácidos 488 a 494 de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre correspondiente representada en la SEC ID N°: 3 ó 4, de tal forma que la posición de aminoácido 494 del polipéptido delecionado representado en la SEC ID N°: 11 corresponde a la posición de aminoácido 502 de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre representada en la SEC ID N°: 3 ó 4. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico descrita en este documento codifica un polipéptido P2X7R en el que se han delecionado exactamente los aminoácidos que corresponden a las posiciones 488 a 494 de la SEC ID N°: 3 ó 4. Sin embargo, también se incluyen mutantes en los que pueden estar delecionados más o menos aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de P2X7R indicada en la SEC ID N°: 3 ó 4 debido, por ejemplo, a un corte y empalme o delección atípica de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica P2X7R o procesos postraduccionales erróneos, siempre que el canal iónico de apertura por ATP P2X7R no sea funcional. Por ejemplo, también es posible que se delecionen aminoácidos adicionales que preceden a la posición de aminoácido 488 o aminoácidos posteriores a la posición de aminoácido 494, o que se delecionen menos aminoácidos.

Preferible mente, se delecionan adicionalmente al menos uno, más preferiblemente al menos dos, incluso más preferiblemente al menos tres y aún más preferiblemente al menos 5 restos aminoacídicos cadena arriba de la posición que corresponde al resto aminoacídico 488 y/o cadena abajo de la posición que corresponde al resto aminoacídico 494 de la SEC ID N°: 3 ó 4.

Sin embargo, se prefiere que no más de 20, preferiblemente no más de 15, incluso más preferiblemente no más de 10 y aún más preferiblemente no más de 7 restos aminoacídicos se delecionen adicionalmente cadena arriba de la posición que corresponde al resto aminoacídico 488 de la SEC ID N°: 3 ó 4 o cadena abajo de la posición que corresponde al resto aminoacídico 494 de la SEC ID N°: 3 ó 4.

Otro grupo de mutación (mencionada en el punto (e), anteriormente) reside en los intrones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 ó 12 de la secuencia genómica de tipo silvestre de P2X7R representada en la SEC ID N°: 1. Dichas mutaciones en dichos intrones son mutaciones puntuales como las mostradas en la Tabla B presentada anteriormente en este documento y en la Tabla 1 mostrada más adelante.

En la posición respectiva indicada en la columna “Posición en tipo silvestre” en la Tabla B o indicada en la columna “Polimorfismo” en la Tabla 1, se muestra la posición del resto nucleotídico en el intrón respectivo que se reemplaza por otro resto nucleotídico. Por consiguiente, la expresión “un nucleótido como se indica en la columna “Intrón” de la Tabla B que corresponde a la posición indicada en la columna “Nucleótido reemplazado” de la Tabla B que corresponde a la posición indicada en la columna “Posición en tipo silvestre” de la Tabla B se reemplaza por otro nucleótido” significa que un resto nucleotídico en una secuencia codificante de P2X7R estaría localizado en la posición Y en la SEC ID N°: 1 cuando la secuencia P2X7R se compara y se alinea con la secuencia de la SEC ID N°: 1. Si el nucleótido en la posición respectiva es una base de purina tal como adenina o guanina, se prefiere que debido a una transición se reemplace por otra base de purina. Por ejemplo, una adenina se reemplaza por una guanina o una guanina se reemplaza por una adenina. Si el nucleótido en la posición respectiva es una base de pirimidina, se prefiere que debido a una transición se reemplace por otra base de pirimidina. Por ejemplo, timina se reemplaza por una citidina y una citidina se reemplaza por un timina.

También se prefiere que debido a una transversión, una base de purina se reemplace por una base de pirimidina o viceversa. Por ejemplo, una adenina se reemplaza por una timina y una guanina se reemplaza por una citidina. De una forma particularmente preferida, dicho nucleótido en los intrones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 ó 12 del gen P2X7R representado en la SEC ID N°: 1 se reemplaza por el nucleótido representado en la columna “Polimorfismo” de la Tabla 1, presentada más adelante.

Un último grupo de mutaciones que se han identificado se refiere a las mutaciones que residen en la 3'UTR del gen P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 1. Las mutaciones se encontraron en las posiciones 54925, 55169, 55170, 55171 ó 55917 respectivamente, del gen P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 1.

Se descubrió que en la posición 54925 un resto de guanina se reemplazaba por otro nucleótido. Preferiblemente, dicho resto de guanina se reemplaza por una base de pirimidina, más preferiblemente por una base de purina y de una forma particularmente preferida por una adenina.

En la posición 55169, un resto de citidina se reemplaza por otro nucleótido, preferiblemente por una base de pirimidina. Más preferiblemente, se reemplaza por una base de purina y de una forma particularmente preferida se reemplaza por una adenina.

En las posiciones 55170 y 55171, un resto de adenina se reemplaza por otro resto nucleotídico, preferiblemente por una base de purina. Más preferiblemente, dicho resto de adenina se reemplaza por una base de pirimidina y de una forma particularmente preferida dicho resto de adenina se reemplaza por un resto de citidina. También se descubrió que en la posición 55917, un resto de citidina se reemplaza por otro nucleótido. Preferiblemente, dicho resto nucleotídico es una base de purina, más preferiblemente una base de pirimidina y de una forma particularmente preferida una timina.

Como es evidente por lo anterior, no todas las mutaciones identificadas están localizadas en exones o conducen a un cambio en la secuencia de aminoácidos. Algunas de las mutaciones están localizadas en la 5'UTR, en la 3'UTR o en intrones.

Se sabe que los polimorfismos en regiones promotoras y potenciadoras pueden afectar a la función del gen por medio de la modulación de la transcripción, particularmente si están situados en sitios de reconocimiento para proteínas de unión al ADN (*Fishman et al.*, J. Clin. Invest. 102 (1998), 1369-1376). El término “polimorfismo”, que se usa en este documento, significa la sustitución de un solo nucleótido, la inserción de nucleótidos y la delección de nucleótidos que, en el caso de la inserción y delección, incluye la inserción o delección de uno o más nucleótidos en una posición de un gen y las alteraciones correspondientes en las proteínas expresadas. Los polimorfismos en la región 5' no traducida (5'UTR) de genes puede afectar a la eficacia con la que se traducen las proteínas. Un ejemplo representativo de esto es el gen c-myc, donde un SNP C-G que crea un sitio interno de entrada de ribosomas está asociado con una mayor eficacia de traducción de c-myc y con mieloma (*Chappell et al.*, Oncogene 19 (2000), 4437-4440). Los polimorfismos en la 3'UTR pueden afectar a la función del gen por medio de la alteración de la estructura secundaria del ARN y la eficacia de la traducción o por medio de su efecto sobre motivos en el ARN que se une a proteínas que regulan la degradación del ARN. Los polimorfismos dentro de intrones pueden afectar a la función del gen por medio de su efecto sobre el corte y empalme del ARN dando como resultado polipéptidos aberrantes. Otra forma en la que los polimorfismos intrónicos pueden afectar a la función del gen es cuando afectan a motivos reguladores dentro de intrones. Son ejemplos el polimorfismo del sitio de unión Sp1 dentro del intrón 1 del gen COLIA1 (*Mann et al.*, J. Clin. Invest. 107 (2001), 899-907) y polimorfismos de repetición dentro del gen IL-1Ra (*Keen et al.*, Bone 23 (1998), 367-371). En *Caceres y Komblitt*, Trends Genet. 4 (2002), 186-93 se describen ejemplos adicionales entre SNP intrónicos y la función génica. El ejemplo 4 en la página 52, línea 30 a la página 53, línea 51 del texto describe posibles sucesos de corte y empalme alternativos y la producción de proteínas aberrante asociadas con tres SNP descritos en la solicitud.

Las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en este documento pueden comprender al menos 56580 nucleótidos, preferiblemente al menos 10000 nucleótidos, al menos 5000 nucleótidos, al menos 1000 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos. Más preferiblemente, dichas secuencias de ácido nucleico comprenden al menos 50 nucleótidos y de una forma particularmente preferida comprenden al menos 20 ó 21 nucleótidos que comprenden las mutaciones o delecciones descritas anteriormente en este documento. Más preferiblemente, dicha secuencia de ácido nucleico tiene una secuencia como la representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 13 a 51.

ES 2 293 114 T3

Las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en este documento que comprenden mutaciones en exones que conducen al reemplazo de la secuencia de aminoácidos correspondiente del polipéptido P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 3 ó 4, codifican polipéptidos mostrados en las SEC ID N°: 5 a 10 y 12.

- 5 Además, las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en este documento que comprenden una delección que conduce a un polipéptido truncado en comparación con el polipéptido de longitud completa del polipéptido P2X7R de tipo silvestre mostrado en la SEC ID N°: 3 ó 4 se muestran en la SEC ID N°: 11.

10 En este documento se describen también moléculas de ácido nucleico que hibridan con una de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y que muestran una mutación como se ha descrito anteriormente en este documento.

El término “hibrida”, como se usa en este documento, puede referirse a hibridaciones en condiciones rigurosas o no rigurosas. Si no se especifica, las condiciones son preferiblemente no rigurosas. Dichas condiciones de hibridación pueden establecerse de acuerdo con protocolos convencionales descritos, por ejemplo, en *Sambrook, Russell* “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); *Ausubel*, “Current Protocols in Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), o *Higgins y Hames* (Eds.) “Nucleic acid hybridization, a practical approach” IRL Press Oxford, Washington DC, (1985). El establecimiento de las condiciones está dentro de la experiencia del especialista y puede determinarse de acuerdo con protocolos descritos en la técnica. De esta manera, la detección de únicamente secuencias de hibridación específica normalmente requerirá condiciones rigurosas de hibridación y lavado tales como 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 65°C. Las condiciones de hibridación no rigurosas para la detección de secuencias homólogas o no exactamente complementarias pueden ser 6xSSC, SDS al 1% a 65°C. Como es bien conocido, la longitud de la sonda y la composición del ácido nucleico a determinar constituyen parámetros adicionales de las condiciones de hibridación. Debe tenerse en cuenta que pueden realizarse variaciones en las condiciones anteriores por medio de la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos usados para eliminar el efecto de fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas disponibles en el mercado. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente debido a problemas de compatibilidad. Las moléculas de ácido nucleico que hibridan también comprenden fragmentos de las moléculas descritas anteriormente. Estos fragmentos pueden representar secuencias de ácido nucleico que codifican un canal iónico de apertura por ATP P2X7R no funcional o un fragmento no funcional del mismo, y que tienen una longitud de al menos 12 nucleótidos, preferiblemente de al menos 15, más preferiblemente de al menos 18, aún más preferiblemente de al menos 21 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos 30 nucleótidos, incluso más preferiblemente de al menos 40 nucleótidos y todavía más preferiblemente de al menos 60 nucleótidos. Además, las moléculas de ácido nucleico que hibridan con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente también incluyen fragmentos complementarios, derivados y variantes alélicas de estas moléculas. Además, un complejo de hibridación se refiere a un complejo entre dos secuencias de ácido nucleico gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre bases G y C complementarias y entre bases A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente por interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias de ácido nucleico complementarias forman enlaces de hidrógeno en una configuración antiparalela. Un complejo de hibridación puede formarse en solución (por ejemplo, análisis Cot o Rot) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, membranas, filtros, chips, pasadores o portaobjetos de vidrio a los que, por ejemplo, se han fijado células). Los términos complementario o complementariedad se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones permisivas de sal y temperatura por la formación de pares de bases. Por ejemplo, la secuencia “A-G-T” se une a la secuencia complementaria “T-C-A”. La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser “parcial”, en la que sólo se unen algunos de los ácidos nucleicos, o puede ser completa cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto tiene una importancia particular en reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre cadenas de ácido nucleico.

La expresión “secuencias de hibridación” preferiblemente se refiere a secuencias que presentan una identidad de secuencia de al menos 40%, preferiblemente de al menos 50%, más preferiblemente de al menos 60%, incluso más preferiblemente de al menos 70%, de una forma particularmente preferida de al menos 80%, de una forma particularmente más preferida de al menos 90%, de una forma incluso más particularmente preferida de al menos 95% y aún más preferiblemente de al menos 97% con una secuencia de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, que codifica una proteína P2X7R con una mutación descrita. Además, la expresión “secuencias de hibridación” preferiblemente se refiere a secuencias que codifican una proteína P2X7R que tiene una identidad de secuencia de al menos 40%, preferiblemente de al menos 50%, más preferiblemente de al menos 60%, incluso más preferiblemente de al menos 70%, de una forma particularmente preferida de al menos 80%, de una forma particularmente más preferida de al menos 90%, de una forma incluso más particularmente preferida de al menos 95% y aún más preferiblemente de al menos 97% con una secuencia de aminoácidos de un mutante de P2X7R como se ha descrito anteriormente en este documento.

65 Tal como se utiliza en este documento, la expresión “idéntica” o “porcentaje de identidad” en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de restos aminoacídicos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo,

identidad de 60% o 65%, preferiblemente identidad de 70-95%, más preferiblemente identidad de al menos 95%) cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, sobre una región designada, midiéndose dicha identidad usando un algoritmo de comparación de secuencias conocido en la técnica, o por alineamiento manual e inspección visual. Las secuencias que tienen, por ejemplo, una identidad de secuencia de 60 a 95% o mayor se consideran sustancialmente idénticas. Esta definición también se aplica al complemento de una secuencia de ensayo. Preferiblemente, la identidad descrita existe en una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 a 25 aminoácidos o nucleótidos, más preferiblemente en una región que tiene una longitud de aproximadamente 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos. Los especialistas en la técnica sabrán cómo determinar el porcentaje de identidad entre secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245) como se conoce en la técnica.

Aunque el algoritmo FASTDB típicamente no considera adiciones o deleciones internas sin correspondencia en las secuencias, es decir, huecos, en su cálculo, esto puede corregirse manualmente para evitar una sobreestimación del porcentaje de identidad. CLUSTALW, sin embargo, no tiene en cuenta los huecos de secuencia en sus cálculos de identidad. Los especialistas en la técnica también disponen de algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402). El programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de las dos cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915) usa alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de las dos cadenas.

Además, en este documento se describen también moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia está degenerada en comparación con la secuencia de una molécula de hibridación descrita anteriormente. Cuando se usa en este documento, la expresión "que está degenerada como resultado del código genético" significa que debido a la redundancia del código genético diferentes secuencias de nucleótidos codifican el mismo aminoácido.

También se describen en este documento moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más de las mutaciones o deleciones descritas anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento pueden proceder de cualquier organismo que codifique canales iónicos de apertura por ATP P2X7R correspondientes. Por ejemplo, se ha informado sobre la existencia de canales iónicos de apertura por ATP P2X7R en diversos organismos, por ejemplo, rata (véase, *Suprenant* (1996), loc. cit), ratón (Número de acceso del Genbank AJ 489297), xenopus (Número de acceso del Genbank AJ 345114), pollo (Número de acceso del Genbank BM 491404) o *Bos taurus* (Número de acceso del Genbank AF 083073). En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico descrita en este documento procede de un vertebrado, preferiblemente de un mamífero, incluso más preferiblemente la molécula de ácido nucleico procede de un conejo o cobaya, y aún más preferiblemente el ácido nucleico procede de ratón, rata o ser humano.

La molécula de ácido nucleico descrita en este documento puede ser cualquier tipo de ácido nucleico, por ejemplo, ADN, ARN o APN (ácido péptido nucleico).

Para los fines utilizados en este documento, un ácido péptido nucleico (APN) es un análogo de ADN de tipo poliamida y las unidades monoméricas para adenina, guanina, timina y citosina están disponibles en el mercado (Perceptive Biosystems). En los APN no están presentes ciertos componentes del ADN, tales como fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa. Como describen Nielsen *et al.*, Science 254:1497 (1991); y Egholm *et al.*, Nature 365:666 (1993), los APN se unen específicamente y fuertemente a cadenas de ADN complementarias y no se degradan por las nucleasas. De hecho, el APN se une más fuertemente al ADN que el propio ADN. Esto probablemente se debe a que no hay repulsión electrostática entre las dos cadenas y también a que el esqueleto de poliamida es más flexible. Debido a esto, los dúplex de APN/ADN se unen en una serie más amplia de condiciones de rigurosidad que los dúplex de ADN/ADN, haciendo que sea más fácil realizar hibridaciones múltiples. Pueden usarse sondas más pequeñas que con el ADN debido a la fuerte unión. Además, es más probable que puedan determinarse los desacoplamientos de una sola base con la hibridación de APN/ADN debido a que un solo desacoplamiento en un híbrido APN/ADN de 15 unidades reduce el punto de fusión (T_{sub.m}) en 8°-20°C, frente a 4°-16°C para el dúplex de ADN/ADN de 15 unidades. Además, la ausencia de grupos cargados en el APN significa que la hibridación puede realizarse a bajas concentraciones iónicas reduciéndose la posible interferencia por las sales durante el análisis.

El ADN puede ser, por ejemplo, ADNc. Preferiblemente, el ADN es un ADN genómico. El ARN puede ser, por ejemplo, ARNm. La molécula de ácido nucleico puede ser natural, sintética o semisintética o puede ser un derivado, tal como un ácido péptido nucleico (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500) o fosforotioatos. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico quimérica producida de forma recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente solas o en combinación.

La molécula de ácido nucleico antes descrita puede ser parte de un vector. Por lo tanto, la presente invención se refiere, en otra realización, a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de esta invención. Este vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética, y puede comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permitan la selección de dicho vector en una célula hospedadora adecuada y en condiciones adecuadas.

Las moléculas de ácido nucleico antes descritas pueden insertarse en varios vectores disponibles en el mercado. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores plasmídicos compatibles con células de mamífero, tales como pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMT-neo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pLZD35, pLXIN y pSIR (Clontech) y pIRES-EGFP (Clontech). En el mercado también están disponibles vectores de Baculovirus tales como pBlueBac, el sistema de expresión de baculovirus BacPacz (CLONTECH) y el sistema de expresión en baculovirus MaxBac™, células de insecto y protocolos (Invitrogen), y también pueden usarse para producir altos rendimientos de proteínas biológicamente activas. (Véase también, Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, p. 127). Además, son ejemplos no limitantes de otros vectores adecuados para uso en este documento vectores procarióticos tales como pcDNA2; y vectores de levadura tales como pYes2. Como técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001), loc. cit. Los vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más cassettes de expresión.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden sintetizarse por métodos convencionales, aislarse a partir de fuentes naturales o prepararse como híbridos. El ligamiento de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores y/o aislantes) y/o a otras secuencias de aminoácidos codificantes puede realizarse usando métodos establecidos.

Adicionalmente, los vectores pueden comprender, además de las secuencias de ácido nucleico antes descritas, elementos de control de la expresión, permitiendo la expresión apropiada de las regiones codificantes en hospedadores adecuados. Estos elementos de control son conocidos para el especialista en la técnica y pueden incluir un promotor, codón de inicio de la traducción, sitio de traducción e inserción o sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) para introducir un inserto en el vector. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está unida operativamente a dichas secuencias de control de la expresión permitiendo la expresión en células procariotas o eucariotas. En este contexto se prefieren particularmente secuencias de control que permiten la expresión correcta en células neuronales y/o células derivadas de tejido nervioso.

Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas y procariotas son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Como se ha mencionado anteriormente, normalmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Otros elementos reguladores pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción, y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión, por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero comprenden el promotor de timidina quinasa de CMV-HSV, SV40, promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor 1 α del factor de elongación humano, el potenciador de CMV, promotor de CaM-quinasa o potenciador de SV40.

Para la expresión, por ejemplo, en tejido nervioso y/o células derivadas del mismo, en la técnica son bien conocidas varias secuencias reguladoras, tales como la secuencia promotora mínima del neurofilamento L humano (Charron, J. Biol. Chem. 270 (1995), 25739-25745). Para la expresión en células procariotas, se han descrito una multitud de promotores incluyendo, por ejemplo, el promotor tac-lac, el promotor lacUV5 o el promotor trp. Aparte de los elementos que son responsables para el inicio de la transcripción, estos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, cadena abajo del polinucleótido. En este contexto, en la técnica se conocen vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Farmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), como se usa, entre otros en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), o vectores de expresión procarióticos tales como lambda gt11.

Un vector de expresión de acuerdo con esta invención es al menos capaz de dirigir la replicación, y preferiblemente la expresión, de los ácidos nucleicos y proteína según se describe antes. Los orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación de Col E1, el origen de replicación viral de SV40 y el origen de replicación de M 13. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de iacZ, el promotor de gai10 y el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Las secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovina, SV40, iacZ y señales de poliadenilación poliédricas de AcMNPV. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina y similares. Los vectores diseñados específicamente permiten la transposición de ADN entre diferentes células hospedadoras tales como bacterias-levaduras, bacterias-células animales, bacterias-células fúngicas o bacterias-células de invertebrados.

Aparte de las moléculas de ácido nucleico antes descritas, el vector puede comprender además secuencias de ácido nucleico que codifican señales de secreción. Estas secuencias son bien conocidas para el especialista en la técnica. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, en la secuencia codificante de las moléculas de ácido nucleico pueden añadirse secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular, y son bien conocidas en la técnica. La o las secuencias líder se ensamblan en la fase apropiada con secuencias de traducción, inicio y terminación y, preferiblemente, con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de la misma, entre otros sitios, dentro de la membrana extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C- o N-terminal que confiere

características deseadas, por ejemplo, estabilización o una purificación simplificada del producto recombinante expresado. Una vez incorporado el vector en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, cuando se desee, puede seguirse por la recogida y purificación de las proteínas, fragmentos antigénicos o proteínas de fusión. Por supuesto, el vector también puede comprender regiones reguladoras de organismos patógenos.

Además, dicho vector también puede ser, además de un vector de expresión, un vector de transferencia génica y/o de dirección génica. La terapia génica, que se basa en la introducción de genes terapéuticos (por ejemplo para vacunación) en células por técnicas *ex-vivo* o *in-vivo* es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia de genes. Los vectores, sistemas de vectores y métodos adecuados para la terapia génica *in-vitro* o *in-vivo* se describen en la bibliografía y son bien conocidos para el especialista en la técnica; véase, por ejemplo, *Giordano*, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; *Schaper*, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; *Anderson*, Science 256 (1992), 808-813; *Isner*, Lancet 348 (1996), 370-374; *Muhlhauser*, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; *Wang*, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO 94/29469; WO 97/00957; *Schaper*, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 o *Verma*, Nature 389 (1997), 239-242 y las referencias citadas en estos documentos.

Las moléculas de ácido nucleico y los vectores como se han descrito anteriormente en este documento pueden diseñarse para la introducción directa o para la introducción a través de liposomas o vectores virales (por ejemplo, adenovirales o retrovirales) en la célula. Además, pueden usarse sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus vaccinia o Virus Semliki Forest como sistemas de expresión eucarióticos para las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento. Además de la producción recombinante, pueden producirse fragmentos de la proteína, la proteína de fusión o fragmentos antigénicos por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (véase *Stewart et al.*, (1969) Solid Phase Peptide Synthesis; *Freeman Co*, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154). La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o por medio de una automatización. La síntesis automática puede conseguirse, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Varios fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.

La presente solicitud describe, además, un hospedador transformado con un vector o un hospedador antes descrito que comprende la molécula de ácido nucleico antes descrita. Dicho hospedador se puede producir introduciendo dicho vector o secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora que, en su presencia en la célula, media la expresión de una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos o que comprende una secuencia de nucleótidos o un vector, siendo la secuencia de nucleótidos y/o el polipéptido codificado extraño para la célula hospedadora.

Por "extraño" se entiende que la secuencia de nucleótidos y/o el polipéptido codificado es heterólogo con respecto al hospedador, que significa derivado de una célula u organismo con una base genómica diferente, o es homólogo con respecto al hospedador pero está localizado en un entorno genómico diferente que el del homólogo natural de dicha secuencia de nucleótidos. Esto significa que si la secuencia de nucleótidos es homóloga con respecto al hospedador, no se localiza en su localización natural en el genoma de dicho hospedador, en particular está rodeada por genes diferentes. En este caso, la secuencia de nucleótidos puede estar bajo el control de su propio promotor o bajo el control de un promotor heterólogo. La localización de la molécula de ácido nucleico introducida o el vector puede determinarse por el especialista en la técnica usando métodos bien conocidos por dicho especialista en la técnica, por ejemplo, Transferencia de Southern. El vector o la secuencia de nucleótidos que está presente en el hospedador puede estar integrada en el genoma del hospedador o puede mantenerse en alguna forma extracromosómicamente. A este respecto, también se entenderá que la secuencia de nucleótidos puede usarse para restaurar o crear un gen mutante por recombinación homóloga.

Dicho hospedador puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Son células procariotas/bacterianas adecuadas las usadas generalmente para clonación, tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* o *Bacillus subtilis*. Dicho hospedador eucariota puede ser una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula bacteriana (por ejemplo, las cepas de *E. coli* HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 y JM101). Se prefieren células hospedadoras recombinantes eucariotas. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas incluyen, pero sin limitación, levaduras, por ejemplo células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*, líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, de mono y de roedor, así como células de insecto, incluyendo pero sin limitación células de insecto *Spodoptera frugiperda* y células de insecto derivadas de *Drosophila*, así como células de pez cebra. Las líneas celulares derivadas de especies de mamífero adecuadas para uso y disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, células L, células CV-1, células COS-1 (ATCC CRL 1650), células COS-7 (ATCC CRL 1651), células HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) y MRC-5 (ATCC CCL 171).

En una forma de realización particularmente preferida, dicha célula de mamífero es una célula neuronal y/o una célula cultivada tal como, entre otras, una célula HEK 293 (riñón embrionario humano), una célula CHO, HeLa, NIH3T3, BHK, PC12 o una célula madre neuronal preferiblemente derivada de un mamífero y más preferiblemente de un ser humano.

En otra forma de realización más preferida, dicha célula de anfibio es un oocito. En una forma de realización incluso más preferida, dicho oocito es un oocito de rana, particularmente preferido un oocito de *Xenopus laevis*.

Preferiblemente, el hospedador es un organismo transgénico no humano. Dicho organismo no humano puede ser un mamífero, anfibio, un pez, un insecto, un hongo o una planta. Son animales transgénicos no humanos particularmente preferidos especies de *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, especies de *Xenopus*, pez cebra, *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica*, ratones y ratas. Las plantas transgénicas comprenden, pero sin limitación, trigo, tabaco, perejil y *Arabidopsis*. Los hongos transgénicos también son bien conocidos en la técnica y comprenden, entre otros, levaduras tales como *S. pombe* o *S. cerevisiae*, especies de *Aspergillus*, *Neurospora* o *Ustilago* o especies de *Pichia*.

La presente solicitud describe un método para producir el polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico antes descrita que comprende cultivar/desarrollar el hospedador antes descrito y aislar el polipéptido producido.

En la técnica existen un gran número de métodos adecuados para producir polipéptidos en hospedadores apropiados. Si el hospedador es un organismo unicelular o una célula de mamífero o insecto, la persona especialista en la técnica puede volver a una diversidad de condiciones de cultivo que pueden optimizarse adicionalmente sin una carga excesiva de trabajo. Convenientemente, la proteína producida se recoge del medio de cultivo o de membranas (biológicas) aisladas por técnicas establecidas. Además, el polipéptido producido puede aislarse directamente a partir de la célula hospedadora. Dicha célula hospedadora puede ser parte o puede derivar de una parte de un organismo hospedador, por ejemplo, dicha célula hospedadora puede ser parte del SNC de un animal o la parte cosechable de una planta. Además, el polipéptido producido puede aislarse de fluidos derivados de dicho hospedador, tal como sangre, leche o líquido cefalorraquídeo.

Adicionalmente se describen en este documento polipéptidos representados en las SEC ID N°: 5 a 12 que se codifican por las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento. Estos polipéptidos, por consiguiente, pueden producirse por métodos microbiológicos o por mamíferos transgénicos o por plantas transgénicas. Como alternativa, estos polipéptidos pueden producirse sintética o semisintéticamente.

Por ejemplo, puede usarse síntesis química tal como el procedimiento en fase sólida descrito por *Houghton Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (82) (1985), 5131-5135. Otro método es la traducción *in vitro* de ARNm. Un método preferido implica la producción recombinante de proteínas en células hospedadoras como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, pueden sintetizarse secuencias de ácido nucleico que comprenden todo o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en este documento por PCR, insertarse en un vector de expresión y una célula hospedadora puede transformarse con el vector de expresión. Posteriormente, la célula hospedadora se cultiva para producir el polipéptido deseado, que se aísla y purifica. El aislamiento y purificación de proteínas puede conseguirse por una cualquiera de varias técnicas conocidas; por ejemplo y sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa, electroforesis en gel preparativa con disco. Además, pueden usarse sistemas de traducción sin células para producir los polipéptidos descritos en este documento. Los sistemas de expresión sin células adecuados para uso de acuerdo con la presente solicitud incluyen lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas microsomaes pancreáticas caninas, extracto S30 de *E. coli* y sistemas de transcripción/traducción acoplados tales como el sistema TNT (Promega). Estos sistemas permiten la expresión de polipéptidos o péptidos recombinantes tras la adición de vectores de clonación, fragmentos de ADN o secuencias de ARN que contienen regiones codificantes y elementos promotores apropiados. Como se ha mencionado *supra*, las técnicas de aislamiento/purificación de proteínas pueden requerir la modificación usando métodos convencionales. Por ejemplo, puede añadirse una señal de histidina a la proteína para permitir la purificación en una columna de níquel. Otras modificaciones pueden producir una mayor o menor actividad, permitir mayores niveles de producción de proteínas o simplificar la purificación de la proteína.

Los polipéptidos antes descritos se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos dirigido específicamente a un polipéptido de este tipo, donde dicho anticuerpo reacciona específicamente con un epítipo generado y/o formado por la mutación en el canal iónico de apertura por ATP P2X7R seleccionado entre el grupo compuesto por:

(i) un epítipo presentado específicamente por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R, donde el resto R (Arg), G (Gly), E (Glu), L (Leu), R (Arg), I (Ile) o R (Arg) que corresponde a la posición 117, 150, 186, 191, 270, 568 ó 578 del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre como se representa en la SEC ID N°: 3 ó 4 se reemplaza por otro resto aminoacídico; y

(ii) un epítipo presentado específicamente por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R, donde se delecionan los aminoácidos correspondientes a las posiciones 488 a 494 del canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre como se representa en la SEC ID N°: 3 ó 4, para la preparación de una composición de diagnóstico para detectar un trastorno afectivo.

Con respecto a los aspectos preferidos de (i) y (ii) se aplica lo mismo que se ha descrito anteriormente en relación con las moléculas de ácido nucleico. El término “específicamente” en este contexto significa que el anticuerpo reacciona con la proteína P2X7R mutante pero no con una proteína P2X7R de tipo silvestre. Preferiblemente, este término también significa que dicho anticuerpo no se une a otras formas mutantes de la proteína P2X7R, en particular las descritas en este documento. Si el anticuerpo reacciona específicamente como se ha definido anteriormente en este documento puede ensayarse fácilmente, entre otros métodos, comparando la reacción de dicho anticuerpo con un canal iónico de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre (o una subunidad o fragmento del mismo) con la reacción de dicho anticuerpo con un polipéptido P2X7R mutante de la invención.

El anticuerpo puede ser, por ejemplo, policlonal o monoclonal. El término “anticuerpo” también comprende derivados o fragmentos del mismo que retienen la especificidad de unión. Las técnicas para la producción de anticuerpos son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Harlow y Lane* “Antibodies, A Laboratory Manual”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para la inmunoprecipitación e inmunolocalización de los polipéptidos antes descritos, así como para el control de la presencia de dichos polipéptidos, por ejemplo, en organismos recombinantes o en diagnóstico. También pueden usarse para la identificación de compuestos que interaccionan con las proteínas antes descritas (como se menciona en este documento más adelante). Por ejemplo, puede usarse la resonancia de plasmón superficial como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos contra fagos que se unen a un epítipo del polipéptido (*Schier*, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; *Malmborg*, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Se pueden concebir anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados así como fragmentos de anticuerpo tales como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo, *Harlow y Lane*, loc. cit.. En la técnica se conocen diversos procedimientos y pueden usarse para la producción de estos anticuerpos y/o fragmentos. De esta manera, los derivados (anticuerpos) pueden producirse por peptidomiméticos. Además, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otras, la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios contra polipéptidos descritos en este documento. Además, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra los polipéptidos antes descritos. Más preferiblemente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos de estas técnicas incluyen la técnica de hibridoma (*Köhler y Milstein* Nature 256 (1975), 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (*Kozbor*, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (*Cole et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Las técnicas que describen la producción de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios contra polipéptidos inmunogénicos como los descritos anteriormente. Además, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados dirigidos contra dichos polipéptidos inmunogénicos. En particular se prefiere que las construcciones de anticuerpos/anticuerpo, así como los fragmentos o derivados de anticuerpo sean capaces de expresarse en una célula. Esto puede conseguirse, entre otros métodos, por inyección directa de las moléculas proteicas correspondientes o por inyección de moléculas de ácido nucleico que las codifican. Además, se prevén estrategias de terapia génica. Por consiguiente, la expresión “molécula de anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulina enteras así como a partes de dichas moléculas de inmunoglobulina. Además, el término, como se ha descrito anteriormente, se refiere a moléculas de anticuerpo modificadas y/o alteradas, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados. El término también se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales así como a anticuerpos generados de forma recombinante o por síntesis/anticuerpos sintetizados. El término también se refiere a anticuerpos intactos así como a fragmentos de dichos anticuerpos, tales como cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. La expresión “molécula de anticuerpo” también comprende anticuerpos bifuncionales y construcciones de anticuerpos, tales como Fv monocatenarios (scFv) o proteínas de fusión de anticuerpo. También se prevé en el contexto de esta invención que el término “anticuerpo” comprende construcciones de anticuerpo que pueden expresarse en células, por ejemplo, construcciones de anticuerpo que pueden introducirse por transfección y/o transducción a través de, entre otras moléculas, virus o vectores. Se prevé particularmente que estas construcciones de anticuerpo reconozcan específicamente a los polipéptidos antes descritos. Además, se prevé que dicha construcción de anticuerpos se emplee en estrategias de terapia génica.

También se describe en este documento un aptámero que se une específicamente a un polipéptido antes descrito, donde dicho aptámero reacciona con un epítipo de un polipéptido de este tipo. Además, se describe en este documento un aptámero dirigido específicamente a una molécula de ácido nucleico correspondiente según se describe antes.

Cuando se utiliza en este documento, el término “aptámero” significa moléculas de ácido nucleico que pueden unirse a moléculas diana. Los aptámeros comúnmente comprenden ARN, ADN monocatenario, ARN modificado o moléculas de ADN modificadas. La preparación de aptámeros es bien conocida en la técnica y puede implicar, entre otras cosas, el uso de bibliotecas de ARN combinatorias para identificar sitios de unión (*Gold*, Ann. Rev. Biochem. 64 (1995), 763-797).

Además, la presente invención describe un cebador o un par de cebadores capaces de amplificar específicamente las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento. El término “cebador”, cuando se usa en este documento, significa una molécula de ácido nucleico monocatenaria capaz de hibridar con la molécula de ácido nucleico antes descrita y, por lo tanto, que puede servir como punto de partida para la amplificación. Dicho término también comprende oligorribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que son complementarios a una región de una de las cadenas de una molécula de ácido nucleico según se describe en este documento. Cuando se utiliza en este documento, la expresión “par de cebadores” significa un par de cebadores que están dirigidos en la dirección opuesta entre sí, con respecto a una región complementaria de una molécula de ácido nucleico, para permitir, por ejemplo, la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El término “amplificación” se refiere a la copia repetida de una secuencia especificada de nucleótidos dando como resultado un aumento en la cantidad de dicha secuencia especificada de nucleótidos y permite la generación de una

- multitud de moléculas de ácido nucleico idénticas o esencialmente idénticas (es decir, con una identidad de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98%, incluso más preferiblemente de al menos 99% y aún más preferiblemente de al menos 99,5%, tal como de 99,9%) o partes de las mismas. Estos métodos están bien establecidos en la técnica; véase Sambrook *et al.* "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición 1989, CSH Press, Cold Spring Harbor.
- 5 Incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y modificaciones de la misma, y reacción en cadena de la ligasa (LCR) por nombrar algunos métodos de amplificación preferidos.

10 Cuando se usan en el contexto de los cebadores, el término "específicamente" significa que sólo se amplifican las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento anteriormente y no se amplifican las moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre representado en la SEC ID N°: 1. De esta manera, un cebador, según se describe en este documento, es preferiblemente un cebador que se une a una región de una molécula de ácido nucleico descrita en este documento que es única para esta molécula y que no está presente en la secuencia codificante de P2X7R de tipo silvestre, es decir, el cebador se une en una región en la que se produce una de las mutaciones descritas anteriormente. En relación con un par de cebadores de acuerdo con la invención, es posible que uno de los cebadores del par sea específico en el sentido descrito anteriormente o que los dos cebadores del par sean específicos. En ambos casos, el uso de dicho par de cebadores permitiría amplificar específicamente un mutante de la invención como se ha descrito anteriormente en este documento, pero no la secuencia codificante de P2X7R de tipo silvestre.

20 El extremo 3'-OH de un cebador se usa por una polimerasa para extenderse por la incorporación sucesiva de nucleótidos. El cebador o par de cebadores puede usarse, por ejemplo, en experimentos de extensión de cebadores sobre una plantilla de ARN de acuerdo con los métodos conocidos por el especialista en la técnica. Preferiblemente, el cebador o par de cebadores se usan para reacciones de amplificación sobre la plantilla de ARN o la plantilla de ADN, preferiblemente ADNc o ARN genómico. Las expresiones "plantilla de ADN" o "plantilla de ARN" se refieren a moléculas de ADN o ARN o fragmentos de las mismas de cualquier fuente o composición de nucleótidos, que comprenden una secuencia de nucleótidos diana como se ha definido anteriormente. El cebador o par de cebadores también puede usarse para experimentos de hibridación como los conocidos en la técnica. Preferiblemente, el cebador o par de cebadores se usan en reacciones en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias que corresponden a una secuencia de la molécula de ácido nucleico antes descrita. Se sabe que la longitud de un cebador se obtiene a partir de diferentes parámetros (Gillam, Gene 8 (1979), 81-97; Innis, PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, USA (1990)). Preferiblemente, el cebador sólo debe hibridar o unirse con una región específica de una secuencia de nucleótidos diana. La longitud de un cebador que hibrida estadísticamente sólo en una región de una secuencia de nucleótidos diana puede calcularse por la siguiente fórmula: $(1/4)^x$ (donde x es la longitud del cebador). Por ejemplo, un hepta- u octanucleótido sería suficiente para unirse estadísticamente sólo una vez en una secuencia de 37 kb. Sin embargo, se sabe que un cebador que corresponde exactamente a una cadena de plantilla complementaria debe tener al menos una longitud de 9 pares de bases, de lo contrario no podría generarse una doble cadena estable (Goulian, Biochemistry 12 (1973), 2893-2901). También se prevé que pueden usarse algoritmos basados en ordenador para diseñar cebadores capaces de amplificar las moléculas de ácido nucleico antes descritas. Preferiblemente, los cebadores tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 12 nucleótidos, incluso más preferiblemente de al menos 15 nucleótidos, de una forma particularmente preferida de al menos 18 nucleótidos, de una forma incluso particularmente más preferida de al menos 20 nucleótidos y aún más preferiblemente de al menos 25 nucleótidos.

45 También se prevé que el cebador o par de cebadores esté marcado. El marcador puede ser, por ejemplo, un marcador radiactivo tal como ^{32}P , ^{33}P o ^{35}S . Preferiblemente, el marcador es un marcador no radiactivo, por ejemplo, digoxigenina, biotina y un colorante fluorescente o un tinte. Preferiblemente, dichos cebadores se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID N°s 52 a 111.

50 Todavía en otro aspecto, la presente solicitud describe una composición de diagnóstico que comprende una molécula de ácido nucleico, un vector, un polipéptido, un anticuerpo, un aptámero y/o un cebador o par de cebadores según se describe en este documento.

55 El término "composición", como se usa de acuerdo con este documento, se refiere a composiciones que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico, vector, polipéptido, un anticuerpo y/o cebador o par de cebadores según se describe en este documento. Opcionalmente, puede comprender moléculas adicionales capaces de alterar las características del componente descrito en este documento y de esta manera, por ejemplo, suprimir, bloquear, modular y/o activar su función, que tienen propiedades neuroprotectoras, nootrópicas, antidepresivas y/o protectoras de las células como se describirá más adelante en este documento. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras, en forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución (soluciones) o (un) aerosol(es).

65 Preferiblemente, la composición es una composición de diagnóstico que opcionalmente comprende, además, medios adecuados para su detección. Como se ha descrito anteriormente, sorprendentemente se encontró que mutaciones en la proteína P2X7R están relacionadas con trastornos afectivos. De esta manera, este conocimiento permite diagnosticar trastornos afectivos de una forma fácil. La composición de diagnóstico comprende al menos uno de los compuestos mencionados anteriormente de la invención. La composición de diagnóstico puede usarse, entre otras cosas, para métodos para determinar la presencia y/o expresión de los ácidos nucleicos y/o polipéptidos descritos en este documento. Esto puede realizarse por medio de la detección, por ejemplo, de la presencia de un gen correspondiente

en el material genético de un individuo o la presencia del ARNm correspondiente que comprende el aislamiento del ADN o ARN a partir de una célula derivada de dicho individuo, la puesta en contacto del ADN o ARN obtenido de esta manera con una sonda de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente en condiciones de hibridación, y la detección de la presencia de ARNm hibridados con la sonda. Como alternativa, la composición de diagnóstico también puede usarse para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico descrita en este documento por PCR. Además, los polipéptidos descritos en este documento pueden detectarse por métodos conocidos en la técnica que comprenden, entre otros, métodos inmunológicos tales como RIA, FIA, ELISA, FACS o transferencia de Western.

Además, la composición de diagnóstico puede ser útil, entre otras cosas, para detectar la prevalencia, el inicio o el progreso de una enfermedad relacionada con la expresión de un polipéptido antes descrito. Por consiguiente, la composición de diagnóstico de la invención puede usarse, entre otras cosas, para evaluar la prevalencia, el inicio y/o el estado de enfermedad de trastornos afectivos, como se han definido anteriormente en este documento. También se contempla que la composición de diagnóstico puede ser útil para distinguir entre las fases de una enfermedad.

La composición de diagnóstico opcionalmente comprende medios adecuados para la detección. La(s) molécula(s) de ácido nucleico, vector(es), hospedador(es), anticuerpo(s), aptámero(s) y polipéptido(s) descritos anteriormente son adecuados, por ejemplo, para uso en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unirse a un soporte en fase sólida. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, ion polivinílico, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales o modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. El soporte puede ser de naturaleza soluble o insoluble.

Los soportes de fase sólida son conocidos por los especialistas en la técnica y pueden comprender perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membrana, láminas, duracitos y las paredes de pocillos de una bandeja de reacción, tubos de plástico u otros tubos de ensayo. Los métodos adecuados para inmovilizar molécula(s), vector(es), hospedador(es), anticuerpo(s), aptámero(s), polipéptido(s), etc. sobre las fases sólidas incluyen, pero sin limitación, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes o reticulación (química) y similares. Son ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar los compuestos descritos en este documento inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los ensayos de detección usados comúnmente pueden comprender métodos con radioisótopos o sin radioisótopos. Son ejemplos de dichos inmunoensayos el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo de sándwich (ensayo inmunométrico) y el ensayo de transferencia de Northern o de Southern. Además, estos métodos de detección comprenden, entre otros, IRMA (Ensayo Radioinmunométrico Inmune), EIA (Ensayo Inmuno Enzimático), ELISA (Ensayo Inmune Asociado a Enzimas), FIA (Ensayo Inmune Fluorescente) y CLIA (Ensayo Inmune Quimioluminiscente). Además, los compuestos de diagnóstico de la presente invención pueden emplearse en técnicas tales como FRET (Transferencia de Energía de Resonancia por Fluorescencia).

Los especialistas habituales en la técnica conocen los marcadores y métodos de marcaje apropiados. Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse incluyen, entre otros, fluorocromos (tales como fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, etc.), enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radiactivos (tales como ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S o ^{125}I), biotina, digoxigenina, metales coloidales y compuestos quimio- o bioluminiscentes (tales como dioxetanos, luminol o acridinio).

Se dispone de una diversidad de técnicas para marcar biomoléculas, que son bien conocidas para el especialista en la técnica y comprenden, entre otras, acoplamiento covalente de enzimas o grupos biotinilo, fosforilaciones, biotinilaciones, cebado aleatorio, traducciones con muesca, adición de colas (usando transferasas terminales). Estas técnicas, por ejemplo, se describen en *Tijssen*, "Practice and theory of enzyme immunoassays", *Burden and von Knippenburg* (Eds), Volume 15 (1985); "Basic methods in molecular biology", Davis LG, Dibner MD, Battery Elsevier (1990); *Mayer*, (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987); o en la serie "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.

Los métodos de detección comprenden, pero sin limitación, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc.

Dicha composición de diagnóstico puede usarse en métodos para detectar la presencia y/o abundancia de una molécula de ácido nucleico antes descrita en una muestra biológica y/o médica y/o para detectar la expresión de dicha molécula de ácido nucleico (por ejemplo, determinando el ARNm o el polipéptido expresado). Además, dicha composición de diagnóstico también puede usarse en métodos descritos en este documento, entre otras cosas, para la detección de antagonistas o agonistas específicos para canales iónicos de apertura por ATP P2X7R (véase en este documento más adelante).

En este documento se describe un método para diagnosticar un trastorno afectivo o una susceptibilidad a un trastorno afectivo, que comprende la etapa de determinar en una muestra obtenida a partir de un individuo si la proteína P2X7R expresada en las células de dicho individuo es no funcional muestra una apertura por ATP alterada en comparación con la proteína P2X7R de tipo salvaje o está sobre- o infra-expresada en comparación con el nivel de proteína P2X7R de un individuo no afectado.

La expresión “sobre- o infraexpresada en comparación con el nivel de proteína P2X7R” en el contexto en este documento significa que el nivel de proteína P2X7R es mayor o menor que el nivel de P2X7R de un individuo sano, es decir, un individuo no afectado por un trastorno afectivo. La sobreexpresión puede deberse, por ejemplo, a una mayor cantidad de ARNm de P2X7R producida por velocidades de transcripción aumentadas debido a la mayor actividad de la ARN polimerasa II. Por consiguiente, la cantidad de ARNm puede conducir a un aumento de la traducción y, de esta manera, a un mayor nivel de proteína P2X7R. También es posible que una mayor cantidad de proteína P2X7R se deba a una mayor estabilidad de la proteína. Una infraexpresión de proteína P2X7R puede deberse a bajas velocidades de transcripción del gen P2X7R y, de esta manera, cantidades insuficientes de ARNm de P2X7R sólo producen una baja cantidad de proteína P2X7R. Otra razón puede ser que la proteína P2X7R sea inestable y, de esta manera, no esté presente en cantidades comparables al nivel de proteína de tipo silvestre.

La infra- o sobreexpresión de proteína P2X7R puede determinarse por métodos bien conocidos para la persona especialista en la técnica. Éstos incluyen, pero sin limitación, métodos para determinar la cantidad de ARNm o la cantidad y/o actividad de la proteína. Son ejemplos análisis de Transferencia de Northern o técnicas de base inmune, tales como Transferencia de Western.

“No funcional” significa que la proteína P2X7R ha perdido al menos una propiedad funcional que presenta la proteína P2X7R de tipo silvestre como se ha descrito en este documento anteriormente. Preferiblemente, “no funcional” significa que la proteína P2X7R ya no funciona como canal. La no funcionalidad puede deberse, por ejemplo, al hecho de que un alelo que aparece en un individuo codifique una proteína P2X7R que conduce a dímeros no funcionales (mutación dominante negativa). Si una proteína P2X7R en un individuo es funcional o no funcional puede determinarse por los métodos descritos en este documento anteriormente y en los ejemplos.

La expresión “apertura por ATP alterada” significa que la proteína P2X7R respectiva reacciona al ATP de una forma diferente que la proteína P2X7R de tipo silvestre. Esto puede determinarse como se describe en los ejemplos adjuntos o como se ha descrito anteriormente en este documento.

En el contexto del diagnóstico, no sólo podría tener valor diagnóstico la actividad de la P2X7R, sino también la cantidad de expresión. Por ejemplo, si un polimorfismo afecta a la estabilidad del ARN o a la eficacia de traducción, esto podría conducir a una menor expresión de la proteína P2X7R no sólo en el hipocampo, sino también en la sangre. Por lo tanto, se podría especular que una menor cantidad de P2X7 detectada por transferencia de western en células sanguíneas podría estar relacionada con una depresión.

Otro aspecto descrito en este documento es un método para diagnosticar un trastorno afectivo o una susceptibilidad a un trastorno afectivo que comprende la etapa de determinar en una muestra obtenida a partir de un individuo si la secuencia del gen P2X7R o la proteína codificada del mismo comprende una mutación como se define en este documento en comparación con la secuencia P2X7R de tipo silvestre.

Un aspecto preferido describe un método, donde una mutación es una mutación en la secuencia de P2X7R como se ha definido anteriormente en este documento y/o un reemplazo o delección de nucleótidos seleccionados de la siguiente Tabla C que indica en la columna “Región de P2X7R” la región de la secuencia de nucleótidos genómica de P2X7R en la que se produce el reemplazo o delección, en la columna “Nucleótido” de la Tabla C el nucleótido que se reemplaza por otro nucleótido o los nucleótidos que se delecionan y en la columna “Posición en tipo silvestre” de la Tabla C la posición correspondiente en la secuencia de nucleótidos del canal iónico de apertura por ATP de tipo silvestre P2X7R como se representa en la SEC ID N°: 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 293 114 T3

TABLA C

5	Región de P2X7R	Nucleótido	Posición en tipo silvestre
	5'UTR	T	532
10	5'UTR	A	1100
	5'UTR	A	1122
	5'UTR	C	1171
15	5'UTR	T	1351
	5'UTR	G	1702
20	5'UTR	T	1731
	5'UTR	C	1860
	5'UTR	C	2162
25	5'UTR	C	2238
	5'UTR	A	2373
30	5'UTR	G	2569
	5'UTR	G	2702
	intrón 1	G	3166
35	intrón 1	C	24778
	intrón 1	C	24830
40	exón 2	T	24942
	exón 3	C	26188
	exón 3	A	26308
45	exón 3	G	26422
	intrón 4	G	32394
	intrón 4	T	32434
50	exón 5	G	32493
	exón 5	G	32506
55	exón 5	C	32507
	exón 5	C	32548
	intrón 5	A	32783
60	intrón 5	T	35309
	intrón 5	C	35374
65	intrón 5	A	35378

ES 2 293 114 T3

	exón 6	G	35438
5	exón 6	T	35454
	intrón 6	T	35549
	intrón 6	G	35641
10	intrón 6	A	35725
	intrón 6	T	36001
	intrón 6	A	36064
15	intrón 6	delección de GTTT	de 36091 a 36094
	intrón 6	C	36108
20	intrón 7	C	36374
	intrón 7	G	36378
	intrón 7	T	36387
25	intrón 7	G	36398
	intrón 7	C	37439
30	intrón 7	T	37513
	exón 8	C	37604
	exón 8	G	37605
35	exón 8	G	37623
	exón 8	C	37633
40	intrón 9	C	47214
	exón 11	G	47383
	exón 11	C	47411
45	intrón 11	T	47563
	intrón 12	C	54307
	intrón 12	G	54308
50	exón 13	C	54399
	exón 13	A	54480
55	exón 13	C	54523
	exón 13	delección de CCCTGAGAGCCACAGGTGCCT	de 54562 a 54582
60	exón 13	A	54588
	exón 13	C	54664
65	exón 13	G	54703

exón 13	A	54804
exón 13	G	54834
exón 13	G	54847
3'UTR	G	54925
3'UTR	C	55169
3'UTR	A	55170
3'UTR	A	55171
3'UTR	C	55917

Como se ha indicado anteriormente, si el nucleótido respectivo que se reemplaza por otro nucleótido es una base de purina, se prefiere que se reemplace por otra base de purina. Si es una base de pirimidina, se prefiere que se reemplace por otra base de pirimidina. También se prefiere que una base de purina se reemplace por una base de pirimidina y que una base de pirimidina se reemplace por una base de purina. Lo más preferido es que los nucleótidos indicados en la Tabla C se reemplacen por los nucleótidos indicados en la posición respectiva de la Tabla 12 presentada más adelante (véase el Ejemplo 3).

Otro aspecto descrito en este documento es una composición de diagnóstico diseñada para uso en un método en el que se determina la aparición de la mutación en el gen del canal iónico de apertura por ATP P2X7R por PCR, métodos inmunológicos y/o métodos electrofisiológicos como se describe más adelante en este documento y en los ejemplos adjuntos. Además, es posible determinar la aparición de una mutación en el canal iónico de apertura por ATP P2X7R como se ha descrito anteriormente en este documento.

Todavía otro aspecto descrito en este documento describe el uso de una molécula de ácido nucleico, un vector, un polipéptido, un anticuerpo, aptámero y/o un cebador o par de cebadores para la preparación de una composición diagnóstica para la detección de un trastorno afectivo.

También se describen en este documento métodos para diagnosticar un trastorno afectivo de un individuo, que comprenden:

(a) aislar ADN a partir de células obtenidas de un individuo;

(b) determinar todo o parte de la composición de nucleótidos del gen P2X7R; y

(c) analizar dicha composición de nucleótidos de P2X7R con respecto a la presencia de uno o más polimorfismos, mutaciones o variaciones alélicas como se definen en este documento.

El término “gen” significa una secuencia de nucleótidos asociada con la producción de una proteína, incluyendo secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, secuencias de intrones, secuencias de exones, regiones codificantes, región 5' no traducida (5'UTR), región 3' no traducida (3'UTR) y variantes de corte y empalme.

En los métodos descritos en este documento, el individuo es un mamífero y más preferiblemente un ser humano. Además, las células preferiblemente proceden de piel, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo.

Los métodos descritos en este documento para el diagnóstico de un trastorno afectivo de acuerdo con la composición de un marcador genético que corresponde al gen P2X7R. Como se demuestra por los ejemplos adjuntos, los polimorfismos en la proteína P2X7R están asociados genéticamente con pacientes que padecen un trastorno afectivo.

Por consiguiente, el diagnóstico de un trastorno afectivo puede realizarse, por ejemplo, aislando células de un individuo y aislando el ADN genómico de dichas células. Estas células pueden recogerse a partir de fluidos corporales, piel, cabello, biopsias y otras fuentes. La colección y el análisis de las células de fluidos corporales tales como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo es bien conocido en la técnica; véase, por ejemplo, Rodak, “Haematology: Clinical Principles & Applications” segunda ed., WB Saunders Co, 2002; Brunzel, “Fundamentals of Urine and Body Fluids Analysis”, WB Saunders Co, 1994; Hemdon y Brumback (Ed.), “Cerebrospinal Fluid”, Kluwer Academic Pub., 1989. Además, en la técnica están bien descritos métodos para el aislamiento de ADN; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Una vez aislado el ADN, pueden diseñarse diversos cebadores oligonucleotídicos que abarquen el locus de P2X7R para amplificar el material genético por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En libros de texto convencionales, pueden encontrarse métodos convencionales para diseñar, sintetizar y producir dichos cebadores oligonucleotídicos y realizar la amplificación por PCR, véase, por ejemplo, *Agrawal* (Ed.), "Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology, 20)", Humana Press, 1993; *Innis et al.* (Ed.), "PCR Applications: Protocols for Functional Genomics", Academic Press, 1999; *Chen and Janes* (Ed.), "PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic", 2ª edición, Humana Press, 2002. También se proporcionan cebadores para la detección de polimorfismos de P2X7R en, pero sin limitación, la SEC ID N°: 52 a la SEC ID N°: 111. Una vez amplificado el ADN, la estructura de nucleótidos puede analizarse por métodos de secuenciación y compararse con el ADN de P2X7R normal. La secuenciación puede realizarse manualmente por cualquier biólogo molecular de experiencia habitual o por un aparato de secuenciación automático. Estos procedimientos son comunes en la técnica, véase, por ejemplo *Adams et al.* (Ed.), "Automated DNA Sequencing and Analysis", Academic Press, 1994; *Alphey*. "DNA Sequencing: From Experimental Methods to Bioinformatics", Springer Verlag Publishing, 1997.

La detección y análisis de polimorfismos en P2X7R también puede realizarse usando un sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMSTM), extensión lineal de un sistema de mutación refractario a la amplificación (ALEXTM), polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), análisis de heterodúplex, PCR-SSCP, SSCP fluorescente en un secuenciador de ADN automático, electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización, ensayos de protección de ARNasa, detección de mutaciones por hibridación de oligonucleótidos con especificidad de secuencia, métodos de escisión química, métodos de escisión enzimática de desacoplamiento, métodos de longitud de fragmentos de escisión, hibridación de oligonucleótidos con especificidad de alelo en chips de ADN y otros de estos métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, *Nollau et al.*, Clin. Chem. 43 (1997), 1114-1128; *Burczak y Mardis* (Ed.), "Polymorphism Detection & Analysis Techniques", Eaton Pub Co, 2000; *Cotton et al.* (Ed.), "Mutation Detection: A Practical Approach", Irl Press, 1998; *Taylor* (Ed.), "Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA", CRC Press, 1997.

Además, se describe en este documento un método para diagnosticar un trastorno afectivo en un individuo, que comprende:

- (a) aislar ARN a partir de células obtenidas de un individuo;
- (b) convertir el ARN en ADNc;
- (c) determinar todo o parte de la composición de nucleótidos del ADNc obtenido de esta manera; y
- (c) analizar dicha composición de nucleótidos con respecto a la presencia de uno o más polimorfismos o variación alélica como se define en este documento.

Con respecto a las realizaciones preferidas, se aplica lo mismo que se ha descrito anteriormente.

La detección y análisis de polimorfismos en el ARN de P2X7R puede realizarse de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Adicionalmente, se describe en este documento un método para diagnosticar un trastorno afectivo en un individuo, que comprende:

- (a) aislar ARN o proteínas de células obtenidas a partir de un individuo;
- (b) determinar los niveles de ARN o proteína P2X7R;
- (c) comparar los niveles de ARN o proteína P2X7R con los niveles correspondientes de un individuo normal que no padece un trastorno afectivo.

Además, se describe en este documento un polinucleótido que comprende al menos 20 bases del gen P2X7R humano y que comprende una mutación o polimorfismo seleccionado entre cualquiera de los siguientes:

ES 2 293 114 T3

TABLA 1

Nuevos polimorfismos en la proteína P2X7R humana

Región en P2X7	Polimorfismo	Modificación de Proteína
5'UTR	362 T-C	
5'UTR	532 T-G	
5'UTR	1100A-G	
5'UTR	1122 A-G	
5'UTR	1171 C-G	
5'UTR	1702 G-A	
Intrón 01	3166 G-C	
Intrón 01	24778 C-T	
Intrón 01	24830 6C-T	
Exón 03	26188 C-T	Arg117Trp
Intrón 03	26308 A-G	
Intrón 03	26422 G-A	
Intrón 04	32394 G-A	
Intrón 04	32434 T-C	
Exón 05	32493 G-A	Gly150Arg
Exón 05	32548 C-T	Silenciosa

ES 2 293 114 T3

		Cys168
	Intrón 05	32783 A-C
5	Exón 06	35438 G-A
	Exón 06	35454 T-C
	Intrón 06	35641 G-C
10	Intrón 06	35725 A-C
	Intrón 06	36001 T-G
15	Intrón 07	36378 G-A
	Intrón 07	36387 T-A
	Intrón 07	36398 G-C
20	Exón 08	37604 C-T
	Exón 08	37633 C-T
25		Arg270Cys
		Silenciosa
		Asp279
	Intrón 09	47214 C-T
	Intrón 11	47563 T-C
30	Intrón 12	54307 C-T
	Intrón 12	54308 G-A
35	Exón 13	delección de 54562-54582 de CCCTGAGA GCCACAGGTGCCT
		delección de 7aa de 488 a 494 (PESHRCL)
40	Exón 13	54804 A-T
	Exón 13	54834 G-A
	3'UTR	55169 C-A
45	3'UTR	55170 A-C
	3'UTR	55171 A-C
50	3'UTR	55917 C-T
	3'UTR	54925 G-A

El polimorfismo describe la posición y la variación observada. La posición y numeración del polimorfismo corresponde al gen P2X7R humano como se define en la SEC ID N°: 1. Los cebadores usados para la amplificación y secuenciación por SNP se muestran en la Tabla 1a y se indican en la SEC ID N°: 52 a SEC ID N°: 111.

ES 2 293 114 T3

TABLA 1a

Secuencias de cebadores para amplificación y secuenciación por SNP

<i>Nombre del Cebador</i>	<i>Orientación</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Inicio</i>	<i>Final</i>
P2RX7_01.for	Con sentido	cgtaggacttggcgcttct	2785	2803
P2RX7_01.rev	Antisentido	gagcacgtctcagattcgaaa	3224	3244
P2RX7_02.for	Con sentido	ccatgaggcaggtatgactattc	24665	24687
P2RX7_02.rev	Antisentido	ctcctggatctcaccagtt	25168	25187
P2RX7_03.for	Con sentido	ctcgccagcttgatattaagc	25966	25988
P2RX7_03.rev	Antisentido	ggccctagtgtctagaaccaga	26426	26447
P2RX7_04.for	Con sentido	attcatccgtcagtgcc	30794	30811
P2RX7_04.rev	Antisentido	gccatgtgaatttctaccgat	31277	31298
P2RX7_05.for	Con sentido	ttcgtgtggttaggatggg	32314	32333
P2RX7_05.rev	Antisentido	caaggatgctcaggtagtagc	32805	32826
P2RX7_06.for	Con sentido	cactaggttgcgtatccatttct	35277	35301
P2RX7_06.rev	Antisentido	gcaactgtgtgagagcttg	35731	35750
P2RX7_07.for	Con sentido	tcaaccctggccagtggtg	35950	35968
P2RX7_07.rev	Antisentido	caccaagtagctctcactcataagg	36424	36448
P2RX7_08.for	Con sentido	caataacactgtgagtaggt	37380	37403
P2RX7_08.rev	Antisentido	catcttgtgccttggaaacc	37750	37770
P2RX7_09.for	Con sentido	gtgagtggaatcctgctactgc	45321	45343
P2RX7_09.rev	Antisentido	aggcccactcctgtactcg	45743	45761
P2RX7_10_11.for	Con sentido	ccaagtcacagcatgaggc	47119	47137
P2RX7_10_11.rev	Antisentido	accagcgcagtatccac	47632	47649
P2RX7_12.for	Con sentido	aagcatggggttccatttc	50252	50268
P2RX7_12.rev	Antisentido	gcataaaagggactcctgtagta	50691	50714
P2RX7_13a.for	Con sentido	gcttacagaacacatgcatgg	54232	54252
P2RX7_13a.rev	Antisentido	gcaGGtgfeaggcacagtgc	54739	54757
P2RX7_13b.for	Con sentido	atcaccacctcagagctgttc	54620	54640
P2RX7_13b.rev	Antisentido	gttaacatggctactgcagcc	55203	55223
P2XR7_13d.for	Con sentido	gcttagaaaggaggcgactcc	54484	54504
P2XR7_Pro13.for	Con sentido	ttgtgacatttgaaggctgcc	2617	2638
P2XR7_Pro7.rev	Antisentido	tctgaagctctgctctgag	1955	1974
P2XR7_Pro8.rev	Antisentido	ctcaccttctggcttcagt	1611	1630
P2XR7_Pro9.for	Con sentido	cttaccactcccaggactaa	1496	1515
P2XR7_Pro10.for	Con sentido	gtctgcctgttactgccat	1149	1168
P2XR7_Pro1.for	Con sentido	cagagaccttcagaaactcg	1841	1861
P2XR7_Pro2.rev	Antisentido	agatcaccaggacacagtg	2261	2280
P2XR7_Pro3.for	Con sentido	ctcaactccacttctctgg	2133	2152
P2XR7_Pro4.rev	Antisentido	ccttctacttttgggtcatg	2655	2677
P2XR7_Pro5.for	Con sentido	gggagaattctgaaaatgcc	2691	2711

ES 2 293 114 T3

P2XR7_Pro6.rev	Antisentido	ggaccagagctctactcttc	2951	2970
P2XR7_Pro11.for	Con sentido	aggcatagatcgacctgcc	2296	2315
P2XR7_Pro12.rev	Antisentido	aagaagcgccaagtcctacg	2785	2804
P2XR7_Pro14.for	Con sentido	gcaatccagactgaagtgac	2051	2071
P2XR7_Pro15.rev	Antisentido	actctggctgcagtggtg	2428	2447
P2XR7_Pro21.for	Con sentido	cctttaaatacagagacctcaga	1831	1854
P2XR7_Pro22.for	Con sentido	gcccatactctgaacacat	2708	2727
P2XR7_3UTR10.for	Con sentido	cccttgaactcttgctatcg	55804	55824
P2XR7_3UTR1.for	Con sentido	ggcagtacagtggttcaaga	54858	54878
P2XR7_3UTR2.rev	Antisentido	gtgggacagttgtctgcct	55150	55170
P2XR7_3UTR3.for	Con sentido	gagtcctaccaatagcagg	55183	55202
P2XR7_3UTR4.rev	Antisentido	gtcaaagaatttggtccacc	55643	55663
P2XR7_3UTR5.for	Con sentido	catgaactgtctttaaagttaaag	55515	55540
P2XR7_3UTR6.rev	Antisentido	gagatacggttcaccatgtg	55955	55976
P2XR7_3UTR7.for	Con sentido	aattagctgggcatggtgcg	55992	56011
P2XR7_3UTR8.rev	Antisentido	ttgagatggagtctcgctcg	56122	56140
P2XR7_3UTR9.rev	Antisentido	cactgtccacgtgactgctt	56208	56227
P2RX7_11.For	Con sentido	tcctactcggctggtgaagagatt	47281	47305
P2RX7_11.Rev	Antisentido	gggcctaatttctgcat	47591	47609
P2RX7_13G.For	Con sentido	aagaacctagaacctgagggctt	54333	54355
P2RX7_13G.Rev	Antisentido	t tgagatgggaggcagc 11	54541	54559
P2RX7_13H.For	Con sentido	ttcggctcccaggacat	54773	54789
P2RX7_13H.Rev	Antisentido	cacagagctttgcaggtgaa	55248	55267

A la vista de lo anterior, se describe en este documento un kit de diagnóstico para trastornos afectivos que comprende una sonda oligonucleotídica específica o un cebador que corresponde a polimorfismos de P2X7R como se describe en este documento. El kit de diagnóstico puede comprender el envase y las instrucciones apropiadas para uso en el método antes descrito. Dicho kit puede comprender además un tampón apropiado y enzimas tales como la transcriptasa inversa y polimerasas termoestables.

El diagnóstico puede realizarse en un ratón, rata o ser humano. El diagnóstico se aplica generalmente *in vitro*, por ejemplo, usando células u otro material obtenido a partir de un individuo. Sin embargo, también puede aplicarse en un individuo vivo o *post mortem*.

El diagnóstico de un trastorno afectivo puede seguirse por la prescripción o administración de un fármaco antidepresivo. La administración y dosificación de fármacos antidepresivos puede variar entre los pacientes y es bien conocida en la técnica médica, véase, por ejemplo, *Benkert y Hippus*, "Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie", Springer Verlag Publishing, 2000; *Albers*, "Handbook of Psychiatric Drugs: 2001-2002 Edition", Current Clinical Strategies Publishing, 2000. Los ejemplos preferidos incluyen entre 5 mg y 80 mg por día, preferiblemente 20 mg de fluoxetina; entre 5 mg y 50 mg por día, preferiblemente 20 mg de paroxetina; entre 5 mg y 200 mg por día, preferiblemente 50 mg de sertralina; entre 5 mg y 300 mg por día, preferiblemente 100 mg de fluvoxamina; entre 5 mg y 100 mg por día, preferiblemente 30 mg de mirtazapina; entre 4 mg y 50 mg, preferiblemente 8 mg de reboxetina; entre 5 mg y 600 mg por día, preferiblemente 200 mg de nefazodona; entre 450 mg y 1800 mg por día, preferiblemente 900 mg de carbonato de litio.

La proteína P2X7R también es útil para controlar la eficacia y/o dosificación de un fármaco o la probabilidad de que un paciente responda a un fármaco. De esta manera, se describe en este documento un método para controlar la eficacia y/o dosificación de un fármaco, por ejemplo, un fármaco antidepresivo, y/o la probabilidad de que un paciente responda a dicho fármaco, que comprende determinar el nivel de expresión y/o actividad de la proteína P2X7R en un paciente antes y después de la administración del fármaco respectivo. Como se presenta en los ejemplos mostrados

más adelante, el tratamiento con un fármaco antidepresivo produce una regulación positiva en la actividad de P2X7R. En seres humanos, la actividad de P2X7R puede controlarse por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) o Tomografía Computerizada por Emisión de un solo Fotón (SPECT) usando un indicador de ligando radiomarcado para P2X7R. Los ejemplos de ligandos de P2X7R pueden ser, pero sin limitación, ATP, un antagonista que se une a P2X7R, un agonista que se une a P2X7R, o un polinucleótido pequeño que comprende al menos 20 bases del gen P2X7R humano. Una modulación de la actividad P2X7R, la distribución en la membrana o los niveles de expresión reflejarían la actividad y potencia del fármaco antidepresivo. Los métodos y técnicas necesarios para el análisis PET son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, *Paans y Vaalburg*, Curr. Pharmac. Design 6 (2000), 1583-1591; *van Waarde*, Curr. Pharmac. Design. 6 (2000), 1593-1610; *Paans et al*, Methods 27 (2002), 195-207; *Passchier et al.*, Methods 27 (2002), 278-286; *Laruelle et al.*, Methods 27 (2002), 287-299.

Cuando se usa en este documento, por el término “muestra” se entiende cualquier muestra biológica obtenida a partir de un individuo, línea celular, cultivo de tejidos u otra fuente que contenga polinucleótidos o polipéptidos o porciones de los mismos. Cuando se indica, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como sangre, suero, plasma, orina, fluido sinovial y fluido espinal) y fuentes de tejidos que se ha observado que expresan los polinucleótidos antes descritos. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales a partir de mamíferos son bien conocidos en la técnica. Como fuente se prefiere una muestra biológica que incluye ADN genómico, ARNm o proteínas.

Como se ha descrito en este documento anteriormente, pueden producirse mutaciones del gen que codifica P2X7R que afecten al nivel de ADN o al nivel del ARNm y pueden dar como resultado una expresión alterada de P2X7R o una expresión de canales iónicos de apertura por ATP P2X7R que muestren una función alterada o ausencia de función en comparación con los canales iónicos de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre descritos en este documento. De esta manera, existen varios métodos sobre el nivel de ADN, el nivel de ARN o el nivel de proteína para determinar si el gen del canal iónico de apertura por ATP P2X7R muestra una mutación como se ha descrito anteriormente en este documento. Por consiguiente, el ARNm, ADNc, AND y AND genómico son las moléculas de ácido nucleico preferidas a usar en los métodos mencionados más adelante. Además, se prefieren polipéptidos o fragmentos de los mismos si se va a determinar una mutación en la proteína del canal iónico de apertura por ATP P2X7R como se ha descrito en este documento.

Preferiblemente, una mutación puntual que conduce al reemplazo de un resto aminoácido en las posiciones indicadas en la Tabla 1 de la secuencia de aminoácidos P2X7R de tipo silvestre correspondiente representada en la SEC ID N°: 3 ó 4 por otro aminoácido puede determinarse por PCR. Dicha PCR se continúa por un análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) si, debido a la mutación puntual, se genera un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que no está presente en la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre o se crea un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que no aparece en la proteína P2X7R de tipo silvestre. Más preferiblemente, dicha mutación puede determinarse por PCR usando cebadores y condiciones que permitan sólo una amplificación de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre que codifica el aminoácido de tipo silvestre correspondiente en la posición respectiva, pero no de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un resto aminoácido diferente en la posición correspondiente. Es incluso más preferido que la PCR se realice para determinar una mutación usando cebadores y condiciones que no permiten la amplificación si está presente la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, pero sólo si se codifica otro resto aminoácido en la posición respectiva. Se prefiere particularmente un método que usa PCR y cebadores en condiciones que permiten la amplificación de un fragmento que comprende al menos los restos nucleotídicos que codifican el resto aminoácido correspondiente a las posiciones de la SEC ID N°: 1.

Dicha PCR se continúa, por ejemplo, por secuenciación y/o análisis de conformación de una sola cadena (SSCA). Dicho fragmento preferiblemente tiene una longitud de al menos 25 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 50 nucleótidos, e incluso más preferiblemente de al menos 75 nucleótidos, de una forma particularmente preferida de al menos 100 nucleótidos, de una manera más particularmente preferida de al menos 200 nucleótidos, de una manera también más particularmente preferida de al menos 250 nucleótidos e incluso de una manera más particularmente preferida de al menos 300 nucleótidos, siendo lo más preferido particularmente una longitud de al menos 600 nucleótidos. Dichos cebadores preferiblemente tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 15 nucleótidos, incluso más preferiblemente de al menos 18 nucleótidos y aún más preferiblemente de al menos 21 nucleótidos como se representa en las SEC ID N°: 52 a 111. La temperatura para hibridar dichos cebadores preferiblemente es de al menos 50°C, más preferiblemente de al menos 55°C y aún más preferiblemente de al menos 58°C. La temperatura para la desnaturalización preferiblemente es de al menos 95°C durante preferiblemente al menos 10 segundos, más preferiblemente al menos 20 segundos, incluso más preferiblemente al menos 30 segundos y aún más preferiblemente al menos 60 segundos. Sin embargo, dependiendo de la longitud y el contenido de G-C de la secuencia de ácido nucleico a amplificar, la temperatura para la desnaturalización puede ser más corta o más larga. La temperatura para la extensión de los cebadores hibridados preferiblemente es de al menos 10 segundos, más preferiblemente de al menos 20 segundos, incluso más preferiblemente de al menos 30 segundos y aún más preferiblemente de al menos 60 segundos. En los ejemplos presentados más adelante se ejemplifica una reacción de PCR que comprende las condiciones mencionadas anteriormente. La posterior secuenciación y/o SSCA se realiza como se conoce en la técnica. Preferiblemente, los fragmentos de PCR se separan en un gel de poli(acrilamida) al 10% a 4°C, pero también se prefiere la temperatura ambiente. Los fragmentos de PCR que muestran un desplazamiento de banda SSCA se amplifican con los cebadores en las condiciones mencionadas anteriormente y posteriormente se secuencian. Como alternativa, también es posible secuenciar directamente el ADN genómico para determinar si se ha producido

una mutación en el gen CLCN2. En *Horecka*, Yeast 16 (2000), 967-970 se demuestra una estrategia de secuenciación genómica directa, por ejemplo, para la levadura de panadería.

Preferiblemente, una deleción se determina usando técnicas de hibridación conocidas en la técnica. En particular, se diseña un cebador como se ha mencionado en este documento anteriormente que sea capaz de hibridar únicamente con el ADN genómico de tipo silvestre como se representa en la SEC ID N°: 1 pero no con una secuencia de nucleótidos que comprende una deleción de un fragmento entre los nucleótidos 54562 y 54582 de la SEC ID N°: 1. También se prefiere el método de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para determinar en cromosomas enteros, en particular en el cromosoma 12q23-q24, que dicho cromosoma tiene la deleción mencionada anteriormente. Es incluso más preferido que una deleción de restos nucleotídicos como se ha descrito en este documento pueda determinarse usando PCR, donde un cebador de un par de cebadores se localiza dentro de la región de ADN genómico que comprende dicha deleción. Preferiblemente, dicha deleción está entre las posiciones de nucleótidos 54562 y 54582 como se representa en la SEC ID N°: 1. De esta manera, en las condiciones apropiadas no se obtendrá ningún fragmento de PCR si el ADN genómico comprende dicha deleción. Se prefiere particularmente realizar una PCR que use cebadores que están localizados cadena arriba o cadena abajo de la deleción para determinar dicha deleción. En condiciones apropiadas como se ha mencionado anteriormente en este documento, se amplificará tanto un fragmento de ADN genómico de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre indicada en la SEC ID N°: 1 como un fragmento de la secuencia de nucleótidos que comprende una deleción preferiblemente de los nucleótidos entre las posiciones 54562 y 54582 representadas en la SEC ID N°: 1.

También es posible determinar las mutaciones de P2X7R descritas anteriormente sobre el nivel de proteína. Algunas de las mutaciones descritas anteriormente conducen a versiones acortadas de la proteína P2X7R. De esta manera, es concebible determinar la aparición de estas mutaciones determinando la longitud o peso molecular de la proteína P2X7R expresada en un individuo, por ejemplo, por SDS PAGE.

También es posible determinar las mutaciones del canal de apertura por ATP P2X7R como se describe en este documento usando anticuerpos. Dichos anticuerpos específicos por dichas mutaciones de proteínas P2X7R se determinarán por técnicas de ensayo tales como radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de Western y ensayo ELISA. También se prefieren métodos inmunohistológicos clásicos.

El descubrimiento de que ciertas mutaciones en el gen que codifica P2X7R y/o la proteína correspondiente están relacionados con un trastorno afectivo indica que la ausencia de función o la disfunción de la proteína P2X7R es responsable de diversas formas de trastornos afectivos. De esta manera, el descubrimiento de estas mutaciones no sólo permite el diagnóstico de trastornos afectivos determinando si las mutaciones descritas anteriormente se producen en un individuo. También permite desarrollar un tratamiento de trastornos afectivos que se han diagnosticado como el resultado de una mutación en el gen codificante de P2X7R. Dicho tratamiento puede comprender, por ejemplo, la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína P2X7R no funcional o funcional de tipo silvestre restaurando de esta manera en dicho individuo la actividad P2X7R o la activación o represión de (un) gen(es) P2X7R *in vivo*. La expresión “activación o represión” en este contexto significa que la expresión del gen está potenciada (activación) o reducida (represión). Un aumento de la expresión puede conseguirse, por ejemplo, aumentando la eficacia del inicio de la transcripción, por ejemplo, usando compuestos adecuados que tienen un efecto activador sobre la transcripción. Como alternativa, puede conseguirse una potenciación reemplazando el promotor natural por un promotor más eficaz.

Una represión puede conseguirse suprimiendo la expresión del gen, por ejemplo, suprimiendo específicamente la transcripción del promotor respectivo por compuestos adecuados o haciendo que el promotor sea menos eficaz o no funcional.

En este documento también se describe una composición farmacéutica. La expresión “composición farmacéutica” se refiere a una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y que se selecciona entre el grupo consistente en:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 3 ó 4;
- (b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos representada en la SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 2;
- (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos de (a) o (b); y
- (d) una secuencia de nucleótidos que está degenerada como resultado del código genético con respecto a la secuencia de nucleótidos de (c).

Estas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína P2X7R funcional y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede administrarse con un vehículo fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en este documento. En una realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado

por una agencia reguladora u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico.

- 5 Estos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, ion de sodio, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Science” por E.W Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos mencionados anteriormente, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

- Preferiblemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para mitigar el dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o como un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

- 35 La composición farmacéutica puede formularse como una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc.

- 40 Opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de ensayo modelo en animales o *in vitro*. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante.

- La composición farmacéutica preferiblemente se diseña para la aplicación en terapia génica. La técnica de terapia génica ya se ha descrito anteriormente en relación con las moléculas de ácido nucleico y todo lo que se ha dicho aquí también se aplica en relación con la composición farmacéutica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico de la composición farmacéutica preferiblemente está en una forma que permite su introducción, expresión y/o integración estable en células de un individuo a tratar.

- Para la terapia génica pueden utilizarse diversos vectores virales, por ejemplo adenovirus, herpes virus, vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un solo gen extraño incluyen, pero sin limitación: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales también pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador selectivo de forma que puedan identificarse y generarse células transducidas. Por medio de la inserción de una secuencia de P2X7R de interés que codifica una proteína P2X7R funcional en el vector viral, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector adquiere especificidad de diana.

- Los vectores retrovirales pueden adquirir especificidad de diana por inserción, por ejemplo, de un polinucleótido que codifica un azúcar, un glicolípido o una proteína. Los especialistas en la técnica conocerán, o pueden averiguar fácilmente sin experimentación indebida, secuencias polinucleotídicas específicas que pueden insertarse en el genoma retroviral para permitir la administración con especificidad de diana del vector retroviral que contiene la secuencia polinucleotídica insertada.

Como los retrovirus recombinantes preferiblemente son defectuosos, necesitan ayuda para producir partículas de vectores infecciosas. Esta ayuda puede proporcionarse, por ejemplo, usando líneas de células auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladora dentro del LTR. Estos plásmidos carecen de una secuencia de nucleótidos que permita que el mecanismo de empaquetamiento reconozca a un transcrito de ARN para la encapsidación. Las líneas de células auxiliares que tienen delecciones de la señal de empaquetamiento incluyen, pero sin limitación, w2, PA317 y PA12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, ya que no se empaqueta ningún genoma. Si se introduce un vector retroviral en estas células en las que la señal de empaquetamiento está intacta pero los genes estructurales se reemplazan por otros genes de interés, el vector puede empaquetarse y pueden producirse viriones de vector. Como alternativa, pueden transfectarse directamente células NIH 3T3 u otras células de cultivo de tejidos con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol, y env, por transfección convencional con fosfato cálcico. Estas células después se transfectan con el vector plasmídico que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo. Otro sistema de administración dirigida para polinucleótidos P2X7R es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de liberación *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que vesículas unilamelares grandes (LUV), que tienen un tamaño que varía de 0,2 a 4,0 μm , pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. En el interior acuoso pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos y administrarse las células en una forma biológicamente activa (Fraleigh, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Además de células de mamíferos, se han usado liposomas para administrar polinucleótidos a células vegetales, de levadura y bacterianas. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deben estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de los genes de interés a una alta eficacia sin comprometer al mismo tiempo su actividad biológica; (2) unión preferente y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) administración del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula diana con alta eficacia; y (4) expresión precisa y eficaz de información genética (Mannino, *et al.* Biotechniques 6:682, 1988). La composición del liposoma normalmente es una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos de alta temperatura de transición de fase, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la intensidad iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, forfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Son particularmente útiles diacilfosfatidilgliceroles, donde el resto de lípido contiene de 14 a 18 átomos de carbono, particularmente de 16 a 18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La dirección de los liposomas puede clasificarse basándose en factores anatómicos y de mecanismo. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo, especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de orgánulo. La dirección por el mecanismo puede distinguirse basándose en si es pasiva o activa. La dirección pasiva utiliza la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en las células del sistema reticuloendotelial (RES) en órganos que contienen capilares sinusoidales.

En vista de lo anterior, en el presente documento se describe el uso de la composición farmacéutica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un canal iónico de apertura por ATP funcional como se ha descrito anteriormente en este documento, en un método para tratar un trastorno afectivo que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica a un sujeto que padece dicho trastorno.

Cuando se usa en este documento, el término “sujeto” significa un individuo que necesita tratamiento de un trastorno afectivo. Preferiblemente, el sujeto es un vertebrado, incluso más preferiblemente un mamífero, y de una forma particularmente preferida un ser humano.

El término “administrado” significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la molécula de ácido nucleico mencionada anteriormente que codifica una proteína P2X7R funcional a un individuo. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del objetivo del tratamiento y se podrá averiguar por un especialista usando técnicas conocidas. Como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica frente a una administración localizada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y los especialistas en la técnica podrán averiguar estos ajustes con experimentación rutinaria.

Los usos son aplicables tanto a terapia humana como a aplicaciones veterinarias. Los compuestos descritos en este documento que tienen la actividad terapéutica deseada pueden administrarse en un vehículo fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en este documento. Dependiendo de la manera de introducción, los compuestos pueden formularse en una diversidad de formas como se describe más adelante. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100% en peso. Los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos.

La administración de la composición farmacéutica puede realizarse en una diversidad de formas como se ha descrito anteriormente incluyendo, pero sin limitación, la vía oral, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdérmica, intranodal, intrarrectal, intraperitoneal,

intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, o intraocular. En algunos casos, por ejemplo en el tratamiento de heridas y de inflamaciones, los agentes candidatos pueden aplicarse directamente como una pulverización seca en solución.

El médico a cargo del caso y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores incluyendo las dimensiones del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el momento y vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se administren de forma concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 μg ; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente.

Las dosificaciones preferiblemente se administran una vez por semana, sin embargo, durante la progresión del tratamiento las dosificaciones pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más prolongados y cuando sea necesario pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente. En un caso preferido, la respuesta inmune se controla usando métodos descritos en este documento, y otros métodos conocidos por los especialistas en la técnica y dosificaciones se optimizan, por ejemplo, en cuanto al tiempo, cantidad, y/o composición. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración intravenosa de ADN es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN. Si el régimen es una infusión continua, debe estar en el intervalo de unidades de 1 μg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede controlarse por medio de una evaluación periódica. La composición farmacéutica puede administrarse por vía local o sistémica. La administración preferiblemente se realizará por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponandos. Los vehículos parenterales incluyen solución de ion de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa e ion de sodio, solución de Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen líquidos y regeneradores de nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

También se prevé que las composiciones farmacéuticas se empleen en estrategias de co-terapia, es decir, en co-administración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo, otros fármacos para prevenir, tratar o mejorar trastornos afectivos.

Además, en el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto, cuya administración a las células conduce a la reducción o aumento de la expresión de un ácido nucleico que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R en las células o que comprende una molécula de ácido nucleico cuya expresión en las células o cuya administración a las células conduce a una reducción o aumento de la expresión de un ácido nucleico que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R en las células. Dicha composición farmacéutica puede ser útil para tratar individuos que tienen una cantidad aumentada o reducida de la proteína P2X7R o de su nivel de expresión como se ha descrito anteriormente en este documento. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica conduce a un aumento de la expresión de un ácido nucleico que codifica un canal iónico de apertura por ATP P2X7R en las células.

Se prevé que la composición farmacéutica mencionada anteriormente cuya administración a las células conduce a una reducción de la expresión de un ácido nucleico que codifica el canal iónico de apertura por ATP P2X7R sea un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un ácido nucleico co-supresor, ARNi o ARNsi.

Se describe una estrategia de ARNsi, por ejemplo, en *Elbashir* ((2001), *Nature* 411, 494-498)). También se prevé que, por ejemplo, se empleen ARN en forma de horquilla corta (ARNsh) como una composición farmacéutica. La estrategia de ARNsh para silenciamiento génico es bien conocida en la técnica y puede comprender el uso de ARNst (temporales pequeños); véase, entre otros, *Paddison* (2002) *Genes Dev.* 16, 948-958.

Como se ha mencionado anteriormente, en la técnica se conocen estrategias para el silenciamiento de genes y comprenden estrategias de "ARN" tales como ARNi o ARNsi. Se ha demostrado el uso satisfactorio de estas estrategias en *Paddison* (2002) loc. cit., *Elbashir* (2002) *Methods* 26, 199-213; *Novina* (2002) *Mat. Med.* 3 de junio de 2002; *Donze* (2002) *Nucl. Acids Res.* 30, e46; *Paul* (2002) *Nat. Biotech* 20, 505-508; *Lee* (2002) *Nat Biotech.* 20, 500-505; *Miyagishi* (2002) *Nat. Biotech.* 20, 497-500; *Yu* (2002) *PNAS* 99, 6047-6052 o *Brummelkamp* (2002), *Science* 296, 550-553. Estas estrategias pueden estar basadas en vectores, por ejemplo el vector pSUPER, o pueden emplearse vectores de ARN polIII como se ilustra, entre otros, en *Yu* (2002) loc. cit.; *Miyagishi* (2002) loc.cit o *Brummelkamp* (2002) loc. cit.

Un compuesto que conduce a una reducción de la expresión del gen P2X7R puede ser, por ejemplo, un compuesto que actúa sobre la región reguladora del gen y que, de esta manera, reduce el nivel de transcripción. Estos compuestos pueden identificarse por métodos como los descritos más adelante en este documento.

En la presente invención se describe el uso de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína P2X7R funcional como se ha descrito anteriormente en este documento en relación con la composición farmacéutica, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno afectivo.

Otro aspecto descrito en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende, entre otras cosas, los polinucleótidos descritos anteriormente, es decir, polinucleótidos que tienen mutaciones y/o delecciones como se ha descrito anteriormente en este documento. Estas composiciones farmacéuticas, por ejemplo, pueden ser útiles para tratar a individuos que tienen una cantidad aumentada o reducida de la proteína P2X7R o que tienen una proteína P2X7R que muestra una actividad aumentada o reducida que puede determinarse como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, esta composición farmacéutica puede ser útil para tratar a individuos que tienen una cantidad reducida de la proteína P2X7R o que tienen una proteína P2X7R que muestra una actividad reducida que puede determinarse como se ha descrito anteriormente. Se prevé que, por ejemplo, una proteína P2X7R no funcional o preferiblemente hiperfuncional incluida en dicha composición farmacéutica se incorpore en un complejo de P2X7R que exista de forma natural en las células como se ha descrito anteriormente. También se prevé que las técnicas descritas anteriormente para terapia génica puedan usarse para tratar a un individuo con las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, cambiando lo que proceda.

Con respecto a los posibles modos de administración, se aplica lo mismo que se ha indicado anteriormente.

Además, en el presente documento se describe el uso de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, los polipéptidos, el anticuerpo y/o el aptámero descrito anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno afectivo.

Otro aspecto descrito en el presente documento es el uso de un modulador de la actividad o expresión de P2X7R para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno afectivo. Cuando se usa en este documento, el término “modulador” significa uno o más compuestos, un complejo de compuestos, una o más sustancias o un complejo de sustancias que pueden modificar, es decir, modular la actividad de P2X7R o la expresión de P2X7R directa o indirectamente. La modulación puede realizarse, por ejemplo, a nivel proteico. Particularmente, la proteína P2X7R puede interferir con el modulador de forma que sea más activa o menos activa. La modulación también puede realizarse a nivel del ácido nucleico. Particularmente, el gen se transcribe con más frecuencia o menos frecuencia dando lugar a más o menos proteína. La modulación también puede influir en la estabilidad del ARN o de la proteína. Como se descubrió que, sorprendentemente, los agonistas de P2X7R mejoran los síntomas de ratones seleccionados por un comportamiento de ansiedad y depresivo, el modulador de la actividad de P2X7R usado para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno afectivo es un agonista. El término “agonista” significa un agente o un compuesto que puede interaccionar con un receptor e iniciar una respuesta fisiológica o farmacológica característica de ese receptor. Los ejemplos de agonistas de P2X7R incluyen, pero sin restricción, ATP, ATP-4, BzATP (2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato ($C_{24}H_{24}N_5O_{15}P_3$)) y tenidap (5-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-3-(2-tienilcarbonyl)-indol-1-carboxamida, es decir $C_{15}H_{11}ClN_2O_2S$) o un derivado del mismo. De una forma particularmente preferida, dicho agonista usado para tratar la depresión o la ansiedad es BzATP y es como se demuestra en el ejemplo 9 presentado más adelante.

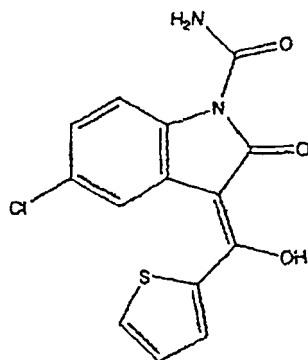
Aunque se notificó que la activación de P2X7R podía inducir la apoptosis y la muerte celular *in vitro* (Di Virgilio *et al.*, Cell Death Differ. 5 (1988), 191-199; Virginio *et al.*, J Physiol. 519 (1999), 335-346), la presente solicitud demuestra en el Ejemplo 9 presentado más adelante que el tratamiento del cerebro de ratones seleccionados por un comportamiento de ansiedad y depresivo con BzATP no reveló ninguna diferencia significativa en los números de células apoptóticas entre los ratones de control y los ratones tratados con BzATP. Este resultado indica que la activación de P2X7R no daba como resultado la muerte de células cerebrales *in vivo*, lo cual, por lo tanto, hace que BzATP sea un fármaco candidato para el tratamiento de trastornos afectivos.

Como se descubrió que, inesperadamente, los agonistas de P2X7R mejoran los síntomas de ratones seleccionados por un comportamiento de ansiedad y depresivo, la presente invención se refiere, en una realización adicional, al uso de un agente que modula la actividad de P2X7R que es un agonista de P2X7R para la preparación de una composición farmacéutica para tratar trastornos afectivos tales como un comportamiento de ansiedad y depresivo. Lo que es incluso más sorprendente es el descubrimiento de la presente solicitud mostrado en el Ejemplo 10 de que los antagonistas de P2X7R no tienen efectos antidepresivos aunque se crea que sí en la técnica anterior, por ejemplo, según los documentos WO 03/042190, WO 03/042191, WO 03/049353 o US 2004/0029841. Los documentos WO 03/042190, WO 03/042191, WO 03/059353 o US 2004/0029841 describen composiciones de antagonistas de P2X7R y métodos para tratar enfermedades mediadas por P2X7R por medio de la administración de estos compuestos. Sin embargo, aunque la técnica anterior puede realizar una asociación entre P2X7R y, por ejemplo, el tratamiento de la depresión, generalmente se supone que se han usado antagonistas de P2X7R en el tratamiento de, por ejemplo, la depresión. De esta manera, el descubrimiento de la presente invención de que los antagonistas no tienen efectos antidepresivos, sino que más bien los agonistas de P2X7R tiene un efecto antidepresivo, podría no ser esperado y, de esta manera, podría ser incluso más sorprendente. Por lo tanto, la presente solicitud proporciona, entre otras cosas, la base para el desarrollo de medicamentos eficaces que tienen efectos terapéuticos beneficiosos contra, por ejemplo, la depresión. En particular, dichos medicamentos que comprenden un agonista de P2X7R son eficaces en el tratamiento de trastornos afectivos, en particular, para el tratamiento de los trastornos mencionados en este documento y, en particular, para tratar la depresión. Los ejemplos de agonistas de P2X7R incluyen, pero sin restricción, ATP, ATP-4 y BzATP (2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato ($C_{24}H_{24}N_5O_{15}P_3$)). Preferiblemente, el agonista de P2X7R a usar para tratar trastornos afectivos es BzATP. Más preferiblemente, BzATP se usa para tratar la depresión o ansiedad como se demuestra en el Ejemplo 9 presentado más adelante.

La presente solicitud proporciona otro descubrimiento inesperado de que el compuesto químico denominado tenidap también funciona como un modulador (es decir, como agonista) de P2X7R que, de esta manera, puede usarse para tratar trastornos afectivos. Hasta ahora, se han descritos diversas aplicaciones médicas para tenidap o un derivado del mismo. Sin embargo, en la técnica anterior no se conoce ni se sugiere el uso de tenidap o un derivado del mismo para

5 tratar trastornos afectivos. Por consiguiente, la presente solicitud se refiere al uso de tenidap o 2-oxindol-carboxamidas 3-sustituidas para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno afectivo. Por supuesto, también se prevé el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de tenidap o 2-oxindol-carboxamidas 3-sustituidas para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno afectivo.

La composición de tenidap (5-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-3-(2-tienilcarbonil)-indol-1-carboxamida, es decir $C_{15}H_{11}ClN_2O_2S$) que tiene la siguiente fórmula estructural



y otras 2-oxindol-carboxamidas 3-sustituidas y su uso como agentes antiinflamatorios y analgésicos, y como inhibidores tanto de la enzima ciclooxigenasa (Cox) como de la enzima lipoxigenasa (5-LPO) se describió por primera vez en el documento US 4.556.672. Por supuesto, en la composición de tenidap pueden realizarse diversas modificaciones, por ejemplo, de grupos laterales o átomos que son bien conocidas en la técnica.

Se describen derivados de tenidap o derivados de 2-oxindol 3 sustituido, por ejemplo, en los documentos US 4.556.672; US 4.658.037; US 4.721.712; US 5.290.802; US 5.118.703; US 5.270.331; US 5.298.522; US 5.086.186; US 5.449.788 y US 5.795.902. En la técnica son bien conocidos diversos procesos para la síntesis de tenidap y otras 2-oxindol-1-carboxamidas 3 sustituidas, véanse por ejemplo los documentos US 4.652.658; US 4.665.194; US 4.952.703; EP-B1 155 828, WO 90/04393, WO 94/07488, WO 94/17061, WO 95/20574; WO 97/36895, *van Deurzen et al.*, J. Mol. Catal. B-Enzym., 2 (1996), 33-42; *Porcs-Makkay y Simig*, Org. Process. Res. Dev., 4 (2000), 10-16; *Kumar et al.*, Org. Process. Res. Dev., 5 (2001), 61-64. La forma cristalina anhidra de la sal de sodio de tenidap se describe en los documentos US 5.036.099 y WO 88/05656. En los documentos EP-B1 508 311 y EP-B1 508 310 se mencionan, respectivamente, composiciones inyectables y composiciones farmacéuticas para la administración rectal de tenidap. En la técnica anterior también se describe que el tenidap o un derivado del mismo puede administrarse en combinación con tetraciclina (US 5.308.839) o metotrexato (WO 96/35419) para el tratamiento de la artritis reumatoide. En el documento WO 96/33701 se describe la inhibición de la fotodescomposición de tenidap y otras 2-oxindol-1-carboxamidas 3-sustituidas.

Se han descrito otras aplicaciones de tenidap o un derivado del mismo y otras 2-oxindol-1-carboxamidas 3-sustituidas para la inhibición de la biosíntesis de interleucina-1 en mamíferos y para el tratamiento de trastornos mediados por interleucina-1 (documento US 4.861.794); para la inhibición de la liberación de elastasa a partir de neutrófilos (documento US 5.006.547); para la supresión de la función de células T en mamíferos y para el tratar trastornos autoinmunes mediados por células T de tipo sistémico y con especificidad de órgano (documento US 4.853.409; *Dolhain et al.*, Scand J. Immunol. 42(1995), 686-693). El tenidap también se usa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (documentos WO 96/31209; US 5.545.656).

También se ha demostrado que el tenidap o un derivado del mismo, o sus sales de bases farmacéuticamente aceptables, inhiben la activación de la collagenasa, trata trastornos y enfermedades mediadas por collagenasa e inhiben la actividad de la mieloperoxidasa en mamíferos (documento US 5.008.283). El tenidap puede reducir el colesterol total en suero, el colesterol LDL y los triglicéridos (documento US 5.122.534) y puede usarse para el tratamiento de lesiones de miocardio inducidas por isquemia y lesiones de miocardio mediadas por citoquinas (EP-B1 679 396). Sin embargo, ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe el uso de tenidap o sus derivados, o de 2-oxindol-1-carboxamidas 3 sustituidas para tratar, por ejemplo, trastornos afectivos tales como depresión.

Sanz et al., Eur. J. Pharmacol. 355 (1998), 235-244 sugieren que el tenidap puede mejorar la actividad del receptor de P2X7. Se sugiere que el tenidap puede actuar aumentando los niveles de ATP o mejorando el efecto del ATP sobre P2X7. El ATP es el ligando natural de P2X7R. Por consiguiente, el tenidap o un derivado del mismo es un modulador (es decir, un agonista) de P2X7R como se describe en este documento, ya que un modulador se define como un compuesto que modula directa o indirectamente la actividad o expresión de P2X7R. Haciendo uso de las enseñanzas de la presente invención de que los moduladores (es decir, agonistas) de P2X7R son útiles para tratar trastornos

- afectivos, se prevé que el tenidap o un derivado del mismo se use como un modulador (es decir, agonista) de la actividad de P2X7R para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno afectivo, describiéndose ejemplos de dicha composición en este documento. La preparación de composiciones farmacéuticas, los modos de administración, etc., se han descrito anteriormente y se describen más adelante y se aplican al uso de tenidap o el derivado mencionado anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica, cambiando lo que corresponda. Además, lo que se describe en este documento con respecto a los usos para tratar trastornos afectivos se aplica al uso del tenidap o el derivado mencionado anteriormente para tratar trastornos afectivos, cambiando lo que corresponda.
- Además, la presente solicitud prevé que los moduladores (es decir, agonistas) de P2X7R puedan usarse en cualquier combinación para tratar un trastorno afectivo. Por ejemplo, pueden usarse conjuntamente BzATP y tenidap o 2-oxindol-1-carboxamidas 3 sustituidas, por ejemplo, simultáneamente o por medio de la administración sucesiva para tratar un trastorno afectivo.
- Preferiblemente, la composición farmacéutica descrita en este documento opcionalmente comprende además moléculas que tienen propiedades protectoras de las células capaces de alterar las características de los componentes de la invención, por ejemplo, modulando de esta manera, preferiblemente bloqueando posibles efectos secundarios adversos o negativos indeseados de estos componentes. Uno de estos posibles efectos secundarios adversos o negativos indeseados es la formación de poros en la membrana celular de células tratadas que finalmente conduce a la apoptosis. Por consiguiente, estas moléculas adicionales pertenecen a la clase de moduladores de receptores beta-adrenérgicos que incluyen agonistas o antagonistas que tienen propiedades estabilizadoras de la membrana. Los moduladores de receptores beta-adrenérgicos, incluyendo agonistas y antagonistas, son compuestos que reducen o aumentan las respuestas cronotrópicas positivas, inotrópicas positivas, broncodilatadoras y vasodilatadores producidas por agonistas o antagonistas de receptores beta-adrenérgicos. La magnitud de esta respuesta reducida o aumentada es proporcional al tono simpático existente y a la concentración de agente bloqueante del receptor beta-adrenérgico que alcanza los sitios receptores. Un modulador de un receptor beta-adrenérgico en el contexto de la presente invención, de esta manera, es un antagonista o agonista. La actividad de un antagonista o agonista de un receptor beta-adrenérgico puede determinarse como se bien conocido en la técnica. La actividad de los receptores beta-adrenérgicos puede determinarse midiendo la acumulación de adenosina mono-fosfato cíclico (AMPC) en células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO pueden transfectarse únicamente con el ADNc que codifica el receptor beta1-, beta2-, o beta3-adrenérgico humano bajo el control del promotor de CMV o cualquier otro elemento promotor adecuado. La transfección de las células se realiza usando métodos de transfección de células convencionales, véase por ejemplo, *Joyner*, "Gene Targeting: A Practical Approach", Oxford University Press, New York, 1993. Después se cultivan células que sobreexpresan uno de los genes beta-adrenérgicos hasta la confluencia en medio F12 de Ham (Gibco BRL) que contiene suero bovino fetal al 10%, 500 mg/ml de Geneticina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 250 ng/ml de fungizona de acuerdo con el procedimiento descrito en el catálogo de líneas celulares e hibridomas de la American Type Culture Collection, Séptima Edición, 1992, p. 36, ATCC CCL 61 CHO-K1. Los compuestos moduladores de receptores beta-adrenérgicos pueden prepararse como soluciones madre 10 mM en DMSO (DMSO al 0,1%, concentración final), diluirse en medio F12 de Ham y añadirse a las células a una concentración de 10^{-10} a 10^{-5} M junto isobutilmetilxantina 10^{-3} M para inhibir la actividad fosfodiesterasa. Los medios y las células después se incuban durante 5 minutos a 37°C. Al final de este periodo, el medio se aspira y las células se lisan en HCl 0,01 N. El contenido celular de AMPC después puede determinarse por radioinmunoensayo (RIA) usando un kit de New England Nuclear (Burlington, Mass). Existe una correlación directa entre el contenido celular de AMPC y la activación/inhibición del receptor beta-adrenérgico. En la técnica se describen bien otros métodos para determinar la actividad de un receptor beta-adrenérgico, véase por ejemplo, *Vansal* y Feller, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19 (1999) 853-863; *Durocher et al.*, Anal. Biochem. 284 (2000) 316-326.
- Los ejemplos de compuestos que se ajustan a la definición de un agente modulador de un receptor beta-adrenérgico incluyen, pero sin limitación, antagonistas de receptores beta-adrenérgicos conocidos tales como timolol, sotalol, esmolol, cateolol, propanolol, betaxolol, penbutolol, metoprolol, acebutolol, atenolol, metoprolol, pindolol y bisoprolol, y sus sales, hidratos, solvatos y cualquier forma cristalina en la que puedan aparecer. En el documento US 5.776.930 se describen otros ejemplos de agentes bloqueantes de receptores beta-adrenérgicos. Son ejemplos preferidos de antagonistas de receptores beta-adrenérgicos DL-propanolol, D-propanolol y labetalol. El DL-propanolol y el labetalol son antagonistas de receptores beta-adrenérgicos con propiedades estabilizadoras de la membrana, mientras que el D-propanolol es un isómero óptico con una baja actividad bloqueante de receptores beta-adrenérgicos. La adición opcional de antagonistas o agonistas de receptores beta-adrenérgicos a la composición farmacéutica de la presente invención para tratar un trastorno afectivo puede ser útil en el contexto de la administración de agonistas de P2X7R. Esto se debe a que la técnica anterior sugiere que la activación de P2X7R por agonistas puede ocasionar muerte celular por medio de la inducción de la formación de poros dentro de la membrana celular. Sin embargo, como se demuestra en el Ejemplo 9 de la presente solicitud, el efecto de la actividad de formación de poros descrito para los agonistas de P2X7R por la técnica anterior sólo se observaba en muy pocas células. Recientemente, *Alzola et al.*, Cell Signal. 13 (2001), 465-473 han demostrado que concentraciones de 10 a 300 μ M de DL-propanolol, D-propanolol o labetalol pueden inhibir la actividad de formación de poros de P2X7R sin afectar a la apertura de la actividad del canal de cationes de P2X7R. Por el documento FR 2768626 se sabe también que los moduladores de receptores beta-adrenérgicos, por ejemplo, los agonistas, son útiles como agentes inhibidores de la apoptosis. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, se administran moduladores de receptores beta-adrenérgicos, incluyendo antagonistas o agonistas, en combinación con agonistas de P2X7R para el tratamiento de trastornos afectivos. Dichos antagonistas o agonistas de receptores beta-adrenérgicos se administran preferiblemente en una concentración de 10 a 300 μ M.

La dosificación, preparación farmacéutica y administración del agente modulador de P2X7R (es decir, agonista) para uso de acuerdo con la presente invención puede formularse de una manera convencional de acuerdo con métodos encontrados en la técnica, usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicos, véase, por ejemplo *Ansel et al.*, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", séptima edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. De esta manera, el agente modulador de P2X7R y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por inhalación, insuflación (a través de la boca o la nariz), administración oral, bucal, parenteral o rectal.

Para la administración oral, la composición farmacéutica del agente modulador de P2X7R puede tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticos aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrógeno fosfato cálcico), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, almidón glicolato sódico) o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto deshidratado para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Esta preparación líquida puede prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, jarabe, derivados de celulosa, grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina, goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales fraccionados), conservantes (por ejemplo, p-hidroxicarbonatos de metilo o propilo, ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes y agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes cuando se considere apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de forma conveniente para proporcionar la liberación controlada del agente que modula la actividad de P2X7R.

Para la administración por inhalación, el agente que modula P2X7R (es decir, el agonista) para uso de acuerdo con la presente invención, convenientemente se administra en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un envase presurizado o nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para uso en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla en polvo del agente modulador de la actividad de P2X7R y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Un agente modulador de P2X7R (es decir, agonista) puede formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. El sitio de inyección incluye un sitio intravenoso, intraperitoneal o subcutáneo. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en una ampolla, en un recipiente de múltiples dosis) y con un conservante añadido. El agente que modula la actividad de P2X7R puede tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. Como alternativa, el agente puede estar en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril sin pirógenos) antes del uso.

Si se desea un agente para modular P2X7R (es decir, un agonista), puede presentarse en un envase o en un dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen dicho agente. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un blister. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

En una realización más preferida, los usos antes mencionados se prevén para tratar trastornos afectivos seleccionados del grupo compuesto por depresión mayor, trastorno de ansiedad generalizada o trastorno bipolar.

En una realización particularmente preferida, dicha depresión mayor se selecciona entre el grupo compuesto por depresión mayor, distimia, depresión atípica, trastorno disfórico premenstrual y trastorno afectivo estacional.

En otra realización particularmente preferida, dicho trastorno de ansiedad generalizada se selecciona entre el grupo compuesto por trastorno de pánico, fobias, agorafobia, fobia social, fobia específica, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de estrés postraumático, trastorno de ansiedad de separación, manía, hipomanía y trastorno ciclotímico.

Otra realización particularmente preferida es que dicho trastorno bipolar es el trastorno bipolar de tipo I o el trastorno bipolar de tipo II.

Además, la presente solicitud se refiere a un kit que comprende la molécula de ácido nucleico, el vector, el hospedador, el polipéptido, el anticuerpo o el aptámero, el cebador o un par de cebadores antes descritos o la molécula identificada o caracterizada en un método como se describe más adelante en este documento.

Ventajosamente, el kit comprende, además, opcionalmente (un) tampón (tampones) de reacción, soluciones de almacenamiento y/o los demás reactivos o materiales necesarios para realizar ensayos científicos o de diagnóstico o similares. Además, partes del kit de la invención pueden envasarse individualmente en viales o frascos o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes.

El kit de la presente invención puede usarse ventajosamente, entre otras cosas, para realizar el método para producir un polipéptido antes descrito, el método o métodos de identificación y/o caracterización de moléculas que interaccionan específicamente con canales iónicos de apertura por ATP P2X7R como se describe en este documento más adelante, y podría emplearse en una diversidad de aplicaciones mencionadas en este documento, por ejemplo, como kits de diagnóstico, como herramientas de investigación o herramientas terapéuticas. Además, el kit puede contener medios para detección adecuados para fines científicos, médicos y/o de diagnóstico. La fabricación de los kits preferiblemente sigue procedimientos convencionales que son conocidos para la persona especialista en la técnica.

Además, la presente solicitud describe un método para identificar compuestos o mezclas de compuestos que puedan interaccionar específicamente con un polipéptido descrito en este documento, que comprende las etapas de (a) poner en contacto un polipéptido descrito anteriormente con un compuesto candidato o mezcla de compuestos a ensayar; y (b) determinar si dicho compuesto o mezcla puede interaccionar específicamente con dicho polipéptido. El polipéptido puede proporcionarse directamente o por medio de la expresión de una molécula o vector de ácido nucleico correspondiente como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedadora adecuada.

Además, la presente solicitud describe un método para la caracterización de compuestos que pueden alterar características de los polipéptidos descritos en este documento, que comprende las etapas de (a) poner en contacto un polipéptido descrito anteriormente con dicho compuesto y (b) determinar si el compuesto altera una característica de dicho polipéptido.

La expresión “alterar las características del polipéptido descrito en este documento” significa que se alteran, es decir, se cambian las características funcionales en dicho polipéptido en comparación con las características funcionales que tenía antes de entrar en contacto con los compuestos identificados por el método descrito anteriormente.

Dicha identificación y/o caracterización de compuestos que pueden interaccionar o alterar características del polipéptido descrito anteriormente puede conseguirse, entre otras cosas, por transfección de un hospedador apropiado con una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente, comprendiendo dichos hospedadores, pero sin limitación, células HEK 293, o por inyección en oocitos de rana, preferiblemente en un oocito de *Xenopus* para la expresión funcional (Goldin, Methods Enzymol. 207 (1992), 266). Los canales de apertura por ATP P2X7R expresados pueden examinarse usando técnicas convencionales de pinzamiento zonal de dos electrodos (Stuhmer, Methods Enzymol. 207 (1992), 319; Kohler, Science 273 (1996), 1709). Después de la expresión de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R como se define en este documento, pueden deducirse corrientes de membrana en ausencia y/o presencia de la molécula a identificar y/o caracterizar. Los métodos para la deducción de las corrientes de membrana son bien conocidos en la técnica y comprenden, por ejemplo, métodos de pinzamiento zonal como los descritos en Hamill, Pflüger's Arch, 391 (1981), 85-100 o pinzamiento de voltaje de dos electrodos en oocitos, como se describe en Methfessel, Pflügers Archive 407 (1986), 577-588. De acuerdo con la presente invención, la expresión “que interacciona con los polipéptidos descritos en este documento” significa que estos polipéptidos interaccionan directa o indirectamente con compuestos identificados por el método descrito anteriormente.

Además, la presente solicitud describe un método para seleccionar moléculas que sean capaces de interaccionar con el polipéptido descrito anteriormente, que comprende las etapas de (a) poner en contacto dicho polipéptido con una molécula; y (b) medir y/o detectar una respuesta; y (c) comparar dicha respuesta con una respuesta convencional como la medida en ausencia de dicha molécula candidata.

En el presente documento también se describe un método para identificar un compuesto que puede mejorar o reducir la expresión del gen de P2X7R, que comprende las etapas de poner en contacto una célula que expresa el gen de P2X7R a partir de su promotor natural o un gen indicador dirigido por el promotor de P2X7R y determinar si la expresión del gen se aumenta o reduce en comparación con las condiciones en las que el compuesto no está presente.

Las posibles moléculas candidatas o mezclas candidatas de moléculas pueden ser, entre otras, sustancias, compuestos o composiciones de origen químico o biológico, que se producen de forma natural y/o que se producen de forma sintética, recombinante y/o química, o compuestos o composiciones descritos anteriormente en este documento. De esta manera, las moléculas candidatas pueden ser proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, aminoácidos y/o derivados de los mismos u otros compuestos tales como iones, que se unen y/o interaccionan con canales iónicos de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre. Estos compuestos candidatos de unión y/o interacción pueden encontrarse empleando, entre otros, sistemas doble híbrido de levadura o sistemas doble híbrido de levadura modificados como se describe, por ejemplo Fields, Nature 340 (1989), 245-246; Gyuris Cell 75 (1993), 791-801; o Zervos Cell 72 (1993), 223-232.

Además, las posibles moléculas candidatas pueden ponerse en contacto con una célula, tal como un oocito o una célula HEK 293, que expresa un polipéptido descrito anteriormente o con un trozo de membrana que comprende dicho polipéptido, y puede medirse la respuesta correspondiente (entre otras, una respuesta de respuesta a la dosis, una respuesta de corriente, o una respuesta de un solo canal de corriente) para esclarecer cualquier efecto que produzca dicha molécula candidata.

En el presente documento también se describen métodos para identificar, caracterizar y seleccionar moléculas que puedan interaccionar con canales iónicos de apertura por ATP P2X7R descritos en este documento, que comprenden los denominados métodos de selección de alto rendimiento y estrategias similares que se conocen en la técnica

(*Spencer*, *Biotechnol. Bioeng.* 61 (1998), 61-67; *Oldenburg*, *Annu. Rev. Med. Chem.* 33 (1998), 301-311) realizadas usando placas de 96 pocillos, 384 pocillos, 1536 pocillos (y otras). Además, los métodos a emplear comprenden, pero sin limitación, lecturas de fluorescencia homogéneas en selecciones de alto rendimiento (como se describe, entre otros, en *Pope*, *Drug Discovery Today* 4 (1999), 350-362). El método para la identificación, caracterización y/o selección de moléculas capaces de interaccionar con canales iónicos de apertura por ATP P2X7R pueden emplear, entre otras cosas, hospedadores como los definidos en este documento que expresan el polipéptido descrito anteriormente. Los ensayos basados en células, la instrumentación para dichos ensayos y/o las mediciones son bien conocidos en la técnica y se describen, entre otros sitios, en *Gonzalez*, *Drug Discovery Today* 4 (1999), 431-439 o *Ramm*, *Drug Discovery Today* 4 (1999) 401-410. También se prevé que las selecciones de alto rendimiento descritas en este documento se realicen usando, por ejemplo, ARNc (es decir, ARN sintético procedente de una construcción de ADNc) que puede introducirse en células hospedadoras, tales como oocitos de *Xenopus*, usando métodos rutinarios en la técnica. Como ejemplo, puede emplearse la inyección directa de ácido nucleico, tal como el sistema de microinyección de Eppendorf (Micromanipulator 5171 y Transjector 5242). Las células inyectadas/transformadas pueden analizarse con respecto a las corrientes iónicas aproximadamente 4 horas después usando técnicas de pinzamiento zonal que se ponen en práctica comúnmente en la técnica.

Además, la presente solicitud describe un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende las etapas de un método para identificar, caracterizar y/o seleccionar moléculas que puedan interaccionar y/o alterar las características de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y que comprende además una etapa en la que se genera un derivado de dicha molécula identificada, caracterizada y/o seleccionada. Dicho derivado puede generarse, entre otras cosas, por peptidomiméticos.

La solicitud además describe un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende las etapas del método descrito anteriormente para identificar, caracterizar, seleccionar y/o modificar moléculas que pueden interaccionar y/o alterar las características de un canal iónico de apertura por ATP P2X7R y formular las moléculas identificadas, caracterizadas, seleccionadas y/o modificadas en una forma farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, el método es un método en el que dicha o dichas moléculas comprenden una o más moléculas neuroprotectoras, una o más moléculas nootrópicas y/o una o más moléculas antiepilépticas.

Otro aspecto es el uso de un polipéptido P2X7R, en particular los descritos en este documento, para identificar agentes biológicos, químicos o farmacológicos que pueden tener un efecto antidepresivo. El término "agente" se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra de manera apropiada a un sujeto o a una célula. Por ejemplo, la presente descripción permite la generación de células que expresan P2X7R para la identificación y caracterización de agentes que modulan el flujo de entrada y de salida de iones. Por ejemplo, las células HEK 293, u otras líneas celulares (por ejemplo, HCN-1A, HCN-2, HIT-T15, RIN-m5F, betaTC3; PC12, HT22, SH-SY5Y, Neuro2A o CA77), pueden transfectarse de forma estable con ADNc que codifica el P2X7R humano y cultivarse en placas de 12, 96 y 384 pocillos. Dichas células se cultivan en un medio apropiado. Los ejemplos de estos medios son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, *Freshney*, "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", cuarta edición, Wiley-Liss Publishing, 2000.

Dichas células después pueden preincubarse con dichos agentes durante 15 minutos antes de la estimulación con ATP 3 mM durante 10 minutos. Las reacciones después se terminan por medio de una rápida aspiración del medio extracelular en cada pocillo. Las células de cada pocillo posteriormente se extraen durante una noche con 1 ml de HNO₃ al 10%. El contenido de potasio (K⁺) en los extractos puede determinarse por espectrofotometría de absorbancia atómica. Después se mide la función del agente por medio del porcentaje de inhibición de la estimulación de la liberación de K⁺ inducida por ATP 3 mM y se compara con la liberación de K⁺ en ausencia de los agentes. La actividad de P2X7R también puede monitorizarse en función del movimiento de calcio (Ca²⁺; véase *Denyer et al.*, *Drug Discov. Today* 7 (1998), 323-332; *González et al.*, *Drug Discov. Today* 9 (1999), 431-439; *Helmchen y Waters*, *Eur. J. Pharmacol.* 447 (2002), 119-129). Los agentes también pueden verificarse en ausencia de ATP.

La actividad de P2X7R también puede controlarse de acuerdo con la secreción de neurotransmisores tales como glutamato y GABA. Los niveles de neurotransmisores en las células tratadas pueden cuantificarse por métodos adecuados, por ejemplo, por ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Usando estos métodos, puede explorarse un gran número de compuestos con respecto al aumento en la secreción de neurotransmisores (por ejemplo, glutamato). La liberación de glutamato puede medirse, por ejemplo, por ensayos fluorométricos de liberación de glutamato (por ejemplo, Kit de Ensayo de Ácido Glutámico/Glutamato Oxidasa Amplex Red, Molecular Probes) o electrofisiología de alto rendimiento.

Además, en el presente documento se describe que los polipéptido P2X7R descritos aquí se usan en un método para identificar compuestos o agentes que tienen actividad agonista de dichos P2X7R o de los polipéptidos descritos anteriormente. Los agentes y compuestos se definen y describen más adelante en este documento y también se han definido y descrito anteriormente. En particular, las células que expresan el gen de P2X7R se ponen en contacto con agentes, moléculas o compuestos candidatos como se han descrito anteriormente y se mide el flujo de entrada de calcio o la entrada de bromuro de etidio por métodos conocidos en la técnica, descritos anteriormente en este documento y descritos en particular en el Ejemplo 8 presentado más adelante. Las células usadas en el método para identificar agonistas de P2X7R son preferiblemente células de una línea celular de hipocampo. Las líneas celulares de hipocampo se preparan por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en los documentos EP 0 773 287 o EP 0 773

292. Son ejemplos no limitantes de líneas celulares de hipocampo células de hipocampo H19-7 de rata (ATCC-2526) descritas en Eves *et al.* Proc. Natt. Acad. Sci. USA 89 (1992), 4373-4377, células de hipocampo HN9.10 de ratón descritas en Lee *et al.* J. Neurosci. 10 (1992), 1779-1787 o células de hipocampo Hi5B de rata descritas en Renfranz *et al.*, Cell 66 (1991), 713-729. Preferiblemente, las células de hipocampo usadas de acuerdo con el método mencionado anteriormente son células de la serie HT (véase Davis y Maher (1994), Brain Res. 652, 169-173), Morimoto y Koshland (1990), Neuron 5, 875-880). También se prefiere que las células de hipocampo expresen el gen endógeno de P2X7R. Sin embargo, también se prevé que estas células puedan modificarse genéticamente introduciendo un gen de P2X7R exógeno usando métodos conocidos comúnmente en la técnica. Más preferiblemente, se usan células HT-22 para identificar agonistas del polipéptido P2X7R descrito en este documento o de los polipéptidos descritos en este documento y se usan células HT-39 como control negativo como se describe en el Ejemplo 8 indicado más adelante.

Por ejemplo, se transfectan células con construcciones de ácido nucleico que codifican un gen indicador regulado por el promotor de P2X7R (véase anteriormente), pudiendo analizarse un aumento o reducción en la expresión del gen indicador en respuesta a agentes biológicos o farmacéuticos usando métodos que detectan niveles o estados de la proteína o el ARNm presente en la célula correspondiente o que detectan actividades biológicas del gen indicador. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. El diseño de estos ensayos de selección de fármacos es bien conocido en la técnica (véase Harvey ed. "Advances in drug discovery techniques", John Wiley and Sons, 1998; Vogel and Vogel eds. "Drug discovery and evaluation: Pharmaceutical assays", Springer-Verlag Berlin, 1997). Por ejemplo, puede usarse la selección de fármacos en modelos animales, ensayos *in vitro* usando células animales o ensayos *in vivo* que implican ensayos toxicológicos en animales. Puede usarse un modelo *in vitro* para seleccionar bibliotecas de compuestos en cualquiera de una diversidad de técnicas de selección de fármacos.

Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular mayor de 50 y menor de aproximadamente 2.500 Daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente por medio de la formación de enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores.

Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas que incluyen péptidos, aminoácidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, ácidos nucleicos y derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorios. Como alternativa, se dispone o se pueden producir fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos de forma sintética se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas aleatorias o dirigidas tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales.

Otra técnica para la selección de fármacos que puede usarse proporciona la selección de alto rendimiento de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a la proteína de interés como se describe en la publicación de la solicitud PCT WO 84/03564. En este método, cuando se aplica a las proteínas descritas en este documento, se proporcionan o sintetizan grandes números de compuestos de ensayo pequeños diferentes, por ejemplo, aptámeros, péptidos, compuestos de bajo peso molecular, en un sustrato sólido, tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con las proteínas o sus fragmentos y se lavan. Las proteínas unidas después se detectan por métodos bien conocidos en la técnica. Las proteínas purificadas también pueden aplicarse como un recubrimiento directamente sobre las placas para uso en las técnicas de selección de fármaco mencionadas anteriormente. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos no neutralizadores para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido. En otra realización, se pueden usar ensayos de selección de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizadores capaces de unirse a la proteína compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión a la proteína. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con la proteína.

La presente solicitud, de una forma más particular, describe un método en el que la composición farmacéutica a producir comprende además sustancias neuroprotectoras, sustancias nootrópicas, azul brillante, piperidina o derivados de la misma, derivados de adamantina, compuestos de fenilo sustituidos, ATP oxidado, 2-O-(4-benzoilbenzoil) adenosina-5-trifosfato o 3-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina-5-trifosfato. También se prevé que las composiciones farmacéuticas a producir comprendan además antidepresivos tales como fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluoxamina, mirtazapina, reoretina, nefazodona o carbonato de litio.

Preferiblemente, los compuestos de los métodos mencionados anteriormente comprenden antagonistas, antagonistas parciales, agonistas parciales y/o agonistas para un canal iónico de apertura por ATP P2X7R alterado.

Cuando se usa en este documento el término “antagonista”, indica moléculas/sustancias que pueden inhibir y/o reducir un efecto agonista. El término “antagonista” comprende antagonistas competitivos, no competitivos, funcionales y químicos como se describe, entre otros sitios, en *Mutschler*, “Arzneimittelwirkungen” (1989), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Alemania. La expresión “antagonista parcial”, cuando se usa en este documento, significa una molécula/sustancia que puede bloquear incompletamente la acción de agonistas a través de, entre otras cosas, un mecanismo no competitivo.

En el contexto de la presente invención, un antagonista preferiblemente es un fármaco que no provoca una respuesta por sí mismo, pero bloquea respuestas mediadas por agonistas. Es una entidad química que se opone a las respuestas asociadas con el receptor normalmente inducidas por otro agente bioactivo. Para el P2X7R, los antagonistas tienen un valor de CI50 comprendido entre 10 nanomolar y 300 micromolar.

Como “agonista”, de acuerdo con esta invención, se indican moléculas/sustancias que tienen una afinidad así como una actividad intrínseca. Principalmente, dicha actividad intrínseca (α) se define como proporcional al cociente entre el efecto inducido por dicho agonista (EA) y el efecto que puede obtenerse de forma máxima en un sistema biológico dado (Emáx); por lo tanto, la actividad intrínseca puede definirse como

$$\alpha \approx \frac{E_A}{E_{\text{máx}}}$$

La máxima actividad intrínseca relativa se obtiene cuando $EA/Emáx = 1$. Los agonistas con una actividad intrínseca de 1 son agonistas completos, mientras que las sustancias/moléculas con una actividad intrínseca > 0 y < 1 son agonistas parciales. Los agonistas parciales muestran un efecto dual, es decir, comprenden efectos agonistas así como efectos antagonistas.

Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, un agonista (o agonista completo) es una sustancia endógena o un fármaco que puede interactuar con un receptor e iniciar una respuesta fisiológica o farmacológica máxima o completa característica de ese receptor. El ATP, el ligando natural para P2X7R, es un agonista con una CE50 de 300 micromolar, mientras que el agonista de P2X7R sintético Bz-ATP tiene un valor de CE50 de 8 micromolar. De esta manera, los agonistas de P2X7R tienen un valor de CE50 igual o menor de 300 micromolar. La CE50 se define como la concentración de agonista que provoca una respuesta a medio camino entre la respuesta basal y la respuesta máxima en una curva de dosis-respuesta donde el eje X representa la concentración de un agonista y el eje Y representa la corriente de iones. Un agonista inverso (también denominado antagonista negativo) es un fármaco que actúa en el mismo receptor que el de un agonista, aunque produce un efecto opuesto. Un agonista parcial es una sustancia endógena o un fármaco que también provoca una respuesta fisiológica o farmacológica, pero donde la respuesta máxima es menor que la respuesta máxima a un agonista completo, independientemente de la cantidad de fármaco aplicado. En el caso de P2X7R, los agonistas parciales tienen valores de CE50 mayores de 300 micromolar.

Por lo tanto, el especialista en la técnica puede emplear fácilmente los compuestos y los métodos descritos en este documento para esclarecer los efectos agonistas y/o antagonistas y/o características de un compuesto/molécula/sustancia a identificar y/o caracterizar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, un antagonista identificado del canal iónico de apertura por ATP P2X7R que comprende la mutación o mutaciones y/o delección o delecciones descritas anteriormente en este documento puede ser útil para reestablecer las propiedades mostradas normalmente por los canales iónicos de apertura por ATP P2X7R de tipo silvestre. Un agonista identificado del canal iónico de apertura por ATP P2X7R que comprende la mutación o mutaciones y/o delección o delecciones descritas anteriormente en este documento puede ser útil para reestablecer la funcionalidad perdida del canal iónico de apertura por ATP P2X7R.

Las figuras indican:

Figura 1a. Mapa genómico de la región del cromosoma 12 humano asociada con el trastorno afectivo bipolar. Se representan los genes encontrados entre los marcadores NBG11 y NBG2.

Figura 1b. Ilustración gráfica del análisis multipuntual usando ASPEX en pares de hermanos independientes.

Figura 1c. Gráfico que ilustra el análisis multipuntual usando ASPEX en todos los pares de hermanos.

Figura 1d. Gráfico que ilustra el programa ASPEX sib_phase considerando solo pares de hermanos independientes.

Figura 1e. Gráfico que ilustra el programa ASPEX sib_phase considerando todos los pares de hermanos.

Figura 1f. Efecto del polimorfismo P2XR7v13A sobre niveles basales de cortisol antes y después de la administración de dexametasona (ensayo DST). Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días siguientes a la admisión. Los individuos con los genotipos AG y GG tienen niveles de cortisol significativamente menores antes y después de la administración de dexametasona.

Figura 1g. Efecto del polimorfismo P2XR7v13A sobre la respuesta de cortisol durante el ensayo Dex/CRH. Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días posteriores a la admisión (es decir, en el periodo de admisión) y por último diez días después del alta (es decir, en el periodo de alta). Los individuos con el genotipo GG tienen menores niveles de cortisol en respuesta al ensayo Dex/CRH en el periodo de admisión y en el periodo de alta. Estos resultados indican un eje HPA normal.

Figura 1h. Efecto del polimorfismo de P2XR7v13A sobre la respuesta de ACTH durante el ensayo Dex/CRH. Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días posteriores a la admisión (es decir, en el periodo de admisión) y por último diez días después del alta (es decir, en el periodo de alta). Los individuos con el genotipo GG tienen menores niveles de ACTH en respuesta al ensayo Dex/CRH, en el periodo de admisión y en el periodo de alta. Estos resultados indican un eje HPA anormal.

Figura 1i. Duración del tratamiento antidepresivo hasta la remisión. La depresión se diagnostica de acuerdo con la Escala de Evaluación de Depresión de Hamilton (HAM-D; Hamilton, Br. J. Soc. Clin. Psychol. 6 (1967) 278-296). Una puntuación HAM-D de 10 o menor se considera remisión de los síntomas depresivos.

Figura 1j. Efecto del polimorfismo de P2XR7v13C sobre los niveles basales de cortisol antes y después de la administración de dexametasona (ensayo DST). Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días posteriores a la admisión. Los individuos con los genotipos CC tienen niveles de cortisol elevados después de la administración de dexametasona.

Figura 1k. Efecto del polimorfismo P2XR7v13C sobre la respuesta de cortisol durante el ensayo Dex/CRH. Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días posteriores a la admisión (es decir, en el periodo de admisión) y por último diez días después del alta (es decir, en el periodo de alta). Los individuos con el genotipo AC o CC tienen niveles de cortisol elevados en respuesta el ensayo Dex/CRH en el periodo de admisión, indicando un eje HPA anormal.

Figura 1l. Efecto del polimorfismo de P2XR7v13C sobre la respuesta de ACTH durante el ensayo Dex/CRH. Los individuos se sometieron al ensayo en los diez días posteriores a la admisión (es decir, en el periodo de admisión) y por último diez días después del alta (es decir, en el periodo de alta). Los individuos con el genotipo CC tienen menores niveles de ACTH en respuesta al ensayo Dex/CRH, en el periodo de admisión y en el periodo de alta. Estos resultados indican un eje HPA anormal.

Figura 2. Análisis RT-PCR de la secuencia codificante completa de P2X7R en diferentes tejidos.

Figura 3. Expresión de P2X7R en el bulbo olfativo, hipotálamo y células endoteliales en el cerebro de un ratón sin estrés. 100 aumentos.

Figura 4. Expresión de P2X7R en el hipocampo/gyro dentado y órgano subcomisural en el cerebro de un ratón sin estrés. 100 aumentos.

Figura 5. Comportamiento de flotación en el ensayo de natación forzada. El comportamiento de afrontamiento pasivo de estrés se redujo después de un tratamiento a largo plazo con el antidepresivo paroxetina (Par28: tratado con paroxetina durante 28 días, per os). Basal n = 8; vehículo n = 8; Par28 n = 8.

Figura 6. Análisis comparativo de expresión de P2X7R en el bulbo olfativo de ratones sin estrés tratados con vehículo y tratados con antidepresivo. 100 aumentos.

Figura 7. Análisis comparativo de expresión de P2X7R en el hipotálamo de ratones sin estrés, tratados con vehículo y tratados con antidepresivo. 100 aumentos.

Figura 8. Análisis comparativo de expresión de P2X7R en células endoteliales de ratones sin estrés tratados con vehículo y tratados con antidepresivo. 100 aumentos.

Figura 9. Análisis comparativo de expresión de P2X7R en el hipocampo de ratones sin estrés tratados con vehículo y tratados con antidepresivo. 25 aumentos.

Figura 10. Expresión de P2X7R en el hipocampo de un ratón tratado con vehículo. 25 aumentos.

Figura 11. Expresión de P2X7R en el hipocampo de un ratón tratado con el antidepresivo paroxetina. 25 aumentos.

Figura 12. Expresión detallada de P2X7R en el giro dentado de un ratón tratado con el antidepresivo paroxetina. 400 aumentos.

Figura 13. Análisis comparativo de expresión de P2X7R y células apoptóticas en el hipocampo de un ratón tratado con el antidepresivo paroxetina. 100 aumentos.

Figura 14. Comportamiento de flotación en el ensayo de natación forzada. El comportamiento de afrontamiento pasivo de estrés aumentó después de la inyección intrahipocampal aguda (bilateral, giro dentado) de ARNsi dirigido a P2X7R. Vehículo n = 7; ARN de control n = 10; ARNsi de P2X7R n = 9.

5 Figura 15. Análisis comparativo de expresión de P2X7R en el hipocampo de ratones tratados con vehículo, ARN de control y de ARNsi dirigido a P2X7R. 100 aumentos fila superior, 25 aumentos fila inferior.

Figura 16a, b, c, d, e. Tres variantes de corte y empalme producidas por polimorfismos en los intrones de P2X7R.

10 Figura 17. Expresión de P2X7R en líneas de células de hipocampo inmortalizadas.

Figura 18. Aumento de la entrada de calcio en células de hipocampo tratadas con un compuesto agonista de P2X7R (BzATP).

15 Figura 19a, b. Entrada de colorante bromuro de etidio en células del hipocampo (a) tratadas con compuesto agonista de P2X7R (BzATP) o (b) pretratadas con un compuesto antagonista de P2X7R.

Figura 19c. Acción agonista de BzATP y tenidap sobre la actividad de P2X7R. Se midió la actividad del canal de calcio de P2X7R humano en condiciones basales durante 4 segundos a 10 segundos. A. Control negativo que consistía en células cargadas con Fluo-4-AM 10 μ M sin tratamiento adicional. B. Células tratadas con BzATP 20 μ M después de cuatro segundos de medición basal. C. Células tratadas con tenidap 50 μ M después de cuatro segundos de medición basal.

25 Figura 20. Efecto de inyección intrahipocampal de un compuesto agonista de P2X7R (BzATP) sobre el comportamiento en el ensayo de natación forzada.

Figura 21. Ensayo de campo abierto que mide la actividad locomotora de ratones tratados con un compuesto agonista de P2X7R (BzATP).

30 Figura 22. Análisis comparativo de células apoptóticas en el hipocampo de un ratón tratado con solución de vehículo de control o compuesto agonista de P2X7R (BzATP).

Figura 23. Efecto de inyección intrahipocampal del antagonista de P2X7R KN-62 y oATP sobre el comportamiento durante el ensayo de natación forzada.

35 Figura 24. Ensayo de campo abierto que mide la actividad locomotora de ratones tratados con el antagonista de P2X7R KN-62 y oATP.

40 Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas a partir de los siguientes ejemplos, ofrecidos sólo con fines ilustrativos y que no pretenden limitar el alcance de la presente invención de forma alguna.

Ejemplo 1

45 *Análisis de asociación de Trastorno Afectivo Bipolar en una población humana homogénea*

En el análisis de asociación se usaron 41 familias de diferentes tamaños que contenían un total de 485 individuos muestreados de la región de Saguenay/Lac St-Jean. Los individuos se distribuyeron de acuerdo con su diagnóstico como se indica a continuación: 105 individuos afectados con Trastorno Bipolar de tipo I (BPI) o trastorno bipolar de tipo esquizoafectivo; 42 individuos con Trastorno Bipolar de tipo II (BPII) diagnosticado; 54 individuos con depresión mayor recurrente; y 57 individuos con depresión mayor de un solo episodio. Los 227 individuos restantes no estaban afectados y eran normales. Para el cálculo, se usó la siguiente clasificación: los individuos a los que se les había diagnosticado BPI, trastorno esquizoafectivo, tipo bipolar, BPII y depresión mayor recurrente se consideraron afectados (n = 201); los individuos con un solo episodio de depresión mayor se clasificaron como fenotipo desconocido (n = 57); y todos los demás diagnósticos como no afectados (n = 227).

Se recogieron muestras de sangre de cada individuo en tubos Vacutainer K3 EDTA de 10 ml (Becton-Dickinson) y se aisló ADN genómico por el kit de aislamiento de ADN Puregene (Gentra Systems). Se vertió sangre en un tubo cónico de 50 ml y se diluyó con cuatro volúmenes de Solución de Lisis de Glóbulos Rojos. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 2.000 g y el sobrenadante se retiró dejando el sedimento celular y 200-400 μ l del líquido residual. Las células se resuspendieron sometiendo el tubo a agitación vorticial y se añadieron 9 ml de Solución de Lisis de Células moviendo la pipeta verticalmente. Se añadieron 40 μ l de Solución de RNasa A (20 mg/ml) y la muestra se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. La muestra se incubó a 37°C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de Solución de Precipitación de Proteínas al lisado celular. El tubo se sometió a agitación vorticial vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugó a 2.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se vertió en un nuevo tubo que contenía 9 ml de isopropanol al 100%. La muestra se mezcló por inversión suave varias veces. El tubo se centrifugó a

ES 2 293 114 T3

2.000 g durante 5 minutos. El sedimento blanco de ADN se lavó con 10 ml de etanol al 70% y el tubo se centrifugó a 2.000 g durante 3 minutos. Se retiró el etanol por vertido y se dejó que el sedimento se secara parcialmente al aire. El ADN se solubilizó en 500 μ l de Solución de Hidratación de ADN. La concentración final se ajustó a 300-400 μ g/ml.

Para la genotipificación de marcadores microsatélites se usó un método basado en fluorescencia. En resumen, la región que incluía cada secuencia repetida se amplificó por PCR usando un cebador no marcado y un cebador marcado con fluorescente (Applied biosystems inc, CA, USA). Los colorantes asociados con el marcador y la longitud del producto de PCR correspondiente se indican en la tabla 2. La reacción de PCR se realizó usando 10 ng de muestra de ADN, 0,2 unidades de ADN polimerasa Taq platinum (Invitrogene, CA, USA), Tris-Cl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración 100 μ M de dNTP y una concentración 1,5 μ M de cada cebador en un volumen final de 7 μ l. Las muestras se incubaron a 95°C durante 3 minutos para activar la Taq platinum ADN polimerasa, y después se realizaron 10 ciclos de amplificación por PCR como se indica a continuación: 95°C durante 15 segundos; 58°C durante 15 segundos; 72°C durante 30 segundos; después de esto se realizaron 15 ciclos como se indica a continuación: 89°C durante 15 segundos; 58°C durante 15 segundos; y 72°C durante 10 segundos. Finalmente, las muestras se incubaron a 72°C durante 30 minutos. Después de la amplificación por PCR, las muestras se reunieron de acuerdo con su cebador marcado con colorante y su longitud de producto de PCR (conjunto de cuatro muestras). La muestra reunida se separó en un analizador de ADN ABI 3100 (Applied Biosystems inc, CA, USA). Los datos resultantes se analizaron usando Genemapper2 (Applied Biosystems inc, CA, USA), y se recopilaban en una base de datos 4D (ACIUS) diseñada en un entorno Macintosh como se ha descrito previamente (Morissette *et al.*, Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.) 88 (1999), 567-587).

En la tabla 2 se muestran marcadores usados en el siguiente análisis de asociación. La fracción de recombinación (q) entre sucesivos marcadores se calculó de acuerdo con las familias analizadas.

TABLA 2

Marcadores genómicos usados para el análisis de asociación

Locus	Colorante asociado	Longitud de alelo (pb)	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	Heterocigosidad (%)
D12S1619	VIC	170-210	0,0135	0,00	74,5
NBG11	VIC	204-218	0,006	1,37	65,5
D12S1666	FAM	241-281	0,001	1,97	66,9
NBG5	VIC	253-261	0,001	2,07	38,3
D12S1721	VIC	263-299	0,005	2,17	72,1
NBG8	VIC	166-188	0,011	2,67	73,3
NBG6	NED	182-218	0,0115	3,79	73,9
NBG9	VIC	156-180	0,0035	4,95	68,9
NBG10	FAM	174-186	0,001	5,30	49,7
NBG12	NED	165-207	0,009	5,40	64,2
NBG4	NED	171-199	0,001	6,31	66,4
NBG3	VIC	182-206	0,006	6,41	64,8
NBG2	VIC	171-199		7,01	54,2

- Se usó la función del mapa de Haldane para la distancia acumulativa en cMorgans.

Para el análisis paramétrico bipuntual, se usó el análisis de puntuación MOD donde se maximizó la puntuación LOD paramétrica sobre modelos genéticos.

Los siguientes resultados se obtuvieron bajo un análisis de puntuación MOD para modelos recesivos.

TABLA 3

Análisis de puntuación MOD para modelos recesivos

Locus	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	Puntuación LOD ($q_{\max}$)
D12S1619	0,0135	0,00	3,46 (0,10)
NBG11	0,006	1,37	4,06 (0,04)
D12S1666	0,001	1,97	1,22 (0,14)
NBG5	0,001	2,07	0,66 (0,16)
D12S1721	0,005	2,17	2,82 (0,10)
NBG8	0,011	2,67	1,51 (0,00)
NBG6	0,0115	3,79	4,77 (0,06)
NBG9	0,0035	4,95	0,75 (0,22)
NBG10	0,001	5,30	0,74 (0,00)
NBG12	0,009	5,40	1,41 (0,16)
NBG4	0,001	6,31	3,56 (0,08)
NBG3	0,006	6,41	3,96 (0,08)
NBG2		7,01	2,59 (0,10)

Se realizaron estudios de puntuación LOD sin modelo usando ANALYZE, sib_phase del paquete ASPEX V1.85 (David Hinds y Neil Risch 1999; <ftp://lahmed.stanford.edu/pub/aspex>, véase también <http://watson.hgen.pitt.edu/docs/usage.html>) y SIMWALK2 (Sobel y Lange, Am J Hum Genet 58 (1996), 1323-1337) para analizar los alelos compartidos entre pares de hermanos afectados. El programa ANALYZE pondera las familias de acuerdo con su tamaño. El programa ASPEX sib_phase usa frecuencias de alelos para reconstruir la información que falta y se adapta para series de datos en las que faltan los padres, pero pueden usarse niños tipificados adicionales para reconstruir e indicar la fase de los padres. SimWalk2 es una aplicación informática de genética estadística para el haplotipo, asociación paramétrica, asociación no paramétrica (NPL), identidad por descendencia (IBD) y análisis de tipificación errónea en cualquier tamaño de genealogía. SimWalk2 usa la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) y simuló algoritmos de hibridación para realizar estos análisis multipuntuales.

ASPEX sib-phase se usó con dos estrategias computacionales: En primer lugar, usando pares de hermanos estrictamente independientes; y en segundo lugar usando todas las combinaciones de pares de hermanos afectados. Se realizó ASPEX para cálculos bipuntuales y multipuntuales.

Los resultados bi-puntuales observados con ANALYZE y ASPEX se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Resultados bipuntuales observados con ANALYZE y ASPEX

Locus	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	Par de hermanos de ANALYZE puntuación LOD	sib_phase Puntuación LOD pares de hermanos independientes	sib_phase Puntuación LOD todos los pares de hermanos
D12S1619	0,0135	0,00	2,31	2,55	3,14
NBG11	0,006	1,37	2,83	2,72	3,27
D12S1666	0,001	1,97	1,01	2,52	3,14
NBG5	0,001	2,07	0,50	2,52	3,13
D12S1721	0,005	2,17	1,57	2,51	3,12
NBG8	0,011	2,67	0,51	2,24	2,75

ES 2 293 114 T3

NBG6	0,0115	3,79	2,55	2,11	2,64
NBG9	0,0035	4,95	0,49	1,65	1,97
NBG10	0,001	5,30	0,77	1,45	2,10
NBG12	0,009	5,40	0,47	1,44	2,17
NBG4	0,001	6,31	1,21	1,29	3,07
NBG3	0,006	6,41	1,84	1,29	3,07
NBG2		7,01	1,24	1,22	3,00

SIMWALK2 calculó cuatro parámetros estadísticos diferentes basándose en árboles de descendencia. Estos parámetros estadísticos miden el grado de agrupamiento entre los alelos marcadores que descienden de los fundadores.

El parámetro estadístico A es el número de diferentes alelos fundadores que aportan alelos al individuo afectado y es el más potente para detectar la asociación a un rasgo recesivo. El parámetro estadístico B es el número máximo de alelos entre los descendientes afectados de cualquiera de los alelos fundadores y es el más potente para detectar la asociación con un rasgo dominante. El parámetro estadístico C es la "entropía" de los alelos marcadores entre los individuos afectados. El parámetro estadístico D es el grado de alelos compartidos entre todos los pares afectados medido por su coeficiente de parentesco IBD. Los parámetros estadísticos C y D son parámetros estadísticos más generales que indican si algunos alelos fundadores están demasiado representados entre los afectados.

La tabla 5 muestra los resultados observados por SIMWALK2. Los autores indican que los valores p deben ser generalmente conservativos. Se expresan como $-\text{Log}(\text{valores de } p)$. Para la correspondencia, $-\text{Log}(0,05) = 1,30$, $-\text{Log}(0,01) = 2$, $-\text{Log}(0,001) = 3$ etc.

TABLA 5
Análisis SIMWALK2

Locus	Distancia (q)	Distancia acumul. (cM)	STAT(A) -Log(valor de p)	STAT(B) -Log(valor de p)	STAT(C) -Log(valor de p)	STAT(D) -Log(valor de p)
D12S1619	0,0135	0,00	1,4550	0,4103	1,1306	1,1310
NBG11	0,006	1,37	2,0157	1,4375	1,5955	1,9845
D12S1666	0,001	1,97	2,0236	0,9765	1,4727	1,4614
NBG5	0,001	2,07	1,7596	0,8558	1,3866	1,3602
D12S1721	0,005	2,17	1,6628	1,1692	1,4235	1,6384
NBG8	0,011	2,67	1,5374	0,6940	1,0623	1,1552
NBG6	0,0115	3,79	1,5896	0,4452	1,0935	1,1786
NBG9	0,0035	4,95	1,2677	0,3815	0,8412	0,9133
NBG10	0,001	5,30	1,1117	0,3642	0,6987	0,7554
NBG12	0,009	5,40	1,0809	0,3485	0,6694	0,7179
NBG4	0,001	6,31	1,1024	0,4148	0,6368	0,8544
NBG3	0,006	6,41	1,1040	0,4146	0,6373	0,8559
NBG2		7,01	1,0963	0,5380	0,6587	0,9356

Resultado multipuntual observado con ASPEX cuando solo se usaron pares de hermanos independientes (Figura 1b). El valor máximo de la puntuación LOD se observó a NBG11.

Resultado multipuntual observado con ASPEX cuando se consideraron todos los pares de hermanos (Figura 1c). El valor máximo de puntuación LOD se observó a NBG11, pero apareció un segundo pico a NBG4 y NBG3.

Los valores de puntuación LOD bipuntuales y multipuntuales calculados por ASPEX fueron similares. El segundo pico, observado cuando se usan todos los pares de hermanos, pueden explicarse por la presencia de un individuo afectado recombinante, con muchos hermanos afectados, que comparten la región cromosómica telomérica a NBG12. Este tipo de individuos tiene un gran impacto sobre los valores de puntuación LOD cuando se usan todos los pares de hermanos en lugar de un par de hermanos. Esta situación se observó en dos familias.

Posteriormente se realizaron análisis de estratos. Aunque HOMOG no detectó pruebas de heterogeneidad, se construyó un ensayo de homogeneidad basándose en los alelos compartidos encontrados en regiones cromosómicas seleccionadas. Para este análisis sólo se usaron 20 de las 41 familias, ya que las otras no se genotipificaron en todas estas regiones. Para cada marcador dentro de las regiones seleccionadas, la proporción de alelos compartidos IBD por pares de hermanos afectados se estimó con ASPEX (sib_phase). Para cada región retenida, la proporción de alelos compartidos se usó como variable para un Análisis de Componentes Principales y el primer componente principal como un índice de asociación. Se realizó un análisis de correlación sobre estos índices para detectar heterogeneidad (correlación < 0) o epistasis (correlación > 0). Se usó un algoritmo de Fisher para clasificar dos grupos de familias como asociadas o no asociadas a un locus particular. Se observó una correlación negativa entre la región del cromosoma 12 y el área del cromosoma 15 ($r = -0,51$; $p = 0,023$). Un análisis de agrupamientos sugirió que 11 familias de 20 estaban asociadas al cromosoma 12. Esta submuestra se denominó estrato.

Este estrato incluía 11 familias (266 individuos muestreados) que incluyen 52 casos de BPI o trastorno esquizoafectivo tipo bipolar, 20 casos de BPII y 28 casos de depresión mayor recurrente.

En modelos recesivos se obtuvieron los siguientes valores de puntuación MOD ilustrados en la Tabla 6.

TABLA 6
Puntuaciones MOD en modelos recesivos

Locus	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	Puntuación LOD ($q_{\max}$)
D12S1619	0,0135	0,00	4,03 (0,08)
NBG11	0,006	1,37	4,98 (0,00)
D12S1666	0,001	1,97	1,49(0,12)
NBG5	0,001	2,07	0,79 (0,14)
D12S1721	0,005	2,17	4,23 (0,06)
NBG8	0,011	2,67	2,79 (0,00)
NBG6	0,0115	3,79	5,06 (0,06)
NBG9	0,0035	4,95	1,57(0,14)
NBG10	0,001	5,30	1,73(0,00)
NBG12	0,009	5,40	1,65(0,12)
NBG4	0,001	6,31	4,60 (0,08)
NBG3	0,006	6,41	4,84 (0,06)
NBG2		7,01	2,80 (0,06)

En la Tabla 7 se muestran los resultados de puntuaciones LOD sin modelo obtenidas con ANALYZE y ASPEX aplicados a los estratos.

TABLA 7

Puntuación LOD sin modelo obtenida con ANALYZE y ASPEX

Locus	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	Puntuación LOD ANALYZE	sib_phase puntuación LOD pares de hermanos independientes	sib_phase puntuación LOD todos los pares de hermanos
D12S1619	0,0135	0,00	4,54	5,29	7,65
NBG11	0,006	1,37	4,29	5,34	7,70
D12S1666	0,001	1,97	2,77	5,36	7,74
NBG5	0,001	2,07	0,67	5,36	7,74
D12S1721	0,005	2,17	4,48	5,35	7,74
NBG8	0,011	2,67	2,97	4,87	7,00
NBG6	0,0115	3,79	4,05	4,59	6,76
NBG9	0,0035	4,95	2,03	3,72	5,41
NBG10	0,001	5,30	2,00	3,42	5,89
NBG12	0,009	5,40	0,89	3,44	6,11
NBG4	0,001	6,31	2,84	3,71	9,00
NBG3	0,006	6,41	3,89	3,71	9,01
NBG2		7,01	1,91	3,52	8,73

En la Tabla 8 se ilustran resultados sin modelo observados con SIMWALK2.

TABLA 8

Puntuación LOD sin modelo obtenida con SIMWALK2

Locus	Distancia (q)	Distancia acumulativa (cM)	STAT(A) -Log(valor de p)	STAT(B) -Log(valor de p)	STAT(C) -Log(valor de p)	STAT(D) -Log(valor de p)
D12S1619	0,0135	0,00	2,5963	0,9565	3,2156	2,3584
NBG11	0,006	1,37	3,0698	1,7400	3,7747	3,0103
D12S1666	0,001	1,97	2,9340	1,6546	3,5812	2,7223
NBG5	0,001	2,07	2,9781	1,2722	3,6505	2,7846
D12S1721	0,005	2,17	2,9680	1,2630	3,6844	2,7752
NBG8	0,011	2,67	3,0954	1,0804	3,4399	2,5654
NBG6	0,0115	3,79	3,1632	1,0672	3,2670	2,5956
NBG9	0,0035	4,95	2,2106	1,0137	2,7765	2,4456
NBG10	0,001	5,30	2,5513	1,0251	2,7625	2,1914
NBG12	0,009	5,40	2,4893	0,9868	2,6841	2,0920
NBG4	0,001	6,31	2,9028	1,1312	3,4063	2,8156
NBG3	0,006	6,41	2,9070	1,1326	3,4637	2,8300
NBG2		7,01	2,8430	1,1108	3,3135	2,7978

En las Figuras 1d y 1e se muestran los resultados multipuntuales en los estratos con ASPEX sib_phase considerando sólo pares de hermanos independientes (Figura 1b) o todos los pares de hermanos (Figura 1c). Como se ha indicado previamente, apareció un segundo pico cuando se observaron todos los pares de hermanos.

Se calculó un intervalo de confianza. Se usó GENEFINDER (Liang *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 66 (2000), 1631-1641) para estimar la localización del gen de susceptibilidad (por ejemplo t). El método se basa en la IBD (Identidad por Descendencia) compartida de pares de hermanos afectados para múltiples marcadores. Para el objetivo de nuestro análisis, las genealogías se dividieron en familias. Se usaron 56 familias nucleares y 183 pares de hermanos. Liang KY, Huang CY, Beaty TH (2000) A unified sampling approach for multipoint analysis of qualitative and quantitative traits in sib pairs. Am J Hum Genet 66: 1631-1641.

Los resultados de GENEFINDER indican la localización de un gen de susceptibilidad para trastornos afectivos a $3,19 \pm 0,446$ cM telomérico con respecto al marcador D12S1721 (D12S1721 está localizado aprox. a 136,82 cM en el mapa del cromosoma 12 de Marshfield promediado por sexo).

I.C. 95%: [2,32, 4,06];

I.C. 99%: [2,03, 4,35]

I.C. 99,9%: [1,71, 4,67]

A partir de los estratos, se obtuvieron 24 núcleos y 107 pares de hermanos, y la localización del gen de susceptibilidad se estimó a $3,07 \pm 0,57$ (véase el mapa anterior). Se obtuvieron los siguientes intervalos de confianza (I.C.):

I.C. 95%: [1,95, 4,19];

I.C. 99%: [1,59, 4,55]

I.C. 99,9%: [1,18, 4,96]

Se realizó un estudio de asociación usando los marcadores microsatélites NBG con CLUMP (Sham & Curtis. Ann. Hum. Genet. 59 (1995), 97-105). Las muestras se distribuyeron como se indica a continuación: 83 hombres/caso; 124 mujeres/caso; 95 hombres/control; y 101 mujeres/control. Se usaron mil simulaciones para estimar los valores de p. Los resultados observados se resumen en la Tabla 9.

TABLA 9

Estudio de asociación usando el microsatélite NBG

Locus	Muestra		Parámetro estadístico T1	Parámetro estadístico T2	Parámetro estadístico T3	Parámetro estadístico T4
	Caso	Control	(valor de p)	(valor de p)	(valor de p)	(valor de p)
NBG11	204	129	0,226	0,562	0,410	0,421
NBG5	206	194	0,972	0,980	0,948	0,971
NBG8	206	194	0,983	1,000	0,994	0,978
NBG6	206	194	0,147	0,074	0,759	0,485
NBG9	206	190	0,512	0,940	0,786	0,583
NBG10	206	190	0,594	0,480	0,403	0,709
NBG12	206	190	0,002	0,019	0,003	0,117

El parámetro estadístico T1 es el parámetro estadístico chi-cuadrado habitual en la tabla de contingencia de partida.

El parámetro estadístico T2 es el parámetro estadístico chi-cuadrado habitual aplicado en la tabla de contingencia obtenida después de colapsar las columnas con los valores esperados pequeños conjuntamente.

El parámetro estadístico T3 es el parámetro estadístico chi-cuadrado de mayor tamaño conseguido comparando una columna de la tabla original con el total de las otras columnas.

El parámetro estadístico T4 es el parámetro estadístico chi-cuadrado de mayor tamaño conseguido comparando cualquier combinación de alelos con el resto.

Sólo el marcador NBG12 dio una asociación significativa al nivel de 1%. Para los otros marcadores, no hubo ningún alelo individual que pareciera asociado con el trastorno bipolar. Parece ser que ningún alelo fundador se representaba demasiado entre los afectados. No hay ningún resultado significativo para la asociación de genotipos con los marcadores NBG.

Se realizaron estudios de asociación adicionales basados en marcadores microsatélites usando CLUMP sobre muestras que contenían individuos adicionales de control y de casos. Se usaron mil simulaciones para estimar los valores de p.

TABLA 9a

Valores de p empíricos observados con CLUMP para los parámetros estadísticos T1 y T3 para análisis alélicos y genotípicos de marcadores microsatélites

Nombre	Eficaz		Alelos		Genotipos	
			T1	T3	T1	T3
	caso	controles	(valor de p)	(valor de p)	(valor de p)	(valor de p)
NBG11	204	98	0,250	0,421	0,680	0,553
D12S1666	208	175	0,366	0,543	0,393	0,476
NBG5	213	179	0,969	0,934	0,997	1,000
D12S1721	210	176	0,693	0,463	0,805	0,838
NBG8	213	179	0,754	0,921	0,973	0,929
NBG6	213	179	0,008	0,356	0,172	0,449
NBG9	213	175	0,759	0,768	0,690	0,606
NBG10	213	175	0,521	0,178	0,122	0,173
D12S1349	212	180	0,887	0,864	0,782	0,816
NBG12	213	175	0,002	$<10^{-3}$	0,018	0,552
NBG4	207	178	0,418	0,506	0,813	0,545
NBG3	209	175	0,171	0,829	0,601	0,897
D12S378	211	180	0,171	0,405	0,540	0,560
NBG2	210	170	0,896	0,749	0,210	0,613
D12S1614	210	179	0,803	0,692	0,710	0,831
D12S342	211	180	0,394	0,740	0,445	0,622
D12S340	209	179	0,890	0,869	0,895	0,838
D12S1639	209	180	0,087	0,170	0,652	0,295
D12S1634	211	181	0,361	0,248	0,505	0,590
D12S2075	203	181	0,023	0,157	0,085	0,451

La hipótesis HWE se cumplió al nivel de 5% para cada marcador microsatélite después de la aplicación de las correcciones de Bonferroni conservativas para el ensayo múltiple (Bland & Altman, Brit. J. Med. 310 (1995) 170). La Tabla 9a indica los valores de p empíricos observados con CLUMP para los análisis de asociación de alelos y genotipos. Se observaron valores de p empíricos menores de 0,005 en el marcador NBG12 para los parámetros estadísticos T1 y T3 según el análisis de asociación alélica. El parámetro estadístico T1 sugería asociación alélica entre trastornos afectivos bipolares y NBG6 (valor de p empírico = 0,008). Además, se observó un valor de p empírico muy poco significativo de 0,023 en el marcador más distal D12S2075.

En conclusión, los resultados multipuntual paramétricos y sin modelo sugieren investigar los genes localizados entre D12S1619 y D12S1666. Además, de acuerdo con los resultados de GENEFINDER, deben considerarse los genes situados centroméricos a NBG9 para los análisis de asociación y de desequilibrio de ligamiento. Además, se observó una asociación positiva con el marcador NBG6, que está localizado en el intrón 9 del gen P2X7R.

Ejemplo 2

Mapeo físico y análisis mutacional del cromosoma 12 que asocia la proteína P2X7R a trastornos afectivos bipolares

La predicción más conservativa de la región asociada con la enfermedad se incluye entre los marcadores NBG11 y NBG2 (véase la Figura 1a). Esta región se delimitó de acuerdo con el análisis de ligamiento y asociación descrito

en el Ejemplo 1, usando marcadores Genethon y marcadores NBG. La longitud aproximada de esta región es 5,2 Mb. En esta región se incluyeron dos huecos importantes (entre FLJ10701 y FLJ32372, y entre FLJ1466 y MONDOA). En este área se indicaron al menos 73 genes, siendo 48 genes conocidos y 25 desconocidos pero asociados con el ARNm y/o los agrupamientos EST basados en el último ensamblaje del genoma disponible en UCSC (noviembre de 2002). No se han indicado los genes previstos. Sin embargo, la estimación de CI 99% (intervalo de confianza) usando GENEFINDER ha limitado la región más interesante entre los marcadores D12S1666 y NBG9. Esta región genómica cubre 1,6 Mb e incluye al menos 28 genes, y no tiene ningún hueco importante. De esta manera, se usó el término región de fBAD (Trastornos Afectivos Bipolares familiares) para describir el segmento genómico entre D12S1666 y NBG9. Los genes encontrados dentro de esta región incluyen CaMKK2, CABP, P2X7, P2X4, PIN, PLA2, G1B, CIT, PXN, Rab35 y APC5. Sin embargo, dada la presente técnica, no habría sido evidente para un especialista en la técnica seleccionar P2X7R como gen asociado con enfermedades afectivas. Serían obvios otros genes distintos de los indicados anteriormente.

Por ejemplo, el gen CaMKK2 (también conocido como proteína quinasa quinasa beta dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina o CaMKKb) es una proteína quinasa de serina/treonina implicada en rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} . CaMKK2 puede activar *in vitro* las quinasas corriente abajo CaMKIV y CaMKI, que modulan la transcripción de genes a través de la fosforilación de factores de transcripción (por ejemplo, CREB, SRF, MEF2; *Corcoran y Means*, J. Biol. Chem. 276 (2001), 2975-2978; *Soderling*, Trends Biochem. Sci. 24 (1999), 232-236). Su papel en la cascada de Ca^{2+} no es crítico. Algunos estudios sugieren que las CaMK podrían activarse sin la fosforilación de las CaMKK (*Matsushita y Naim*, J. Biol. Chem. 274 (1998), 10086-10093). Sin embargo, la etapa de fosforilación de CaMKK contribuiría a la amplificación de la señal de Ca^{2+} , ya que CaMKK es más sensible a la activación por Ca^{2+} /Calmodulina, y por lo tanto CaMKK sería un mediador importante cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular son bajos (*Anderson et al.*, J. Biol. Chem. 273 (1998), 31880-31889).

CaMKK2 es una diana evidente para la depresión ya que la técnica anterior sugiere que las rutas de señalización dependientes de AMPc (mediadas por activación de PKA) están afectadas en el cerebro de pacientes con Trastornos Afectivos Bipolares (*Field et al.*, J. Neurochem. 73 (1997), 1704-1710; *Rahman et al.*, J. Neurochem. 68 (1997), 297-304; *Takahashi et al.*, J. Neurosci. 19 (1999), 610-618). De acuerdo con un estudio que usa líneas celulares linfoblásticas, el trastorno bipolar podría estar relacionado con niveles de calcio intracelular elevados (*Yoon et al.*, Mol. Psychiatry 6 (2001), 678-683). Además, algunos grupos encontraron relaciones entre fármacos antidepresivos y activación de CaMK (*Budziszewska et al.*, Br. J. Pharmacol. 130 (2000), 1385-1393; *Consogno et al.*, Neuropsychopharmacology 24 (2001), 21-30; *Mori et al.*, Neuropharmacology 40 (2001), 448-456; *Zanotti et al.*, Neuropharmacology 37 (1998), 1081-1089). Además, la inhibición de CaMKK por fosforilación mediada por PKA sugiere una fuerte relación entre las dos rutas (*Matsushita et al.*, J. Biol. Chem. 273 (1999), 21473-21481). Estas observaciones sugerirían a una persona especialista en la técnica que CaMKK2 es el gen responsable de la enfermedad afectiva bipolar.

Otro candidato evidente para los trastornos afectivos habría sido el gen CABP1 que genera cuatro proteínas de unión a Ca^{2+} neuronales por el uso alternativo de los 9 exones codificantes, que son L-CABP, S-CABP, calbrain y caldendrina (*Haeseleer et al.*, J. Biol. Chem. 275 (2000), 1247-1260). Su expresión está restringida casi totalmente a tejidos cerebrales. Un estudio cerebral sobre calbrain revela su efecto negativo sobre la actividad de CaMKII dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina por interacciones competitivas con el dominio de unión a CaM de CaMKII (*Yamagushi et al.*, J. Biol. Chem. 274 (1999), 3610-3616). Se podrían esperar papeles similares en la señalización de Ca^{2+} para otros productos alternativos de CABP1. La participación del gen CABP1 en rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} haría evidente para un especialista en la técnica seleccionar este gen como candidato para el trastorno afectivo bipolar. Sin embargo, todos los exones de CABP1 se analizaron con respecto a la presencia de mutaciones y, sorprendentemente, sólo se detectaron dos mutaciones en regiones no codificantes.

El gen PIN (inhibidor proteico de NOS (óxido nítrico sintasa)) es otro candidato evidente responsable del trastorno afectivo bipolar. El óxido nítrico (NO) del cerebro puede estar implicado en la apoptosis, sinaptogénesis y desarrollo neuronal. Como el NO no puede almacenarse en vesículas como otros neurotransmisores, su liberación se regula por la actividad de la NOS (óxido nítrico sintasa). PIN es un inhibidor directo de la NOS por la unión y desestabilización del complejo homodímero activo de NOS (*Jaffrey et al.*, Science 274 (1996), 774-777). PIN está muy conservado a lo largo de la evolución y se expresa en muchos tipos celulares. Un estudio clínico reciente que evalúa los niveles plasmáticos de nitrato en estados depresivos sugiere que la producción NO está aumentada en la depresión (*Suzuki et al.*, J. Affect. Disord. 63 (2001), 221-224) y puede deberse a una deficiencia en la inhibición de la NOS. Además, en un modelo de ratón, se han asociado antagonistas de la NO sintasa a propiedades antidepresivas (*Harkin et al.*, 1999; *Karolewicz et al.*, Eur. J. Pharmacol. 372 (1999), 215-220). De esta manera, PIN sería un candidato evidente. Sin embargo, debido a la acción pleiotrópica del NO, una deficiencia en la función de PIN generaría muchos trastornos no relacionados a lo largo de todo el cuerpo. De esta manera, sin la información presentada en la descripción de este documento, un especialista habitual en la técnica habría previsto PIN y no P2X7R como gen asociado con trastornos afectivos.

La fosfolipasa humana A2 grupo IB (PLA2G1B) cataliza la liberación de ácidos grasos a partir de glicero-3-fosfolinas. Los genes de fosfolipasa A2 (PLA2) se expresan en muchos tejidos. Algunos estudios han demostrado asociaciones entre una actividad excesiva de PLA2 en el cerebro y trastornos afectivos (*Chang et al.*, Neurochem. Res. 23 (1998), 887-892; *Hibbeln et al.*, Biol. Psychiatry 25 (1989), 945-961). Además, otros estudios genéticos han encontrado asociaciones entre el gen PLA2G1B y el trastorno afectivo bipolar (*Dawson et al.*, Psychiatr. Genet. 5 (1995), 177-180). De esta manera, PLA2G1B representa un probable candidato para trastornos afectivos. Sin embargo, en el presente ejemplo sólo se encontró una mutación silenciosa dentro del exón 3 del gen PLA2G1B.

El gen de la quinasa citron humana, una proteína asociada a Rho (CIT), codifica una proteína de 183 kDa que se asocia con la GTPasa Rho. CIT comparte una fuerte similitud con proteínas ROCK y ROK que son otras quinasas asociadas a Rho (*Madaule et al.*, Nature 394 (1998), 491-494). Las GTPasas Rho están implicadas en muchos procesos tales como la organización del citoesqueleto, la circulación en la membrana, el crecimiento celular y la activación de la transcripción (*Van Aelst y D'Souza-Schorey*, Genes Dev. 11 (1997), 2295-2322). Los estudios sobre variantes cerebrales de Citrón-K (sin el dominio quinasa) revelan la asociación con proteínas de densidad postsinápticas (PSD-95), lo que sugiere un papel en la organización o función de la sinapsis (*Zhang et al.*, J. Neurosci. 19 (1999), 96-108; *Furuyashiki et al.*, J. Neurosci. 19 (1999), 109-118).

El gen de la paxilina humana (PXN) codifica una proteína de 68 kDa que se encuentra en adhesiones focales. Está dentro de adhesiones focales en las que moléculas de adhesión interaccionan dinámicamente con el citoesqueleto (*Salgia et al.*, J. Biol. Chem. 270 (1995), 5039-5047). Las rutas de señalización que regulan estas interacciones dinámicas empiezan a esclarecerse. Muchas observaciones sugieren que la paxilina está implicada en la transducción de señales desde receptores de factores de crecimiento a adhesiones focales. La paxilina se expresa en muchos tejidos incluyendo el cerebro.

Sin embargo, como se indica más adelante, el gen causante de enfermedades afectivas se identifica como el receptor de P2X7 (P2X7R).

Se buscaron mutaciones en secuencias codificantes y límites exón-intrón de los genes mencionados anteriormente, ya que estas mutaciones con mucha probabilidad proporcionarán Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP) funcionalmente significativos. La muestra inicial estaba compuesta de 16 individuos afectados no relacionados de la región Saguenay/Lac St-Jean, que proporciona una potencia de 80% para detectar polimorfismos con una frecuencia de 0,05. Para identificar los polimorfismos, primero se amplificaron por PCR las secuencia diana. Después, los productos de PCR se purificaron en membranas Whatman GF/C (VWR, Montreal, Canadá) y se cuantificaron usando un ensayo de cuantificación de ADN bicatenario PicoGreen (Molecular probes, Oregon, USA). Se secuenciaron 4 ng de productos de PCR purificados usando el kit de secuenciación DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Canadá). Los productos de secuenciación se resolvieron en un analizador de ADN ABI PRISM 3730XL y un analizador de ADN ABI PRISM 3700. Los productos de PCR se secuenciaron en las dos direcciones. Los SNP identificados en los genes estudiados se indican en la Tabla 10.

TABLA 10

Análisis mutacional entre marcadores D12S1666 y NBG9

Genes	Posiciones	Variaciones	Alelos	Modificaciones
Rab35	Exón06	RABE06A	486G-A	Silenciosa Asn 162
Rab35	Intrón04	RABI04A	51C-T	desconocida
Rab35	Intrón03	RABI03A	33G-A	desconocida
Rab35	Intrón02	RABI02B	85G-A	desconocida
Rab35	Intrón02	RABI02A	76C-G	desconocida
PXN	Exón11	PXNE11A	1527C-T	Silenciosa Thr509
PXN	Exón06	PXNE06A	750C-T	Silenciosa Ser250
PXN	Exón02	PXNE02A	217G-A	Gly73Ser
PLA2G1B	Exón03	PLA2G1BE03A	294C-T	Silenciosa Ser98
PIN	5'UTR01	PINUTR01A	-49T-G	desconocida
PIN	5'UTR01	PINUTR01B	-80T-C	desconocida
PIN	Intrón02	PINI02A	26C-T	desconocida
PIN	Intrón02	PINI02B	50C-T	desconocida
CaBP	Intrón04	CaBP104A	35C-T	desconocida
CaBP	exón01	CaBPE01A	-23A-G	desconocida
OASL	Exón02	OASLE02A	213G-T	Silenciosa Gly72
OASL	Exón02	OASLE02B	408C-T	Silenciosa Leu 136
OASL	Exón05	OASLE05A	1042G-A	Val348Met
OASL	Exón06	OASLE06A	1509G-A	Silenciosa Ser503

ES 2 293 114 T3

	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5L	362T-C	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5M	532T-G	desconocida
5	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5K	1100A-G	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5J	1122A-G	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5I	1171C-G	desconocida
10	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5F	1351T-C	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5N	1702G-A	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5G	1731T-G	desconocida
15	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5H	1860C-T	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5A	2162C-A	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5B	2238C-T	desconocida
20	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5D	2373A-G	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5E	2569G-A	desconocida
	P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5C	2702G-A	desconocida
25	P2X7R	Intrón01	P2XR7I01C	3166G-C	desconocida
	P2X7R	Intrón01	P2XR7I01A	24778C-T	desconocida
	P2X7R	Intrón01	P2XR7I01B	24830C-T	desconocida
30	P2X7R	Exón02	P2XR7v02A	24942T-C	Val76Ala
	P2X7R	Exón03	P2XR7E03A	26188C-T	Arg117Trp
	P2X7R	Intrón03	P2XR7I03A	26308A-G	desconocida
35	P2X7R	Intrón03	P2XR7I03B	26422G-A	desconocida
	P2X7R	Intrón04	P2XR7I04A	32394G-A	desconocida
	P2X7R	Intrón04	P2XR7v05B	32434T-C	desconocida
40	P2X7R	Exón05	P2XR7E05D	32493G-A	Gly150Arg
	P2X7R	Exón05	P2XR7v05A	32507C-T	Tyr155His
	P2X7R	Exón05	P2XR7E05C	32783C-T	Silenciosa Cys 168
45	P2X7R	Intrón05	P2XR7I05C	32783A-C	desconocida
	P2X7R	Intrón05	P2XR7I05D	35309T-C	desconocida
	P2X7R	Intrón05	P2XR7I05B	35374C-T	desconocida
50	P2X7R	Intrón05	P2XR7I05A	35378A-C	desconocida
	P2X7R	Exón06	P2XR7E06A	35438G-A	Glu186Lys
	P2X7R	Exón06	P2XR7E06B	35454T-C	Leu191Pro
55	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06C	35549T-C	desconocida
	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06G	35641G-C	desconocida
	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06D	35725A-C	desconocida
60	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06F	36001T-G	desconocida
	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06E	36064A-T	desconocida
65	P2X7R	Intron06	P2XR7I06A	36091 DelGTTT	desconocida

ES 2 293 114 T3

	P2X7R	Intrón06	P2XR7I06B	36108C-G	desconocida
	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07A	36374C-T	desconocida
5	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07B	36378G-A	desconocida
	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07C	36387T-A	desconocida
	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07D	36398G-C	desconocida
10	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07E	37439C-T	desconocida
	P2X7R	Intrón07	P2XR7I07F	37513T-C	desconocida
	P2X7R	Exón08	P2XR7E08C	37604C-T	Arg270Cys
15	P2X7R	Exón08	P2XR7v08A	37605G-A	Arg270His
	P2X7R	Exón08	P2XR7v08B	37623G-A	Arg276His
	P2X7R	Exón08	P2XR7E08D	37633C-T	Silenciosa Asp279
20	P2X7R	Intrón09	P2XR7v11A	47214C-T	desconocida
	P2X7R	Exón11	P2XR7v11B	47383G-A	Ala348Thr
	P2X7R	Exón11	P2XR7v11C	47411C-G	Thr357Ser
25	P2X7R	Intrón11	P2XR7I11D	47563T-C	desconocida
	P2X7R	Intrón12	P2XR7I12A	54307C-T	desconocida
	P2X7R	Intrón12	P2XR7I12B	54308G-A	desconocida
30	P2X7R	Exón13	P2XR7v13F	54399C-T	Ala433Val
	P2X7R	Exón13	P2XR7v13A	54480A-G	Gln460Arg
	P2X7R	Exón13	P2XR7v13B	54523C-T	Silenciosa Pro474
35	P2X7R	Exón13	P2XR7v13G	54562DelCCCTGAGAG CCACAGGTGCCT	Del de 7aa 488 a 494 PESHRL
	P2X7R	Exón13	P2XR7v13C	54588A-C	Glu496Ala
40	P2X7R	Exón13	P2XR7v13H	54664C-G	Silenciosa His521
	P2X7R	Exón13	P2XR7E13D	54703G-T	Silenciosa Leu534
	P2X7R	Exón13	P2XR7E13J	54804A-T	Ile568Asn
45	P2X7R	Exón13	P2XR7v13I	54834G-A	Arg578Gln
	P2X7R	Exón13	P2XR7v13E	54847G-A	Silenciosa Pro582
	P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3A	55169C-A	desconocida
50	P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3B	55170A-C	desconocida
	P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3C	55171A-C	desconocida
	P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3D	55917C-T	desconocida
55	P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3E	54925G-A	desconocida

60

65

ES 2 293 114 T3

5	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5I	-1956G-A	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5H	-1649G-A	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5G	-800G-A	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5A	-648C-A	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5B	-537A-G	desconocida
10	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5C	-437A-G	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5J	-206VNRG	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5D	-211C-G	desconocida
15	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5F	-150VNRGGGCCCC	desconocida
	P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5E	-98G-T	desconocida
	P2X4R	Intrón01	P2XR4I01A	31G-T	desconocida
20	P2X4R	Exón02	P2XR4E02A	262G-A	Mutación silenciosa Ala87
	P2X4R	Intrón02	P2XR4I02A	4600C-T	desconocida
25	P2X4R	Intrón03	P2XR4I03A	15G-A	desconocida
	P2X4R	Intrón03	P2XR4I03B	72G-A	desconocida
	P2X4R	Exón04	P2XR4E04A	355G-A	Ile119Val
30	P2X4R	Exón04	P2XR4E04A	375G-A	Silenciosa Val125
	P2X4R	Intrón04	P2XR4I04B	17T-C	desconocida
	P2X4R	Intrón04	P2XR4I04A	32G-A	desconocida
35	P2X4R	Exón05	P2XR4E05A	465T-C	Silenciosa Ser155
	P2X4R	Exón07	P2XR4E07A	724A-G	Ser242Gly
	P2X4R	Intrón08	P2XR4I08A	DelT	desconocida
40	P2X4R	Exón09	P2XR4E09A	944A-G	Tyr315Cys
	P2X4R	Intrón10	P2XR4I10A	11G-T	desconocida
	P2X4R	Intrón10	P2XR4I10B	G-C	desconocida
45	P2X4R	Intrón10	P2XR4I10C	A-G	desconocida
	P2X4R	Intrón11	P2XR4I11B	C-G	desconocida
	P2X4R	Intrón11	P2XR4I11C	T-A	desconocida
50	P2X4R	Intrón11	P2XR4I11A	374C-T	desconocida
	CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3bA	733C-T	desconocida
	CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3aB	390G-A	desconocida
55	CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3aA	239G-A	desconocida
	CaMKK2	Intrón15	CaMKK2I15B	325T-C	desconocida
	CaMKK2	Intrón15	CaMKK2I15A	169G-A	desconocida
60	CaMKK2	Intrón14	CaMKK2I14A	224A-G	desconocida
	CaMKK2	Intrón10	CaMKK2I10A	156DelGTGATCCGCCTG	desconocida
	CaMKK2	intrón09	CaMKK2I09B	528A-G	desconocida

65

5	CaMKK2	intrón09	CaMKK2I09A	521A-G	desconocida
	CaMKK2	Exón09	SNP6f18v5	1095C-A	Silenciosa Ile365
	CaMKK2	Exón09	SNP6f18v4	1087C-T	Arg363Cys
	CaMKK2	Exón05	CaMKKE05A	687C-T	Silenciosa Pro229
	CaMKK2	Intrón03	CaMKK2I03A	10C-T	desconocida
10	CaMKK2	Intrón02	CaMKK2I02A	39C-T	desconocida
	CaMKK2	Intrón01	CaMKK2I01B	2911G-C	desconocida
	CaMKK2	Intrón01	CaMKK2I01A	89C-A	desconocida
15	CaMKK2	Exón01	SNP6f18v2	253A-T	Thr85Ser
	CaMKK2	Exón01	SNP6f18v1	29G-A	Ser10Asn
	CaMKK2	5'ÚTR01	CaMKK2UTR01B	253T-C	desconocida
20	CaMKK2	5'ÚTR01	CaMKK2UTR01A	63C-A	desconocida
	APC5	Intrón01	APC5I01A	10G-T	desconocida
	APC5	Intrón01	APC5I01B	50A-T	desconocida
25	APC5	Intrón05	APC5I05A	73T-C	desconocida
	APC5	Intrón06	APC5I06A	73T-G	desconocida
	APC5	Exón11	APC5E11A	1416C-T	Silenciosa His472

Cada SNP en los genes Rab35, PXN, PLA2G1B, PIN, CaBP, OASL, P2X4R, CaMKK2 y APC5 se diseñó de acuerdo con el gen en el que se encontró, y su localización en ese gen (regiones intrónicas o exónicas). Cada SNP en el gen P2X7R se diseñó de acuerdo con su posición en la SEC ID N°: 1. El alelo describe la posición y la variación observada. En regiones codificantes, la posición es relativa al codón de inicio, mientras que los SNP intrónicos están colocados con respecto al principio del intrón correspondiente (cuando se conoce). En la tabla 1a y en las SEC ID N°: 52 a 111 se definen los cebadores usados para identificar los SNP en P2X7R y la localización de cada SNP.

Se realizaron estudios de asociación usando SNP de sentido erróneo. Se usaron SNP de sentido erróneo o SNP que pudieran estar cercanos a los sitios de corte y empalme, porque es más probable que las enfermedades estén asociadas con una función indebida de las proteínas. El grupo de casos estaba compuesto por individuos bipolares I, personas a las que se les había diagnosticado trastorno bipolar de tipo esquizoafectivo (182 sujetos) y trastorno bipolar II (31 sujetos). Muchos controles de la región Saguenay/Lac-St-Jean se muestrearon a partir de los bancos de ADN Steinert, Glaucoma y Paget. En los individuos de control no se diagnosticaron trastornos afectivos. De acuerdo con los riesgos a lo largo de la vida de padecer trastornos bipolares (1%), no hubo necesidad de seleccionar controles para trastornos psiquiátricos.

La secuenciación directa de productos de PCR es, con mucho, el método más preciso de análisis y es el método elegido en vista de la capacidad de la presente plataforma de secuenciación. Los productos de PCR se analizaron por secuenciación directa como se ha descrito anteriormente. Después del análisis de secuenciación, los individuos se tipificaron automáticamente para el SNP correspondiente usando un programa desarrollado internamente, GENO.pl. Los resultados de la genotipificación de SNP se recopilan en una base de datos 4D.

La hipótesis de asociación se ensayó con CLUMP (*Sham & Curtis* 1995, Ann. Hum. Genet. 59: 97-105). Se usaron mil simulaciones para estimar los valores de p. Los resultados se ilustran en la tabla 11. El parámetro estadístico T1, que es el parámetro estadístico chi-cuadrado habitual en la tabla de contingencia de partida, se usó para ensayar la asociación alélica. Además, el mayor parámetro estadístico chi-cuadrado conseguido comparando una columna de la tabla original con el total de las demás columnas, denominado parámetro estadístico T3, se añadió al previo para ensayar la posible asociación de genotipos, ya que los resultados del parámetro estadístico T1 pueden sesgarse cuando la tabla de contingencia contiene celdas con valores bajos.

TABLA 11

Hipótesis de asociación usando CLUMP

Gen	SNP	Eficaz		Análisis Alélico valor de p (T1)	Análisis de Genotipo	
		Casos	Controles		valor de p (T2)	valor de p (T3)
P2X7R	P2XR7v11B	208	211	0,795	0,036	0,028
	P2XR7v13A	212	214	0,344	0,250	0,186
	P2XR7v13E	212	211	0,780	0,017	0,017
CAMKK2	SNP6f18v5	206	135	1,00	1,00	1,00
	SNP6f18v4	206	135	0,816	0,962	0,841
	SNP6f18v2	205	135	0,057	0,110	0,095
	SNP6f18v1	206	135	0,512	0,532	0,385

Los estudios de asociación que usan SNP en P2X7, P2X4 y CaMKK2 revelan asociaciones significativas a un nivel de aproximadamente 5% menor. Se observaron tres asociaciones de genotipo en P2X7. Sin embargo, los SNP P2XR7v11B y P2XR7v13E están muy asociados entre sí basándose en una tabla de contingencia. También hay una asociación de alelos a nivel de 5,7% para SNP6f18v2 en CaMKK2. La información asociada con cada SNP relevante puede encontrarse en las Tablas 10 y 12.

Se realizaron estudios de asociación adicionales usando CLUMP en muestras que contienen más individuos de casos y de control. Se usaron mil simulaciones para estimar los valores de p.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 293 114 T3

TABLA 11a

Valores de *p* empíricos y razones de posibilidades (OR) con un intervalo de confianza de 95%, observados con CLUMP para el análisis de alelos y genotipos de SNP

Gen	Marcador (serie de marcadores)	Frecuencias de Alelo	Eficaz		Alelos			Genotipos	
			caso	controles	T1 valor de p	OR	OR 95% CI	T1 valor de p	T3 valor de p
P2XR7	P2XR7UTR5F (1)	C (0,18); T (0,82)	212	208	0,280	1,21	0,86-1,71	0,067	0,069
	P2XR7UTR5G (2)	G (0,09); T (0,91)	211	204	0,481	1,19	0,76-1,87	0,261	0,231
	P2XR7UTR5H (3)	C (0,95); T (0,05)	210	202	0,549	1,19	0,67-2,13	0,768	0,582
	P2XR7UTR5A (4)	A (0,05); C (0,95)	210	207	0,526	1,26	0,68-2,34	0,754	0,517
	P2XR7UTR5B (5)	C (0,78); T (0,22)	211	207	0,629	1,09	0,79-1,50	0,104	0,128
	P2XR7UTR5D (6)	A (0,96); G (0,04)	211	205	0,268	1,43	0,77-2,65	0,598	0,240
	P2XR7UTR5E (7)	A (0,04); G (0,96)	211	210	0,658	1,23	0,65-2,33	0,139	0,234
	P2XR7UTR5C (8)	A (0,22); G (0,78)	208	210	0,889	1,04	0,75-1,44	0,168	0,293
	P2XR7I01B (9)	C (0,98); T (0,02)	210	207	0,352	1,71	0,67-4,39	0,348	0,348
	P2XR7v02A (10)	C (0,05); T (0,95)	211	208	0,189	1,49	0,84-2,64	0,397	0,167
	P2XR7I04A (11)	A (0,01); G (0,99)	211	211	0,344	0,25	0,03-2,23	0,356	0,356
	P2XR7v05B (12)	C (0,75); T (0,25)	212	211	0,854	1,03	0,76-1,41	0,234	0,335
	P2XR7E05D (13)	A (0,01); G (0,99)	211	211	0,726	1,51	0,42-5,38	0,735	0,735
	P2XR7v05A (14)	C (0,48); T (0,52)	211	209	0,638	1,07	0,82-1,40	0,895	0,895

ES 2 293 114 T3

	P2XR7E05C (15)	C (0,97); T (0,03)	210	211	0,195	0,45	0,16- 1,31	0,349	0,276
	P2XR7I07E (16)	C (0,64); T (0,36)	208	214	0,394	0,87	0,66- 1,16	0,057	0,064
	P2XR7v08A (17)	A (0,24); G (0,76)	210	212	0,221	1,22	0,90- 1,67	0,433	0,496
	P2XR7v08B (18)	A (0,05); G (0,95)	210	213	0,386	0,71	0,36- 1,41	0,520	0,662
	P2XR7V11A (19)	C (0,88); T (0,12)	213	149	0,394	0,80	0,50- 1,29	0,387	0,463
	P2XR7v11B (20)	A (0,36); G (0,64)	208	211	0,795	1,04	0,79- 1,38	0,036	0,028
	P2XR7v11C (21)	C (0,89); G (0,11)	211	212	0,409	0,82	0,52- 1,28	0,303	0,661
	P2XR7v13F (22)	C (0,99); T (0,01)	196	207	0,030	3,24	1,04- 10,12	0,039	0,039
	P2XR7v13A (23)	A (0,84); G (0,16)	212	214	0,344	1,21	0,85- 1,72	0,250	0,186
	P2XR7v13B (24)	C (0,89); T (0,11)	207	212	0,494	0,83	0,53- 1,31	0,315	0,699
	P2XR7v13C (25)	A (0,77); C (0,23)	211	213	0,731	0,95	0,68- 1,31	0,557	0,616
	P2XR7V13H (26)	C (0,98); G (0,02)	211	213	0,238	1,75	0,68- 4,49	0,236	0,236
	P2XR7E13D (27)	G (0,89); T (0,11)	211	213	0,435	0,82	0,53- 1,28	0,268	0,680
	P2XR7E13J (28)	A (0,03); T (0,97)	204	199	0,179	0,48	0,16- 1,42	0,329	0,329
	P2XR7v13E (29)	A (0,36); G (0,64)	212	213	0,841	1,04	0,79- 1,37	0,026	0,025
	P2XR7UTR3E (30)	A (0,04); G (0,96)	205	197	1,000	0,96	0,45- 2,04	1,000	1,000
	P2XR7UTR3A (31)	A (0,47); C (0,53)	208	209	0,932	0,99	0,75- 1,30	0,264	0,239
	P2XR7UTR3B (32)	A (0,92); C (0,08)	208	210	0,174	0,65	0,38- 1,14	0,151	0,303
	P2XR7UTR3C (33)	A (0,95); C (0,05)	208	210	0,395	0,71	0,36- 1,40	0,508	0,667
P2XR4	UTR5A	A (0,18); C (0,82)	212	210	0,285	0,82	0,57- 1,18	0,514	0,484
	UTR5B	A (0,69); G (0,31)	212	210	0,670	0,93	0,70- 1,25	0,833	0,833

ES 2 293 114 T3

	I06A	C (0,84); T (0,16)	207	192	0,212	0,78	0,53- 1,16	0,398	0,217
5	E07A	A (0,84); G (0,16)	212	208	0,294	0,81	0,55- 1,19	0,536	0,479
10	UTR3A	C (0,74); G (0,26)	211	203	0,015	1,50	1,11- 2,02	0,021	0,014
15	UTR3B	A (0,97); T (0,03)	211	209	0,653	0,81	0,33- 1,97	0,649	0,649
20	UTR3C	C (0,03); G (0,97)	211	209	0,653	0,81	0,33- 1,97	0,672	0,672
25	CAMK K2								
30	E09B	A (0,03); C (0,97)	208	214	0,830	0,85	0,36- 2,00	0,829	0,829
	E09A	C (0,83); T (0,17)	208	214	0,202	0,78	0,54- 1,14	0,446	0,473
	E01B	A (0,35); T (0,65)	207	214	0,048	1,33	1,01- 1,76	0,126	0,218
	E01A	C (0,93); T (0,07)	208	214	0,189	1,44	0,86- 2,39	0,439	0,237

Se genotipificaron treinta y tres SNP en P2X7R, siete STP en P2X4R y cuatro SNP en CAMKK2, con una frecuencia alélica minoritaria mayor o igual a 1% (Tabla 11a). Las distribuciones de genotipos de estos SNP no se desviaron significativamente de HWE. Al nivel de 5%, se observaron aumentos estadísticamente significativos de la frecuencia alélica minoritaria en el grupo del trastorno afectivo bipolar a P2XR7v13F (valor de $p = 0,030$, OR = 3,24, CI 95% = 1,04-10,12), P2XR4UTR3A (valor de $p = 0,015$, OR = 1,50, CI 95% = 1,11-2,02) y CAMKK2E01B (valor de $p = 0,048$, OR = 1,33, CI 95% = 1,01-1,76). La distribución de genotipos en los SNP P2X7Rv13F y P2XR4UTR3A también difería significativamente a este nivel para los parámetros estadísticos T1 y T3, con un aumento de heterocigotos en la muestra de casos. Un SNP del exón 11 de P2X7R, P2XR7v11B, y otro del exón 13, P2XR7v13E, presentaron diferencias en distribuciones de genotipos con un valor de p mínimo de 0,028 y 0,025 observados con el parámetro estadístico T3. De nuevo, se observaron aumentos en la frecuencia de heterocigotos de 12% y 13%, respectivamente, en la muestra bipolar en estos polimorfismos.

Los ensayos de asociación haplotípicos significativos condujeron a valores de p menores de 0,5% para diferentes grupos de SNP que solapaban con el gen P2X7R (Tabla 11b). Considerando la colección de SNP que variaba de SNP32507 a SNP54847 (tabla 11c) como ejemplo para la distribución de haplotipos, se observó la mayor diferencia de frecuencias entre casos y controles con el haplotipo n° 1 (tabla 11d). El haplotipo n° 2 es otro ejemplo de haplotipo que se observa con más frecuencia en el grupo de casos. Por otra parte, la frecuencia para el haplotipo n° 3 está ligeramente aumentada en la muestra de control (diferencia de frecuencias = 0,091). La tabla 11e presenta los productos peptídicos derivados de los haplotipos nucleotídicos mostrados en la tabla 11d.

TABLA 11b

Haplotipos que muestran asociación alélica significativa al nivel de 0,5% para los parámetros estadísticos T1 o T3

Haplotipo (series de marcadores ¹)	Nº de SNP	Distancia ²	Haplotipo eficaz		Parámetro estadístico T1	Parámetro estadístico T3	Nº de haplotipo ³
		(pb)	casos	control	(valor de p)	(valor de p)	
P2XR7I01B-P2XR7V13A (9-23)	15	29618	361	257	0,0003	0,0252	20
P2XR7v02A-P2XR7v13B (10-24)	15	29550	361	260	0,00008	0,0294	20
P2XR7I04A-P2XR7v13C (11-25)	15	22164	360	264	0,0003	0,0323	19
P2XR7v05B-P2XR7v13H (12-26)	15	22200	361	265	0,0004	0,0065	18
P2XR7E05D-P2XR7E13D (13-27)	15	22180	365	268	0,0035	0,0287	16
P2XR7v05A-P2XR7E13J (14-28)	15	22267	352	246	0,0007	0,0163	15
P2XR7E05C-P2XR7v13E (15-29)	15	22269	353	250	0,0012	0,0200	10
P2XR7I07E-P2XR7UTR3E (16-30)	15	17452	355	247	0,0020	0,0192	11

¹ Las series de marcadores de SNP en el haplotipo indicado en la tabla 11b se refieren a los genotipificados en la tabla 11a

² Distancia entre los dos SNP más distales del haplotipo

³ Número de haplotipos con frecuencias >1% en los grupos de casos o de control

ES 2 293 114 T3

TABLA 11c

Posición y alelos para SNP de formación de haplotipos. Los haplotipos se describen en la tabla 11d

SEC ID Nº	Polimorfismo	Posición
1	C-T	32507
1	C-T	32548
1	C-T	37439
1	G-A	37605
1	G-A	37623
1	C-T	47214
1	G-A	47383
1	C-G	47411
1	C-T	54399
1	A-G	54480
1	C-T	54523
1	A-C	54588
1	C-T	54664
1	G-T	54703
1	T-A	54804
1	G-A	54847

TABLA 11d

Haplotipos con diferencias significativas de frecuencias entre individuos afectados y de control

Haplotipo	32507	32548	37439	37605	37623	47214	47383	47411	54399	54480
Nº 1	C	C	C	A	G	C	G	C	C	A
Nº 2	C	C	C	G	G	C	G	C	C	A
Nº 3	C	C	T	G	G	C	A	C	C	A

Haplotipo	54523	54588	54664	54703	54804	54847	F _{afectado}	F _{controles}
Nº 1	C	A	C	G	T	G	0,20	0,13
Nº 2	C	C	C	G	T	G	0,05	0,01
Nº 3	C	A	C	G	T	A	0,11	0,20

TABLA 11e

Aminoácidos correspondientes para cSNP descritos en la Tabla 11c. Están colocados de acuerdo con la SEC ID N°: 3

Posición en la SEC ID N° 3	155	168	270	276	348	357	433
Haplotipo 1	Y	C	H	R	A	T	A
Haplotipo 2	Y	C	R	R	A	T	A
Haplotipo 3	Y	C	R	R	T	T	A

Posición en la SEC ID N° 3	460	474	496	521	534	568	582
Haplotipo 1	Q	P	E	H	L	I	P
Haplotipo 2	Q	P	A	H	L	I	P
Haplotipo 3	Q	P	E	H	L	I	P

Ejemplo 3

Polimorfismos encontrados en P2X7R en individuos que padecen depresión

Se realizaron estudios de asociación usando SNP en el gen P2X7R en una muestra de casos/controles (535 individuos) procedente de una población alemana. El grupo de casos estaba compuesto por 36 individuos a los que se les había diagnosticado trastorno bipolar tipo I o tipo II y 279 individuos a los que se les habían diagnosticado trastornos unipolares (es decir depresión) que representaban 133 hombres afectados y 182 mujeres afectadas. Entre los controles, se contaron los 220 individuos de control restantes que eran normales (es decir, se les había diagnosticado como no depresivos) y comprendían 81 hombres, 182 mujeres y 14 de sexo desconocido. Se detectó la misma distribución sexual en los dos grupos.

En esta muestra se identificaron SNP usando un subgrupo de 24 individuos afectados. Los SNP en el gen P2X7R detectados en la población alemana fueron similares si no idénticos a los SNP vistos en la población de Saguenay/Lac-St-Jean (véase la tabla 12). También se observaron otros SNP de sentido erróneo raros en la población alemana, tales como Arg117Trp (P2XR7E03A), Glu186Lys (P2XR7E06A), Leu191Pro (P2XR7E06B) e Ile568Asn (P2XR7E13J). Estos aminoácidos están bastante conservados entre genes P2X7 ortólogos. Es posible que la mutación Ile568Asn (P2XR7E13J) pueda estar implicada en la expresión en la superficie de P2X7.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 293 114 T3

TABLA 12

Comparación entre polimorfismos en la población de Saguenay/Lac-St-Jean y la población alemana en el gen P2X7R humano

Exones o intrones asociados	variación (SNP u otros)	Alelo	Posición*	Modificación	Frecuencia (Canadá)	Frecuencia (Alemania)
5'UTR	P2XR7UTR5L	T-C	362	desconocida	0,13	0,08
5'UTR	P2XR7UTR5M	T-G	532	desconocida	0,16	0,1
5'UTR	P2XR7UTR5K	A-G	1100	desconocida	0,13	0,13
5'UTR	P2XR7UTR5J	A-G	1122	desconocida	0,13	0,13
5'UTR	P2XR7UTR5I	C-G	1171	desconocida	0,06	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5F	T-C	1351	desconocida	0,3	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5N	G-A	1702	desconocida	-	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5G	T-G	1731	desconocida	0,17	0,15
5'UTR	P2XR7UTR5H	C-T	1860	desconocida	0,07	0,15
5'UTR	P2XR7UTR5A	C-A	2162	desconocida	0,07	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5B	C-T	2238	desconocida	0,3	0,27
5'UTR	P2XR7UTR5D	A-G	2373	desconocida	0,07	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5E-	G-A	2569	desconocida	0,1	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5C	G-A	2702	desconocida	0,31	0,27
Intrón01	P2XR7I01C	G-C	3166	desconocida	0,03	-
Intrón01	P2XR7I01A	C-T	24778	desconocida	0,03	-
Intrón01	P2XR7I01B	C-T	24830	desconocida	0,03	RARO
Exón02	P2XR7v02A	T-C	24942	Val76Ala	0,06	0,08
Exón03	P2XR7E03A	C-T	26188	Arg117Trp	-	RARO
Intrón03	P2XR7I03A	A-G	26308	desconocida	0,7	0,44
Intrón03	P2XR7I03B	G-A	26422	desconocida	0,18	0,12
Intrón04	P2XR7I04A	G-A	32394	desconocida	0,03	0,01
Intrón04	P2XR7v05B	T-C	32434	desconocida	0,33	0,29
Exón05	P2XR7E05D	G-A	32493	Gly150Arg	RARO	0,02
Exón05	P2XR7E05E	G-A	32506	Silenciosa Val154	-	RARO
Exón05	P2XR7v05A	C-T	32507	Tyr155His	0,33	0,44

ES 2 293 114 T3

	Exón05	P2XR7E05C	C-T	32548	Silenciosa Cys168	RARO	0,02
5	Intrón05	P2XR7I05C	A-C	32783	desconocida	0,25	-
	Intrón05	P2XR7I05D	T-C	35309	desconocida	ND	0,35
	Intrón05	P2XR7I05B	C-T	35374	desconocida	0,7	0,67
10	Intrón05	P2XR7I05A	A-C	35378	desconocida	0,7	0,65
	Exón06	P2XR7E06A	G-A	35438	Glu186Lys	-	0,02
	Exón06	P2XR7E06B	T-C	35454	Leu191Pro	-	0,02
15	Intrón06	P2XR7I06C	T-C	35549	desconocida	0,04	0,08
	Intrón06	P2XR7I06G	G-C	35641	desconocida	-	0,02
	Intrón06	P2XR7I06D	A-C	35725	desconocida	0,21	0,27
	Intrón06	P2XR7I06F	T-G	36001	desconocida	0,17	0,3
20	Intrón06	P2XR7I06E	A-T	36064	desconocida	0,11	0,1
	Intrón06	P2XR7I06A	DelGTTT	36091- 36094	desconocida	0,14	0,3
25	Intrón06	P2XR7I06B	C-G	36108	desconocida	0,14	0,29
	Intrón07	P2XR7I07A	C-T	36374	desconocida	0,07	-
	Intrón07	P2XR7I07B	G-A	36378	desconocida	0,21	0,28
30	Intrón07	P2XR7I07C	T-A	36387	desconocida	0,21	0,28
	Intrón07	P2XR7I07D	G-C	36398	desconocida	0,42	0,4
	Intrón07	P2XR7I07E	C-T	37439	desconocida	0,41	-
	Intrón07	P2XR7I07F	T-C	37513	desconocida	-	RARO
35	Exón08	P2XR7E08C	C-T	37604	Arg270Cys	RARO	-
	Exón08	P2XR7v08A	G-A	37605	Arg270His	0,46	0,24
	Exón08	P2XR7v08B	G-A	37623	Arg276His	0,03	0,02
40	Exón08	P2XR7E08D	C-T	37633	Silenciosa Asp279	RARO	-
	Intrón09	P2XR7v11A	C-T	47214	desconocida	0,08	0,03
45	Exón11	P2XR7v11B	G-A	47383	Ala348Thr	0,5	0,44
	Exón11	P2XR7v11C	C-G	47411	Thr357Ser	0,08	0,07
	Intrón11	P2XR7I11D	T-C	47563	desconocida	0,43	0,44
50	Intrón12	P2XR7I12A	C-T	54307	desconocida	0,32	-
	Intrón12	P2XR7I12B	G-A	54308	desconocida	0,03	-
	Exón13	P2XR7v13F	C-T	54399	Ala433Val	0,13	-
	Exón13	P2XR7v13A	A-G	54480	Gln460Arg	0,13	0,17
55	Exón13	P2XR7v13B	C-T	54523	Silenciosa Pro474	0,1	0,07
60	Exón13	P2XR7v13G	DelCCCTGAGA GCCACAGG TGCCT	54562- 54582	Del de 7aa 488 a 494 (PESHRCL)	RARO	-
	Exón13	P2XR7v13C	A-C	54588	Glu496Ala	0,13	0,06
65	Exón13	P2XR7v13H	C-G	54664	His521Gln	0,03	-

ES 2 293 114 T3

Exón13	P2XR7E13D	G-T	54703	Silenciosa Leu534	0,1	0,02
Exón13	P2XR7E13J	A-T	54804	He568Asn	-	0,01
Exón13	P2XR7v13I	G-A	54834	Arg578Gln	-	RARO
Exón13	P2XR7v13E	G-A	54847	Silenciosa Pro582	0,4	0,45
3'UTR	P2XR7UTR3 A	C-A	55169	desconocida	0,48	0,37
3'UTR	P2XR7UTR3 B	A-C	55170	desconocida	0,09	0,1
3'UTR	P2XR7UTR3 C	A-C	55171	desconocida	0,05	0,06
3'UTR	P2XR7UTR3 D	C-T	55917	desconocida	0,001	-
3'UTR	P2XR7UTR3 E	G-A	54925	desconocida	-	0,01

La posición y numeración del polimorfismo corresponde al gen P2X7R humano como se ha definido en la SEC ID N°: 1. Para identificar la organización genómica del gen P2X7R, primero se organizaron clones BAC usando marcadores polimórficos conocidos, sitios de señalización de secuencia (STS), secuencias con extremo BAC y señales de secuencia expresadas (EST). Se reensamblaron regiones de ADN no orientadas y desordenadas en una secuencia usando Phrap y las piezas se reordenaron usando exones de P2X7R como soportes. No se ha realizado una organización completa del gen para P2X7R. Sólo hay una estructura parcial de gen desde el exón 6 a 13, NT_037809. Por lo tanto, esta secuencia genómica que incluye el gen P2X7R como se representa en la SEC ID N°: 1 podría contener algunos errores de secuencia, específicamente en regiones intrónicas. Los cebadores usados para la amplificación y secuenciación de SNP se muestran en la Tabla 1a y se representan en las SEC ID N°: 52 a 111.

Se realizó un análisis estadístico de acuerdo con el método CLUMP (Sham & Curtis 1995, Ann, Hum, Genet. 59:97-105). La tabla 13 resume los estudios de asociación alélica y genotípica para SNP en el gen P2X7.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 13

Estudios de asociación alélica y genotípica usando CLUMP

Locus	Frecuencias de alelos*	Eficaz		Análisis de Alelos valor de p (T1)	Análisis de Genotipo	
		Casos	Controles		valor de p (T1)	valor de p (T3)
P2XR7UTR5F	2(0,23); 4(0,77)	311	217	0,109	0,319	0,339
P2XR7UTR5N	1(0,001); 3(0,999)**	314	218	0,038	0,048	0,048
P2XR7UTR5G	2(0,001); 3(0,105); 4(0,894)	314	218	0,993	0,714	0,761
P2XR7UTR5H	2(0,92); 4(0,08)	312	215	0,743	0,884	0,754
P2XR7UTR5A	1(0,08); 2(0,92)	312	219	0,557	0,786	0,678
P2XR7UTR5B	2(0,73); 4(0,27)	310	218	0,485	0,761	0,814
P2XR7UTR5D	1(0,92); 3(0,08)	311	217	0,555	0,787	0,691
P2XR7v02A	2(0,09); 4(0,91)	313	218	0,501	0,729	0,591
P2XR7I04A	1(0,04); 3(0,96)	314	220	0,604	0,433	0,348
P2XR7v05B	2(0,69); 4(0,31)	314	220	0,133	0,270	0,325
P2XR7E05D	1(0,03); 3(0,97)	314	220	0,842	0,827	0,827
P2XR7E05E	1(0,006); 3(0,994)**	314	220	0,048	0,045	0,045
P2XR7v05A	2(0,60); 4(0,40)	314	220	0,038	0,144	0,219
P2XR7E05C	2(0,98); 4(0,02)	314	220	1,000	1,000	1,000
P2XR7I07F	2(0,002); 4(0,98)	315	219	1,000	1,000	1,000
P2XR7v08A	1(0,23); 3(0,77)	315	219	0,454	0,673	0,634
P2XR7v08B	1(0,02); 3(0,98)	315	219	0,636	0,638	0,638
P2XR7v11A	2(0,95); 4(0,05)	311	218	0,348	0,391	0,436
P2XR7v11B	1(0,45); 3(0,55)	312	218	0,605	0,803	0,790
P2XR7v11C	2(0,93); 3(0,07)	312	218	0,793	0,256	0,924
P2XR7I11D	2(0,45); 4(0,55)	312	219	0,665	0,735	0,740
P2XR7v13A	1(0,87); 3(0,13)	305	215	0,017	<0,001	<0,001
P2XR7v13B	2(0,93); 4(0,07)	305	216	1,000	0,228	0,677
P2XR7V13C	1(0,91); 2(0,09)	305	216	0,151	0,006	0,008
P2XR7E13D	3(0,94); 4(0,06)	315	219	0,402	0,429	0,474
P2XR7E13J	1(0,01); 4(0,99)	315	219	0,618	0,603	0,603
P2XR7E13I	1(0,004); 3(0,996)	315	219	0,999	1,000	1,000
P2XR7v13E	1(0,46); 3(0,54)	314	219	0,699	0,866	0,845
P2XR7UTR3A	1(0,518); 2(0,482)	314	219	0,617	0,850	0,875
P2XR7UTR3B	1(0,966); 2(0,034)	313	219	0,522	0,850	0,643
P2XR7UTR3C	1(0,979); 2(0,021)	313	219	0,636	0,505	0,382
P2XR7UTR3E	1(0,02); 3(0,98)	315	219	0,147	0,161	0,161

* La columna frecuencias alélicas presenta los alelos para cada SNP (A = 1, C = 2, G = 3, T = 4) y su frecuencia respectiva.

** Para este SNP, se observó una celda cero en las dos tablas de contingencia 2X2 (alelo y genotipo). Se observó un valor de p de <0,045 por ensayo exacto de Fisher.

Para el análisis de SNP, se controló el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en las muestras de control. El principio de Hardy-Weinberg (HWP) puede indicarse como se indica a continuación: En una población grande de emparejamientos aleatorios, en la que no hay migración o selección frente a un genotipo particular y la tasa de mutación permanece constante, las proporciones de los diversos genotipos permanecerán sin cambios de una generación a otra. Considérese un sistema de dos alelos con los alelos A y a. Si la proporción de A en la población se representa como p y la proporción de a como q, entonces $p + q$ representa la suma total de alelos en este locus, es decir $p + q = 1$. El HWP es útil para evaluar algunos problemas de población como la diversidad conyugal, endogamia, estratificación de la población, mezcla y variabilidad reducida de un genotipo particular. El SNP P2XR7v13A no respetó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La hipótesis de asociación también se ensayó usando una tabla de positividad de alelos considerada adecuada para la detección de alelos de susceptibilidad que muestran un modo dominante de herencia (Ohashi y Tokunaga, J. Hum. Genet. 44 (1999), 246-248; Ohashi et al., Ann. Hum. Genet. 65 (2001), 197-206). Usando este método se obtuvieron resultados similares a los obtenidos usando las tablas de frecuencia de alelos, con la excepción de P2XR7v05A donde los valores de p fueron 0,253. De esta manera, P2XR7v05A presentó una asociación menos significativa en este análisis. Esta diferencia puede atribuirse al modo de herencia.

La proporción de individuos unipolares en el análisis de la población Alemana es bastante importante, ya que la Asociación Psiquiátrica Americana (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition Text Revision (DMS-IV-TR), American Psychiatric Press, 2000) ha notificado un aumento en la susceptibilidad de trastornos unipolares en grupos femeninos. Para determinar si la variable sexual podía influir en el análisis de asociación, se realizaron estudios de asociación adicionales controlando el parámetro sexual. Se omitieron del estudio individuos normales de la población alemana sin información sobre el sexo. Después, se obtuvo un modelo de regresión logística incluyendo el sexo como factor. Para obtener un modelo tan estable como sea posible, el modelo de regresión se minimizó usando la diferencia entre logaritmos de probabilidad para modelos con o sin interacción (Hosmer y Lemeshow, "Applied logistic regression", John Wiley and Sons, 1989). La estrategia usada para manipular las celdas cero de las tablas de continencia fue eliminar la categoría asociada completamente. Los cálculos se realizaron con SAS v8.0. SAS es un paquete de software estadístico que permite al usuario manipular y analizar datos de muchas maneras diferentes. Debido a sus capacidades, este paquete de software se usa en muchas disciplinas, incluyendo ciencias médicas, ciencias biológicas y ciencias sociales.

La introducción de un parámetro sexual no alteraba la asociación ya observada en el análisis previo. Además, este modelo de análisis reveló resultados adicionales: se observó una asociación potencial de alelos con P2XR7v05B ($p = 0,064$), y una asociación genotípica para P2XR7v08A ($p = 0,042$).

Se realizaron estudios de asociación usando muestras reunidas uniando los individuos de las muestras de la población de Saguenay/Lac-St-Jean con los de la población Alemana. Los resultados se ilustran en la tabla 14. El objetivo de este análisis es destacar las características comunes entre las dos poblaciones. Sin embargo, de acuerdo con las diferencias entre las dos muestras (principalmente el fenotipo de individuos afectados, es decir, trastorno bipolar en las muestras de Saguenay/Lac-St-Jean, frente al trastorno principalmente unipolar en la población Alemana) se controlaron algunos parámetros, incluyendo el sexo y la etnicidad. La estrategia de modelos para las regresiones logísticas se ha descrito anteriormente.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 14

Estudios de asociación usando muestras reunidas de las dos poblaciones

Locus	Análisis de Alelos		Análisis de Genotipo	
	valor de p para SNP	valor de p para sexo	valor de p para SNP	valor de p para sexo
P2XR7v02A	0,8254	0,0085	0,8650	0,4531
P2XR7v05B	0,1751	0,3714	0,2034	0,5110
P2XR7v05A	0,3808	0,0266	0,0885	0,1392
P2XR7v08A	0,0452	0,0041	0,1021	0,3452
P2XR7v08B	0,3471	0,0040	0,3413	0,3617
P2XR7v11A	0,3559	0,0136	0,5888	0,4404
P2XR7v11B	0,5902	0,0093	0,3897	0,4302
P2XR7v11C	0,3731	0,0094	0,7648	0,4615
P2XR7v13A	0,0047	0,0209	<0,0001	0,4814
P2XR7v13B	0,5129	0,2352	0,9584	0,4092
P2XR7v13C	0,2466	0,0284	0,2225	0,4228
P2XR7v13E	0,8168	0,0159	0,3713	0,4990

Se observó una asociación alélica y genotípica para el locus P2XR7v13A ($p = 0,0047$) que fue más fuerte que en el análisis separado. También se observó una asociación alélica significativa para el locus P2XR7v08A ($p = 0,0452$). Además, el presente análisis también demuestra la relación potencial entre SNP P2XR7v05A y el origen con un valor de $p = 0,0515$ (no mostrado en la tabla) que está de acuerdo con el análisis de asociación previo realizado en las dos muestras por separado (véase la Tabla 13).

El análisis de haplotipo se realizó usando la población Alemana. El programa PHASE (*Stephens et al.*, Am. J. Hum. Genet. 68 (2001), 978-989) se usó para estimar haplotipos de SNP con exones del gen de P2XR7R. Se crearon haplotipos para cada exón que tenía más de un SNP asociado (véase la Tabla 15 para los SNP asociados a exones). Los grupos de casos variaron de 218 a 220 individuos, mientras que los grupos de control variaron entre 312 y 316 individuos. La hipótesis de asociación se ensayó con el método CLUMP, ya que se crearon muchos haplotipos para cada exón. Los ensayos estadísticos T1 y T3 se realizaron como se ha descrito anteriormente. También se calcularon los parámetros estadísticos T2 y T4 también debido a la presencia de pequeñas celdas eficaces en las tablas de contingencia. El parámetro estadístico T2 es el parámetro estadístico chi-cuadrado habitual aplicado en la tabla de contingencia obtenida después de colapsar las columnas con pequeños valores esperados. El parámetro estadístico T4 es el mayor parámetro estadístico chi-cuadrado obtenido comparando una columna de la tabla original con el total de las demás columnas. Se usaron mil simulaciones para estimar los valores de p . Los datos resultantes se analizaron con el modelo de regresión logística (descrito anteriormente) usando SAS V8.0 para considerar el parámetro sexual (para estos ensayos la muestra se redujo por 14 individuos normales). Sin embargo, este método de análisis se limita por la fiabilidad de haplotipos reconstruidos.

ES 2 293 114 T3

TABLA 15

SNP asociados con exones

Exones	SNP Asociados
5	P2XR7E05D P2XR7E05E P2XR7v05A P2XR7E05C
8	P2XR7v08A P2XR7v08B
11	P2XRv11B P2XRV11C
13	P2XR7v13A P2XR7v13B P2XR7v13C P2XR7E13D P2XR7E13J P2XR7v13I P2XR7v13E

TABLA 16

Asociación genotípica con haplotipos en el exón 13 de P2X7R

Exón (haplotipo)	Análisis de Alelo			Análisis de Genotipo		
	Clump*	valor de p(sexo)	valor de p(haplo)	Cúmulo	valor de p(sexo)	valor de p(haplo)
5(5)	T1:0,032 T2:0,068 T3:0,054 T4:0,059	0,3133	0,1947	T1:0,193 T2:0,159 T3:0,099 T4:0,304	0,460	0,5355
8(3)	T1:0,551 T2:0,585 T3:0,646 T4:0,646	0,3813	0,3064	T1:0,812 T2:0,689 T3:0,644 T4:0,756	0,5428	0,6652
11(3)	T1:0,750 T2:0,786 T3:0,726 T4:0,726	0,0886	0,7396	T1:0,625 T2:0,919 T3:0,929 T4:0,921	0,2305	0,9494
13(15")	T1:0,088 T2:0,079 T3:0,147 T4:0,072	0,1871	0,1264	T1:0,001 T2:0,002 T3:0,057 T4:<0,001	0,4610	0,019

* El ensayo de T1 no debe considerarse debido a las tablas de contingencia con celdas cero.

** Entre estos 15 haplotipos, se observaron 8 haplotipos en los que las celdas de casos tienen menos de 3 individuos.

La Tabla 16 ilustra una asociación genotípica con haplotipos en el exón 13 de los genes P2X7R. De manera interesante, se observaron muchos haplotipos para el exón 13. Las diferencias entre los parámetros estadísticos en el exón 13 (T3 menos significativo) pueden explicarse por la implicación de más de un genotipo de haplotipos en la enfermedad. También se detectó una asociación alélica potencial con haplotipos en el exón 5 del gen P2X7R.

A continuación se proporcionan resultados clínicos que ilustran las consecuencias funcionales de polimorfismos en P2X7R.

El desarrollo y transcurso de depresión está asociado causalmente con alteraciones en la regulación central del eje hipotalámico-pituitaria-adrenocortical (HPA). Las anomalías en el eje HPA pueden medirse usando el ensayo de supresión de dexametasona (DST) o el ensayo combinado de hormona de liberación de dexametasona/corticotropina (Dex/CRH). Los cambios en las mediciones de cortisol y/u hormona adrenocorticotrópica (ACTH) durante el ensayo DST o Dex/CRH indican una disfunción del HPA en pacientes deprimidos (Heuser *et al*, J. Psychiat. Res. 28 (1994) 341-356; Rybakowski y Twardowska, J. Psychiat. Res. 33 (1999) 363-370; Zobel *et al*, J. Psychiat. Res. 35 (2001) 83-94; Künzel *et al*, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178). Para demostrar que los SNP de P2X7R asociados con trastornos afectivos también están correlacionados con cambios en el eje de HPA, se midieron los niveles de cortisol y ACTH en respuesta al ensayo DST y Dex/CRH para los SNP P2XR7v13A y P2XR7v13C. P2XR7v13A consiste en un cambio de un nucleótido A por G que da como resultado una modificación Gln460Arg en la proteína P2X7R. El SNP P2XR7v13C corresponde a un cambio de un nucleótido A por C que da como resultado una modificación Glu496Ala que según se ha demostrado reduce espectacularmente la actividad de la proteína (Wiley *et al*, Drug Dev. Res. 53 (2001) 72-76).

Los métodos y condiciones para realizar el ensayo DST y Dex/CRH son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Heuser *et al*, J. Psychiat. Res. 28 (1994) 341-356; Künzel *et al*, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178. En resumen, los individuos se pretrataron a las 23:00 con una administración oral de 1,5 mg de dexametasona. Para el ensayo DST, se extrajo una muestra de sangre a las 8:00 antes de la administración de dexametasona (es decir, pre-dexametasona) y a las 8:00 la mañana siguiente a la administración de dexametasona (es decir, post-dexametasona). Para el ensayo Dex/CRH, se insertó un catéter venoso a las 14:30 al día siguiente de la administración de dexametasona y se extrajo sangre a las 15:00, 15:30, 15:45, 16:00 y 16:15 en tubos que contenían EDTA y trasilol (Bayer Inc., Alemania). A las 15:02, se administraron por vía intravenosa 100 mg de CRH humana (Ferring Inc., Alemania). La medición de las concentraciones plasmáticas de cortisol se realizó usando un kit de radioinmunoensayo comercial (ICN Biomedicals, USA) mientras que las concentraciones plasmáticas de ACTH se midieron usando un ensayo inmunométrico comercial (Nichols Institute, USA). Los dos ensayos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Para el SNP P2XR7v13A, se observó una reducción en los niveles basales de cortisol en el momento de la admisión en individuos con un alelo AG o GG en comparación con los individuos con el alelo AA (Figura 1f). Durante el ensayo Dex/CRH, se midió una reducción en la respuesta de cortisol y ACTH en individuos con el alelo GG en comparación con individuos con un alelo AA o AG (Figuras 1g y 1h).

Además, la respuesta al tratamiento antidepresivo estaba retardada en los individuos GG (Figura 1i).

Para el SNP P2XR7v13C, se midió un aumento en los niveles basales de cortisol después de la administración de dexametasona (Figura 1j). Durante el ensayo Dex/CRH, los individuos con el alelo CC presentaron una respuesta elevada al cortisol (Figura 1k), pero una respuesta reducida a la ACTH (Figura 1l) en comparación con los individuos AA y AC. Estos resultados indican una regulación defectuosa del eje HPA.

De esta manera, los SNP en P2X7R se correlacionan con una disfunción en el eje HPA y demuestran las consecuencias funcionales y clínicas de polimorfismos en P2X7R.

Ejemplo 4

Estructura del gen P2X7R y expresión del ARNm y secuencia del transcrito

Se analizó una secuencia de nucleótidos de 1700 pb correspondiente al promotor de P2X7R humano usando los algoritmos MatInspector V2.2 y Transfac 4.0. Este análisis demostró que el gen de P2X7R no contiene una caja TATA patrón, pero tiene sitios SP1 que pueden formar el inicio de la transcripción. Aparte de las secuencias de SP1, hay sitios de unión para los factores de transcripción GARA, Oct e Ikarus. Se cree que estos sitios proporcionan especificidad de tejido. De manera interesante, el promotor de P2X7R tiene sitios de unión que sugieren capacidad de respuesta a diferentes citoquinas tales como AP-1, NFAT y CEBPB.

P2X7R posee 13 exones y 12 intrones (Buell *et al*, Receptors Channels 5 (1998), 347) que proporcionan una base para un corte y empalme alternativo que produciría en teoría diferentes transcritos y produciría diferentes isoformas con posibles funciones diferentes. No se identificó claramente ninguna variante de corte y empalme alternativa. Sin embargo, los experimentos de agrupamiento EST permitieron la descripción de tres variantes de corte y empalme. Una se define por la falta del exón 5. Esta variante P2X7v02 corresponde al clon IMAGE: 3628076 aislado a partir de líneas celulares procedentes de cerebro. El P2X7v02 que carece del exón 5 produce un desplazamiento de fase, generando de esta manera un polipéptido más corto. La segunda variante de corte y empalme P2X7v03, se caracteriza por la

ES 2 293 114 T3

presencia del intrón corto 10 en el ARNm. Esta variante se confirma por dos secuencias de alta calidad, el clon de ADNc BRAMY2008977 (número AC: AK090866) procedente de amígdala humana y el clon EST dbEST: 7339877 procedente de un tumor humano desconocido. La última variante, P2X7v04, se define por la falta del primer exón que sugiere un uso alternativo del promotor próximo al exón 2. Un clon EST de alta calidad dbEST:4782844 procedente de un tumor de cabeza y cuello confirma esta variante. Estas variantes se muestran en las Figuras 16a a 16e.

Variantes de P2X7

10	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS MPPVD-----AFPCLPFS---FALVSDKLYQRKEPVISS MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS 1.....10.....20.....30.....40.....50
15	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	VHTKVKGIAEVKEEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQGNSSFVMTNFKTEGQEQRLLCP VHTKVKGIAEVKEEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQGNSSFVMTNFKTEGQEQRLLCP VHTKVKGIAEVKEEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQGNSSFVMTNFKTEGQEQRLLCP VHTKVKGIAEVKEEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQGNSSFVMTNFKTEGQEQRLLCP 61.....70.....80.....90.....100.....110
20	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	EYPTTRTLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEGNGQKTCVSAWCP IEAVEEAPRPA EYPTTRTLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEGNGQKTCVSAWCP IEAVEEAPRPA EYPTTRTLCSSDRGCKKGWMDPQSKGILLS----- EYPTTRTLCSSDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEGNGQKTCVSAWCP IEAVEEAPRPA 121.....130.....140.....150.....160.....170
25	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD ----- LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD 181.....190.....200.....210.....220.....230
30	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	NFSDVAIQGGIMGIEIYWDNLDWRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYYK NFSDVAIQGGIMGIEIYWDNLDWRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYYK ----- NFSDVAIQGGIMGIEIYWDNLDWRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYYK 241.....250.....260.....270.....280.....290
35	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	ENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGGKFDIIQLVVIIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSS ENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGGKFDIIQLVVIIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSS ----- ENNVEKRTLKVFGRFDILVFGTGGKFDIIQLVVIIGSTLSYFGLVDRSLFHALGRWFC 301.....310.....320.....330.....340.....350
40	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYVSFVDESHIRMVNQQLGRS NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYVSFVDESHIRMVNQQLGRS ----- EGSD----- 361.....370.....380.....390.....400.....410
45	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	LQDVKGQEVPRPAMDFDLSRLPLALHDTPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG LQDVKGQEVPRPAMDFDLSRLPLALHDTPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG ----- ----- 421.....430.....440.....450.....460.....470
50	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	SCLPSQLPESHRCLEELCCRKKPGACITTSSELFRKLVL SRHVLQFLLLYQE PLLALDVS SCLPSQLPESHRCLEELCCRKKPGACITTSSELFRKLVL SRHVLQFLLLYQE PLLALDVS ----- ----- 481.....490.....500.....510.....520.....530
55	P2X7v01 P2X7v04 P2X7v02 P2X7v03	TNSRLRHCA YRCYATWRFGSQDMADFAILPSCCRWRIRKEFPKSEGGYSGFKSPY TNSRLRHCA YRCYATWRFGSQDMADFAILPSCCRWRIRKEFPKSEGGYSGFKSPY ----- ----- 541.....550.....560.....570.....580.....590

Por lo tanto, las secuencias de inicio de la transcripción y la traducción de P2X7R humano se analizaron usando el software informático Blast, Genescan y HMMgene. Este análisis indicó que P2X7R posee con alta probabilidad sólo un sitio de inicio de la traducción. La mayoría de las señales de secuencia de expresión de P2X7R (EST; Único agrupamiento Hs. 193470) que tenían un extremo 5' fiable mostraron un sitio de inicio de la transcripción idéntico. Ninguna de las EST mostró ninguna indicación de un corte y empalme alternativo. Por lo tanto, los análisis virtuales sugieren que hay poca probabilidad de encontrar diferentes transcritos producidos por corte y empalme alternativo o el uso de promotores alternativos.

Los datos virtuales mencionados anteriormente se confirmaron por análisis RT-PCR que incluía la secuencia codificante de P2X7R humano prevista entera usando oligonucleótidos de 14 y 19 bases (5'-ATGCCGGCTTGCTG-3'; 5'-GTAGGGATACTTGAAGCCA-3') correspondientes al principio y final de la secuencia codificante, respectivamente. Se aisló ARN total de cerebro entero, de diferentes áreas del cerebro diseccionadas, timo, bazo y riñón, y se analizó con respecto a la expresión de P2X7R. Se realizaron reacciones de RT-PCR usando el sistema polimerasa C. Therm One Step (Roche Applied Science) y un protocolo para PCR touchdown (con reducción de la temperatura de hibridación) con un inicio caliente. En resumen, se realizó una transcripción inversa a 52°C de acuerdo con las condiciones

del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron con temperaturas de hibridación de 64°C para los primeros cinco ciclos y de 54°C para los siguientes 30 ciclos.

Se detectó una sola banda específica de tamaño de 1785 pb correspondiente a la secuencia codificante completa de P2X7R. Se detectó ARNm de P2X7R en cerebro entero, hipocampo, cerebelo, leucocitos y timo, pero no en corteza cerebral, hipotálamo, bazo y riñón (Figura 2). Todos los productos de PCR se clonaron usando el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) seleccionado en bacterias Top-10 (Invitrogen) por selección azul-blanca y se ensayaron por digestión con EcoRI. Se amplificaron clones que tenían fragmentos del tamaño esperado y se purificaron para secuenciación. La secuencia confirmó la identidad de los clones de 1785 pb como la secuencia codificante completa de P2X7R de tipo silvestre. Por lo tanto, en todos los tejidos ensayados, P2X7R de tipo silvestre se expresa como un solo transcrito que incluye la secuencia codificante completa. La presencia de isoformas con especificidad de tejido es poco probable. Estos estudios proporcionan información útil sobre la expresión del ARNm de P2X7R y el procesamiento del transcrito. Esta información puede usarse para sintetizar ribosondas para hibridación *in situ*, transferencia de Northern y Southern así como para la obtención de células por ingeniería genética para la sobreexpresión de P2X7R.

Ejemplo 5

Expresión de P2X7R en cerebro de ratón

La expresión de P2X7R se estudió adicionalmente por inmunohistoquímica de secciones en serie de cerebros de ratón completos usando un anticuerpo policlonal dirigido contra un péptido interno de P2X7R (Santa Cruz Biotechnology). Los cerebros de ratones sin estrés se congelaron inmediatamente, se cortaron en cortes de 16 μ m y se fijaron con paraformaldehído durante 5 minutos. Las secciones se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con suero de caballo 1:10. Todos los anticuerpos se diluyeron en tampón TBST (solución salina tamponada con Tris con 0,05% de Tween 20). El primer anticuerpo se usó en una dilución 1:200 y se incubó durante una noche. Todos los lavados se realizaron con tampón TBST. Como anticuerpo secundario se usó una IgG biotinilada anti-cabra (Vector Laboratories) y la detección se realizó usando el sistema complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa se rábano picante (Vector Laboratories) en combinación con diaminobencidina. Los cortes se tiñeron con azul de toluidina como tinte de contraste usando procedimientos convencionales. Como control negativo se usó el mismo procedimiento en ausencia del anticuerpo primario. Como control positivo para ensayar la conservación del tejido, ésta se verificó con un anticuerpo específico para la proteína Patched 1 (Santa Cruz Biotechnology). Patched 1 se usó como control positivo porque tiñe todas las estructuras cerebrales relevantes y no se ve afectada por el estrés ni por antidepresivos. Se detectó un modelo de tinción muy específico, coherente con la localización subcelular específica de P2X7R en células cerebrales. Los controles negativos carecían completamente de señal. El control positivo con Patched 1 mostró una intensidad de señal y distribución idénticas en todas las muestras, indicando que todos los tejidos se habían conservado y procesado igualmente bien.

Desde la parte frontal a la caudal, la proteína P2X7R se observó en la capa glomerular del bulbo olfativo a bajos niveles (Figura 3). P2X7R también estaba presente a niveles muy bajos en un área restringida del núcleo hipotalámico periventricular (Figura 3). Las células endodiales que rodeaban a los ventrículos laterales también mostraron una ligera tinción (Figura 3). Se detectó una señal más fuerte en áreas restringidas del hipocampo, donde la señal estaba presente en células individuales de la capa polimorfa, el lacunosum molecular y la capa oriens (Figura 4). En áreas más posteriores del hipocampo, la señal estaba presente en la capa molecular, estrato radiado y cerca del CA3. En una posición más caudal, P2X7R se expresaba en el órgano subcomisural (Figura 4). Por lo tanto, la expresión basal de P2X7R en el cerebro de ratones sin estrés está restringida a áreas que previamente se habían asociado con depresión, estrés, aprendizaje y memoria.

Ejemplo 6

P2X7R está modulado en ratones tratados con un antidepresivo

Se realizó una validación adicional del papel de P2X7R en trastornos afectivos examinando su patrón de expresión en respuesta al estrés y al tratamiento con fármacos antidepresivos. Se administró un programa de tratamiento que se había demostrado que producía efectos antidepresivos sobre el nivel conductual a ratones que se habían caracterizado como respondedores a antidepresivos, usando una diversidad de paradigmas de comportamiento adecuados para detectar los efectos ansiolíticos y antidepresivos de antidepresivos clásicos tales como el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina paroxetina. La paroxetina se administró por medio de una sonda a ratones macho sin experimentación previa durante un período de tiempo de 28 días a una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal dos veces al día. En paralelo, un grupo de ratones de control recibió solución de vehículo (es decir, sin paroxetina) usando el mismo régimen de tratamiento mientras que a un segundo grupo de control de ratones se les dejó tranquilos y sin estrés (es decir, se dejaron sin tratar) durante el mismo período de los experimentos. Al final del tratamiento a largo plazo, parte de los ratones de cada grupo experimental se ensayaron en la caja de oscuridad/luz (ensayo de comportamiento de ansiedad) y en el ensayo de natación forzada de Porsolt (ensayo de comportamiento de tipo depresivo) para confirmar la eficacia del tratamiento (Figura 5). El comportamiento de afrontamiento pasivo del estrés se redujo después del tratamiento a largo plazo con el antidepresivo paroxetina. La otra parte de los grupos experimentales (es decir, ratones sin experiencia de ensayo) se decapitaron, se extrajeron rápidamente los cerebros y se congelaron a -80°C hasta el uso.

La expresión de P2X7R en los cerebros de ratones en condiciones sin estrés y en ratones en condiciones de estrés ligero producido por la aplicación del vehículo, y en los ratones sometidos al tratamiento con paroxetina se evaluó usando tres cerebros diferentes de cada grupo. Se analizaron cortes seriados de cada grupo de animales en paralelo por inmunohistoquímica usando los mismos materiales para producir resultados completamente comparables. No se observó ningún cambio significativo en la expresión de P2X7R en el bulbo olfativo en respuesta al estrés o al tratamiento con paroxetina (Figura 6). Sin embargo, en el núcleo periventricular del hipotálamo, la paroxetina produjo una ligera inhibición de la expresión de P2X7R (Figura 7). No se observó ningún cambio significativo en las células endoteliales de diferentes áreas del cerebro (Figura 8). Los cambios más espectaculares se observaron en el hipocampo, donde P2X7R se inhibía fuertemente por una manipulación estresante mientras que el tratamiento con paroxetina producía una estimulación notable por encima de los niveles basales (Figuras 9, 10 y 11). Este efecto se observó a lo largo de todo el hipocampo, pero fue más evidente en la capa polimorfa cerca del giro dentado. En el órgano subcomisural, la expresión de P2X7R se mantuvo sin cambios por los diferentes tratamientos. Por lo tanto, la expresión de P2X7R está regulada fuertemente en dos áreas cerebrales específicas implicadas en la depresión y el estrés. Otras áreas cerebrales, que mostraron bajos niveles de P2X7R y no están implicadas directamente en la depresión, no mostraron cambios.

En las muestras procedentes de ratones tratados con paroxetina y que mostraban una fuerte expresión de P2X7R, fue posible analizar la distribución de P2X7R con más detalle (Figuras 10 y 11). La proteína P2X7R no sólo estaba presente en los cuerpos celulares, sino que también se detectaba claramente en proyecciones que inervaban la capa granular del giro dentado (Figura 12). Esta localización subcelular de P2X7R es coherente con un papel en la liberación de neurotransmisores y la potenciación a largo plazo.

Como algunos informes (Muria *et al.*, Biochem. J. 288 (1992), 897-901; Ferrari *et al.*, FEBS Lett. 447 (1999), 71-75) sugieren que la estimulación crónica y de alta dosis de P2X7R puede producir apoptosis en algunos tipos celulares, los hipocampos de los animales descritos anteriormente se analizaron con respecto a la co-localización de células apoptóticas y células que expresaban P2X7R, en secciones consecutivas, usando tinción TUNNEL e inmunohistoquímica. En secciones correlativas, sólo se detectaron algunas células apoptóticas y estaban presentes a lo largo de las capas granulares del hipocampo donde no se observó expresión de P2X7R (Figura 13). No se observaron diferencias significativas en los números de células apoptóticas entre las diferentes condiciones de tratamiento. Por lo tanto, la localización y número de células apoptóticas no se correlacionaba con la localización y número de células que expresaban P2X7R y descarta una implicación de P2X7R en la inducción de apoptosis en el hipocampo.

De esta manera, la expresión de P2X7R está considerablemente restringida a áreas específicas del cerebro implicadas en la depresión. Además, la expresión de P2X7R se inhibe por el estrés y se estimula fuertemente por el tratamiento con antidepresivos en estas áreas específicas. Por lo tanto, P2X7R cumple todos los criterios necesarios para las acciones de los antidepresivos de acuerdo con las normas más importantes en el campo de la investigación de la depresión. Además, estos resultados sugieren que la modulación de la función de P2X7R está asociada con el estrés crónico, que sirve como modelo para varios aspectos de trastornos afectivos.

40 Ejemplo 7

El efecto conductual de la inhibición de P2X7R en ratones

Para demostrar que la inhibición de P2X7R actúa como agente causante de trastornos afectivos, la función de P2X7R se inhibió específicamente en distintas regiones del cerebro sin afectar a ninguna otra función cerebral. Esto se consiguió administrando moléculas de ARN de interferencia pequeñas (ARNsi) bicatenarias en áreas restringidas del cerebro.

De acuerdo con el patrón de expresión observado de P2X7R en el hipocampo (Figuras 9, 10 y 11) y la implicación conocida del hipocampo en la depresión, se seleccionó el giro dentado (hipocampo) como región diana para la aplicación de ARNsi. A ratones macho sin experimentación previa se les implantó bilateralmente una cánula de guía (calibre 23, longitud 8 mm) por medio de un instrumento estereotáctico. Las coordenadas, en relación al bregma, fueron -2,00 posterior, $\pm$ 1,0 mm lateral y -1,0 mm ventral. Después de un período de recuperación de 5 días, los ratones se dividieron en tres grupos experimentales: vehículo (veh), ARN bicatenario de control (control) y ARNsi bicatenario específico de P2X7R (ARNsi). Las secuencias usadas para si ARN de P2X7R son 5'-GUGGGUCUUGCA CAUGAUCTT-3' y 5'-GAUCAUGUGCAAGACCCACTT-3'. Las dos secuencias se hibridaron e inyectaron juntas como un ARN bicatenario. En el día 6 después de la cirugía, los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano y se realizaron inyecciones de ARNsi. La concentración del control y ARNsi fue 0,1 nmol/ μ l y se infundió un volumen de 1 μ l por lado usando sistemas de inyección adaptados específicamente (calibre 30, longitud 9 mm). La anestesia para la infusión fue de corta duración y los ratones se despertaron inmediatamente o unos pocos segundos después de la manipulación.

Una vez suministradas al cerebro, las moléculas de ARNsi específicas para P2X7R se absorbieron por las células cerebrales e indujeron específicamente la degradación del ARNm de P2X7R complementario con alta eficacia. Como resultado, la función de P2X7R se inhibió específicamente durante un corto período sin afectar a ninguna otra función cerebral. A este respecto, la inyección de vehículo o ARNsi de control no tuvo como resultado ningún cambio evidente en el comportamiento normal, es decir, la alimentación y la ingesta de agua, o el comportamiento motor en la jaula.

Los efectos de la inhibición de P2X7R sobre el comportamiento de tipo depresivo se evaluaron 24 horas y 48 horas después de la infusión de ARNsi, control o vehículo de acuerdo con el paradigma de ensayo convencional, el ensayo de natación forzada de Porsolt (*Porsolt et al.*, Arch. Int. Pharmacodyn. 229 (1977), 327-336; *Porsolt*, Rev. Neurosci. 11 (2000), 53-58). El parámetro usado para evaluar el comportamiento de tipo depresivo es el tiempo durante el cual el animal está flotando en el agua, un comportamiento que está asociado con el comportamiento de desesperación, ya que el animal no hace ningún esfuerzo por afrontar activamente la situación que le produce estrés. En comparación con la aplicación de vehículo, no se detectó ninguna influencia del ARN bicatenario de control (5'-CAACUUCAUCUUCUACGCGTT-3') sobre el comportamiento de flotación (afrontamiento pasivo del estrés). Por el contrario, en comparación con los controles, los ratones a los que se les había infundido ARNsi específico para P2X7R mostraron un aumento significativo en el comportamiento pasivo, que se considera un comportamiento de tipo depresivo (Figura 14). Esta interpretación se vuelve más evidente cuando se visualizan los efectos de los antidepresivos sobre el comportamiento de afrontamiento pasivo de estrés en el ensayo de natación forzada (Figura 5). El comportamiento de afrontamiento pasivo de estrés aumentó después de una inyección aguda dentro del hipocampo (bilateral, giro dentado) de ARNsi que se dirigía a P2X7R. El ensayo de natación forzada de Porsolt es un ensayo convencional usado para evaluar la eficacia de antidepresivos y en muchos estudios se ha demostrado que el ensayo es sensible selectivamente para estos efectos, dado que se usa el modelo de animal correcto. El paradigma se ha usado ampliamente para ensayar compuestos farmacéuticos y para validar modelos animales de depresión, que muestran un aumento en el comportamiento pasivo como lo hacen los ratones cuando se ha inhibido la proteína P2X7R (ARNsi).

Al final del experimento, los ratones se sacrificaron y los cerebros se examinaron para confirmar la localización y eficacia de las inyecciones de ARNsi. Para este fin, los cerebros se cortaron en secciones y los cortes se tiñeron por inmunohistoquímica usando los protocolos mencionados anteriormente. Se examinaron en paralelo cerebros de ratones a los que se les había inyectado el ARNsi bicatenario específico, con ARN bicatenario de control y con vehículo. En estas condiciones, el ARNsi específico dirigido contra P2X7R inyectado cerca del giro dentado indujo una inhibición media de 80% de la expresión de la proteína P2X7R en comparación con las muestras de ratones a los que se les había inyectado vehículo o ARN bicatenario de control. Tanto el número de células que expresaban P2X7R como la intensidad de la expresión se redujeron fuertemente (Figura 15). Las inyecciones con ARNsi no produjeron ningún signo de inflamación local o infiltración en el hipocampo. De esta manera, la expresión de P2X7R se inhibe específica y localmente por la aplicación de ARNsi *in vivo*. Esta inhibición produjo cambios de comportamiento que indicaban un papel causante para P2X7R en trastornos afectivos. Estos resultados en combinación con los mencionados anteriormente apoyan y confirman la observación de mutaciones en P2X7R que están asociadas con enfermedades afectivas en seres humanos y que la modulación de la actividad P2X7R tiene efectos antidepresivos.

Ejemplo 8

Ensayo de selección de fármacos

Se establecieron métodos para identificar agonistas de P2X7R usando una línea celular de hipocampo de ratón immortalizada que expresaba el gen P2X7 endógeno. En resumen, la expresión de P2X7 se confirmó cultivando las células a 37°C/5% de CO₂ en DMEM con 10% de suero bovino fetal (Gibco). Después de alcanzar una confluencia de 80%, las células se recogieron en PBS y se homogeneizaron por un pase repetido a través de una jeringa (aguja 18G). La cantidad de proteína total se inhibió por el ensayo de Bradford (Sigma; diluido 1:5, D.O. medida a 595 nm) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Después, los homogeneizados de proteína se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga (Tris-Cl 50 mM pH 6,8; glicerol al 25%; azul de bromofenol 7,2 mM, SDS al 2%; β-mercaptoetanol 200 mM) y posteriormente se desnaturalizaron en agua hirviendo durante 10 minutos. Se cargaron 20 mg de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10% que contenía SDS al 0,4%. Se realizaron electroforesis y transferencia de Western de acuerdo con los protocolos convencionales descritos, por ejemplo, en *Sambrook, Russell* "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001). Después, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% y se incubaron con un anticuerpo contra P2X7R (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotech) seguido de incubación con un anticuerpo secundario de caballo anti-cabra acoplado con peroxidasa (dilución 1:10.000; Santa Cruz Biotech). Después, las membranas se incubaron durante 1 hora a 37°C en Sustrato de Transferencia de Western Lumi-Light (Roche Applied Science) seguido de una exposición de 10 minutos en una Película BioMax MR (Kodak).

Se detectó una banda de 70 kD correspondiente al tamaño esperado de la proteína P2X7R en células HT-22 que demostraba la expresión del gen P2X7 endógeno de ratón (Figura 17). Una segunda línea de células de hipocampo de ratón (HT-39) no expresaba P2X7.

Como P2X7R es un canal iónico de apertura por ATP que permite la entrada de iones de calcio y sodio en las células, se estableció un método para identificar agonistas de P2X7R controlando la entrada de calcio en células HT-22. Las células primero se cargaron con el colorante fluorescente éster AM de verde Oregon (Molecular Probes) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con DMEM/suero bovino fetal al 10% para retirar el exceso de colorante y se cultivaron durante 15 minutos en presencia de una concentración 100 μM de 2- y 2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato (BzATP: C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃). BzATP es un agonista conocido de P2X7R (*North y Surprenant*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580). El movimiento de calcio al interior de las células se visualizó con un microscopio de fluorescencia con un filtro de fluorescencia (longitud de onda 492/517 nm). El éster AM de verde Oregon es un colorante fluorescente que se une al calcio intracelular. Por consiguiente, se observó un aumento en la fluorescencia verde en células tratadas con BzATP (Figura 18) que señalizaba una activación de P2X7R.

que tiene como resultado una entrada de calcio en las células y un aumento de la unión del colorante verde Oregon al calcio intracelular.

Como alternativa, el éster AM de verde Oregon puede reemplazarse por Fluo-3, fluo-4, fluo-5F, fluo-5N, fluo-4FF, Fluo-4 dextrano, Fluo-3 AM, Fluo-4 AM, Fluo-5F AM, Fluo-5N AM y Fluo-4FF AM (Molecular Probes). La entrada de calcio en las células HT-22 también puede medirse en microplacas de 96 pocillos y 384 pocillos usando el Kit de Ensayo Calcium Plus (Molecular Device) o el Kit de Ensayo de Calcio FLIPR[®] para Sistemas de Lectura Fluorométrica en Placas de Imágenes (Molecular Device). Las células HT-22 pueden reemplazarse por cualquier célula que exprese P2X7R, incluyendo células que se han modificado genéticamente por la introducción de un gen P2X7 exógeno.

La especificidad del agonista de P2X7R sobre la entrada de calcio se confirmó por pretratamiento de las células HT-22 con ATP Oxidado (oATP; Sigma) 100 mM durante 1 hora antes de la adición de BzATP. oATP es un inhibidor irreversible del receptor (Chen *et al.*, J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203). La activación de P2X7R por el agonista se inhibió por oATP (Figura 18) como se ilustra por la ausencia de fluorescencia verde en las células.

Otro método para medir la actividad de P2X7R implica la entrada de bromuro de etidio en células que expresan P2X7R. La activación de P2X7R por un agonista permite la entrada de bromuro de etidio, que se une al ADN nuclear y emite una señal de fluorescencia. Como alternativa, el colorante de propidio YOPRO-1 puede sustituir al bromuro de etidio. Un aumento de fluorescencia puede usarse como medida de activación del receptor de P2X7. Por lo tanto, el ensayo puede usarse para ensayar y cuantificar el efecto de un agente o compuesto con propiedades agonistas sobre P2X7R. En el presente ejemplo, se sembraron 10³ células HT-22 por pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron a 37°C/5% de CO₂ en medio DMEM que contenía 10% de FCS hasta que las células se unieron a la superficie de cultivo. Una vez unidas, las células se incubaron durante 60 minutos en medio DMEM que contenía 10% de FCS, bromuro de etidio 10⁻⁴ M y concentraciones crecientes de BzATP (1 μM, 10 μM, 100 μM, 500 μM, 1 mM). Después puede contarse el número de células fluorescentes que han integrado el bromuro de etidio al ADN usando un microscopio fluorescente (Zeiss, Alemania). Las concentraciones por encima de BzATP 100 μM aumentaron el número de activación de señalización de núcleos fluorescentes de P2X7R (Figura 19a). Como alternativa, la fluorescencia de bromuro de etidio puede medirse usando un lector de placas fluorescentes Perkin-Elmer (excitación 520 nm, emisión 595 nm, amplitud de ranura: Ex 15 nm, Em 20 nm). A partir de las lecturas obtenidas, puede calcularse una cifra de pCI50 para cada agente o compuesto candidato. Por consiguiente, un agonista de P2X7R se define como un agente o un compuesto con una CE50 igual o inferior a 300 micromolar, mientras que la expresión CE50 se define como la concentración que induce 50% de la respuesta máxima a un agonista (North y Surprenant, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580). La especificidad de un agonista para P2X7R puede evaluarse por preincubación de las células durante 60 minutos con o-ATP 100 μM antes de añadir el agonista y el colorante de bromuro de etidio. En estas condiciones, la activación de P2X7R por el agonista se inhibe por oATP, dando como resultado una reducción en el número de células fluorescentes (Figura 19b).

Otro método para identificar agonistas de P2X7R se ideó generando una línea de células de ratón inmortalizada que sobreexpresa el gen P2X7R humano bajo el control de la región promotora/potenciadora temprana del citomegalovirus humano (CMV). El ADNc de P2X7R humano se insertó en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) y se utilizó para transfectar la línea celular de hipocampo de ratón HT-22 usando Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Un día después de la transfección, se añadió medio de cultivo que contenía 500 μg/ml de G418 a las células. Los clones resistentes se aislaron por separado y se cultivaron 14 días después de aplicar el medio de selección.

La actividad agonista de un compuesto se evaluó midiendo la entrada de calcio en las células que sobreexpresan el P2X7R humano. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en DMEM con 10% de suero bovino fetal (Gibco) hasta que alcanzaron la confluencia. Después, las células se cargaron durante una hora con una concentración 10 μM de Fluo-4 AM (Molecular Probes). Fluo-4 AM es un colorante fluorescente que se une al calcio intracelular. Después de la carga, las células se lavaron una vez con tampón que contenía CaCl₂ 0,5 mM y Hepes 20 mM y se trataron con BzATP μM o tenidap 50 μM. La actividad agonista se detectó midiendo un aumento en la entrada de calcio que produce un aumento en la unión a Fluo-4 AM y un aumento de fluorescencia. Los cambios en la señal de fluorescencia se miden usando un lector de placas Fluostar Optima (BMG biotech). Tanto BzATP como tenidap produjeron un aumento rápido en la intensidad de fluorescencia que se redujo lentamente a lo largo del tiempo (Figura 19c). De esta manera, los dos compuestos estimularon la actividad de P2X7R, lo cual tiene como resultado una entrada de iones en las células.

Ejemplo 9

La activación de P2X7R con agonistas tiene efectos antidepresivos

Para demostrar que la activación de P2X7R tiene efectos terapéuticos sobre trastornos afectivos, se administró el agonista de P2X7R BzATP (2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosina 5'-trifosfato (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) a una cepa de ratón DBA/201a seleccionada que presenta características de una elevada ansiedad, de responder a antidepresivos y de mostrar ansiolisis después de un tratamiento subcrónico con antidepresivos (Lucki *et al.*, Psychopharmacology 155 (2001), 315-322). BzATP es un compuesto con una fuerte especificidad por P2X7R (North y Surprenant, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580). En el presente ejemplo, el agonista de P2X7R se inyectó directamente en el

hipocampo de ratones. Sin embargo, también pudo suministrarse un agente o compuesto agonista de P2X7R por vía oral, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdérmica, intrarrectal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular.

- 5 En ratones macho de cuatro meses de edad se implantaron bilateralmente cánulas guía (calibre 23, longitud 8 mm) por medio de un instrumento estereotáctico (David Kopf Instruments). Las coordenadas, en relación al bregma, fueron -2,0 mm posterior, $\pm 1,0$ mm lateral y -1,0 mm ventral. Después de la cirugía, se dejó que los ratones se recuperaran durante 10 a 12 días. Después de este período de recuperación, en los ratones se inyectó 1 μ l de solución de vehículo (DMSO al 0,5%, Sigma) o BzATP 50 μ M (Sigma, preparado en DMSO al 0,5%) en cada lado del cerebro durante un
10 período de 60 segundos. Las inyecciones se realizaron usando una aguja de calibre 30 de 9 mm insertada en la cánula guía y conectada a través de un tubo a una jeringa Hamilton de 10 μ l.

- El comportamiento de los ratones individuales se evaluó usando el ensayo de natación forzada de Porsolt 24 horas después de la inyección de solución de vehículo o BzATP. Se realizó una pre-exposición de 5 minutos al ensayo 10-
15 15 minutos después de la inyección de vehículo o BzATP. El ensayo de natación forzada es un ensayo convencional que mide reducciones primarias inducidas por estrés en acciones de evasión o escape, denominado desesperanza conductual. El ensayo se usa para determinar la eficacia de antidepresivos, ensayar nuevos compuestos farmacéuticos y validar modelos animales de depresión (*Porsolt et al.*, Arch. Int. Pharmacodyn. 229 (1977), 327-336; *Porsolt*, Rev. Neurosci. 11 (2000), 53-58; *Rénier et al.*, Behav. Brain Res. 136 (2002), 521-532; *Page et al.*, Psychopharmacology 165 (2003), 194-201; *Kellihier et al.*, Psychoneuroendocrinology 28 (2003), 332-347). El ensayo consiste en poner un
20 ratón durante un período de 5 minutos en un cilindro de vidrio que contiene agua. En estas circunstancias, el ratón no puede tocar el fondo del cilindro y de esta forma se ve forzado a nadar. El tiempo, la latencia y la frecuencia de forcejeos frente a la flotación se evalúan como parámetros del comportamiento. La flotación (es decir, los movimientos realizados únicamente para mantener el equilibrio y la respiración) es un comportamiento pasivo asociado
25 con la desesperanza y representa un síntoma de tipo depresivo ya que el animal no hace ningún esfuerzo por afrontar activamente la situación que le produce estrés. Un aumento del forcejeo (es decir, intentos activos de escapar) indica un comportamiento de afrontamiento activo que podría interpretarse como una mejora de los síntomas de tipo depresivo. Por ejemplo, el tratamiento con antidepresivos serotoninérgicos reduce el tiempo total empleado en la flotación (*Borsini*, Neurosci. Biobehav. Rev. 19 (1995), 377-395; *Redrobe y Bourin*, Psychopharmacology 138 (1998), 198-
30 206, y, en paralelo, aumenta el tiempo de comportamiento activo (es decir, la natación o el forcejeo; *Lucki et al.*, Psychopharmacology 155 (2001), 315-322).

- Se descubrió que el agonista de P2X7R BzATP aumentaba los intentos activos de escape (es decir, un aumento del tiempo y frecuencia de forcejeo, y una reducción en la latencia de forcejeo) mientras que se midió una reducción
35 en el comportamiento pasivo (es decir, reducción en el tiempo y frecuencia de flotación, y aumento en la latencia de flotación) en comparación con los ratones de control a los que se les inyectó solución de vehículo (Figura 20). Los resultados observados se verificaron estadísticamente usando ensayos U de Mann-Whitney y MANOVA de una vía. Las diferencias en el tiempo de forcejeo, latencia de flotación y frecuencia de flotación se consideraron estadísticamente significativas. Aunque la latencia y la frecuencia de forcejeo y los resultados del tiempo de flotación no se soportaron
40 estadísticamente, representaban una tendencia a una mejora en el comportamiento de afrontamiento del estrés. Estos resultados demuestran que un agonista de P2X7R puede producir mejoras en síntomas de tipo depresivo.

- Como las conclusiones extraídas del ensayo de natación forzada pueden verse influenciadas por efectos no específicos de un agente o compuesto sobre la actividad animal (es decir, un aumento en el comportamiento de forcejeo
45 puede ser el resultado de hiperactividad en lugar de un aumento del comportamiento de afrontamiento activo), el efecto potencial de BzATP sobre la actividad locomotora se evaluó por el ensayo de campo abierto (Crawley "What's wrong with my mouse: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice", Wiley-Liss (2000)). Se evaluó la actividad locomotora en ratones tratados con solución de vehículo de control o BzATP 50 μ M 24 horas después de la inyección, poniendo el animal individual en una caja de madera de color gris oscuro (30x30x40 cm). Se controló la actividad
50 locomotora durante un período de 30 minutos usando una videocámara. La distancia total que recorrieron los animales durante el período de ensayo después se analizó por medio de un software informático VideoMot2 (TSE GmbH, Bad Homburg). No se midió ninguna diferencia en la actividad locomotora entre los ratones tratados con solución de vehículo de control y BzATP (Figura 21). Por lo tanto, la aplicación de BzATP no inducía hiperactividad. Estos
55 resultados confirman que la activación de P2X7R por un agente o compuesto agonista produce mejoras en síntomas de tipo depresivo y no es el resultado de un efecto inespecífico sobre la actividad animal *per se*.

- Varios informes sugieren que la activación de P2X7R puede inducir apoptosis y muerte celular *in vitro* (*Di Virgilio et al.*, Cell Death Differ. 5 (1998), 191-199, *Virginio et al.*, J. Physiol. 519 (1999), 335-346). Para ensayar si la activación de P2X7R en el hipocampo producía muerte celular, se cuantificaron los niveles de apoptosis en el cerebro
60 de los ratones tratados con BzATP. Los ratones se sacrificaron al final de los experimentos de comportamiento, los cerebros se retiraron, se congelaron inmediatamente y se seccionaron en cortes de 16 μ m. Las secciones cerebrales después se estudiaron con respecto a la apoptosis usando un sistema TUNEL fluorométrico DeadEnd de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Promega Corporation). El sistema TUNEL mide el ADN fragmentado de células apoptóticas. El control positivo del ensayo se realiza por pre-tratamiento de secciones cerebrales durante 10 minutos
65 con 1 unidad/ml de DNasa I.

Se observaron muy pocas células apoptóticas (es decir, menos de una células por sección cerebral) en cerebros de ratones tratados con vehículo de control o con el agonista de P2X7R (Figura 22) en comparación con las secciones

de control positivo pretratadas con DNAsa. Además, no se observó ninguna diferencia significativa en el número de células apoptóticas entre los animales de control y los ratones tratados con BzATP, lo que indica que la activación de P2X7R no daba como resultado muerte celular cerebral *in vivo*.

5 Ejemplo 10

Los antagonistas de P2X7R no tienen efectos antidepresivos

10 Se administraron antagonistas de P2X7R KN-62 (1-(N,O-bis[5-isoquinolinasulfonil]-N-metil-L-tirosil)-4-fenilpiperazina) y ATP oxidado (oATP) a ratones DBA/2O1a (Harlan Winkelmann, Alemania) que presentan las características de comportamiento de una alta ansiedad. Se ha demostrado que KN-62 es un antagonista no competitivo de P2X7R (Chessel *et al.*, Brit. J. Pharmacol., 124 (1998), 1314-1320) mientras que oATP actúa como un inhibidor irreversible de P2X7R (Chen *et al.*, J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203).

15 En el presente ejemplo, los antagonistas de P2X7R se inyectaron directamente en la región del giro dentado del hipocampo. En resumen, a ratones macho de tres meses de edad se les implantó bilateralmente una cánula guía (calibre 23, longitud 8 mm) por medio de un instrumento estereotáctico (David Kopf instruments). Las coordenadas, en relación al bregma, fueron 1,5 mm posterior, $\pm 1,0$ mm lateral y -0,8 mm ventral. Se dejó que los ratones se recuperaran durante 10 a 13 días después de la cirugía. Después de este período de recuperación, a los ratones se les inyectó 1 μ l de solución de vehículo (0,01% de DMSO, Sigma) o KN-62 100 nM (Sigma, preparado en DMSO al 0,01%) u oATP 20 10 μ M (Sigma, preparado en PBS) en cada lado del cerebro durante un período de 60 segundos. Todas las inyecciones se realizaron usando una aguja de calibre 31 de 9 mm insertada en la cánula guía y conectada a través de un tubo a una jeringa Hamilton de 10 μ l.

25 El comportamiento de los ratones individuales se evaluó usando un ensayo de natación forzada de Porsolt 24 después de la inyección de solución de vehículo, KN-62 u oATP. Se realizó una pre-exposición de 5 minutos al ensayo 15-17 minutos después de la administración de vehículo, KN-62 u oATP. En el ejemplo 9 se proporciona una descripción del ensayo de natación forzada de Porsolt. En el presente ejemplo, no se midió ningún cambio en los intentos activos de escape (es decir, tiempo, frecuencia o latencia de forcejeo) ni en el comportamiento pasivo (es decir, tiempo, 30 frecuencia o latencia de flotación) entre los ratones tratados con vehículo, KN-62 u oATP (Figura 23). Los resultados observados se verificaron estadísticamente usando un ensayo MANOVA de una vía. Las diferencias observadas en los diferentes parámetros entre los ratones tratados con vehículo, KN-62 u oATP no se confirmaron estadísticamente. Estos resultados demuestran que los antagonistas de P2X7R no mejoran los síntomas de tipo depresivo y no tienen acción antidepresiva.

35 Como las conclusiones extraídas del ensayo de natación forzada pueden verse influenciadas por efectos no específicos de un agente o compuesto sobre la actividad animal (es decir, el aumento en el comportamiento de forcejeo puede ser el resultado de una hiperactividad en lugar de un mayor comportamiento de afrontamiento activo), se evaluó el efecto potencial del antagonista de P2X7R oATP sobre la actividad locomotora realizando el ensayo de campo abierto. Se evaluó la actividad locomotora en ratones tratados con solución de vehículo de control, oATP 10 μ M u oATP 40 50 μ M 15 minutos después de la inyección poniendo el animal individual en una caja de madera de color gris oscuro (30x30x40 cm). La actividad locomotora se controló durante un período de 30 minutos usando una videocámara. La distancia total que recorrieron los animales durante el período de ensayo después se analizó por medio de un software informático VideoMot2 (TSE GmbH, Bad Homburg). No se midió ninguna diferencia en la actividad locomotora 45 entre los ratones tratados con solución de vehículo de control y oATP (Figura 24). Por lo tanto, la aplicación de un antagonista de P2X7R no inducía hipo- o hiperactividad en los animales.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agonista del canal iónico de apertura por ATP P2X7R para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno afectivo.

2. El uso de la reivindicación 1, donde dicho agonista se selecciona del grupo que consiste en ATP, ATP-4 y BzQATP (2'-3'-O-(4-benzoilbenzoil)adenosina 5'-trifosfato (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)).

3. Uso de tenidap (C₁₅H₁₁ClN₂O₂S) ó 3-sustituidas-2-oxindol-1-carboxamidas para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno afectivo.

4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha composición farmacéutica comprende opcionalmente, además, un mediador del receptor β -adrenérgico.

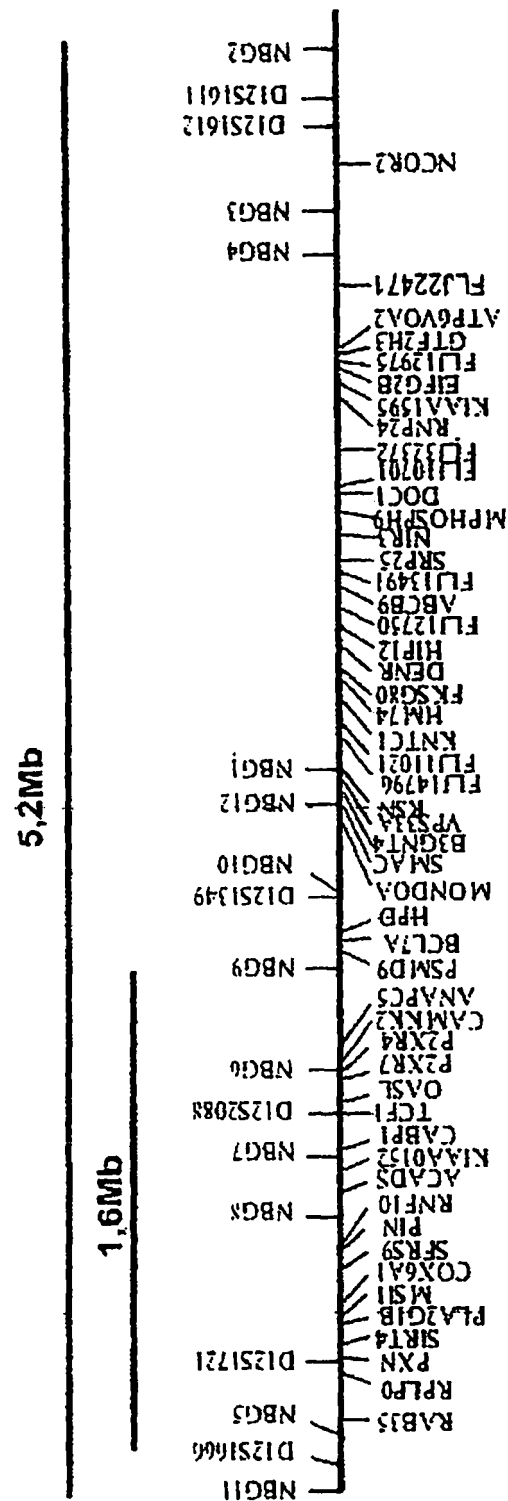
5. El uso de la reivindicación 4, donde dicho modulador del receptor β -adrenérgico es un antagonista del receptor β -adrenérgico, seleccionado del grupo que consiste en DL-propanolol, D-propanolol y labetolol.

6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho trastorno afectivo se selecciona del grupo que consiste en depresión principal, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno bipolar.

7. El uso de la reivindicación 6, donde dicha depresión principal se selecciona del grupo que consiste en depresión principal, distimia, depresión atípica, trastorno disfórico premenstrual y trastorno afectivo de la época.

8. El uso de la reivindicación 6, donde dicho trastorno de ansiedad generalizada se selecciona del grupo que consiste en trastorno de pánico, fobias, agorafobia, fobia social, fobia específica, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés post-traumático, trastorno de ansiedad de separación, manía, hipomanía y trastorno ciclotímico.

9. El uso de la reivindicación 6, donde dicho trastorno bipolar es un trastorno bipolar de tipo I o trastorno bipolar de tipo II.



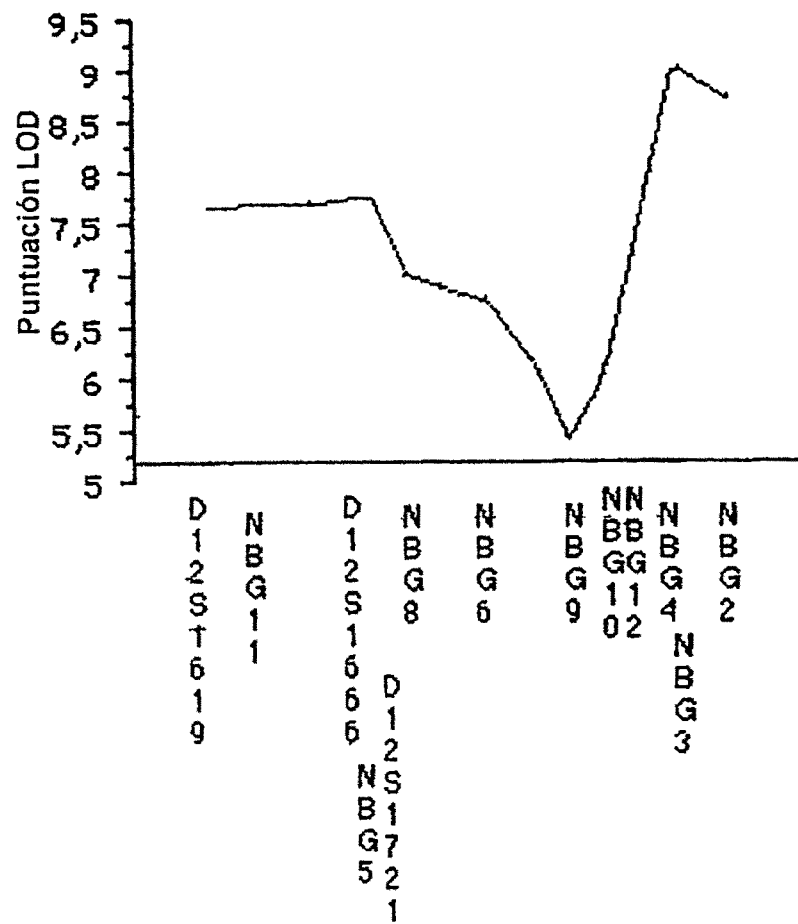


Figura 1b

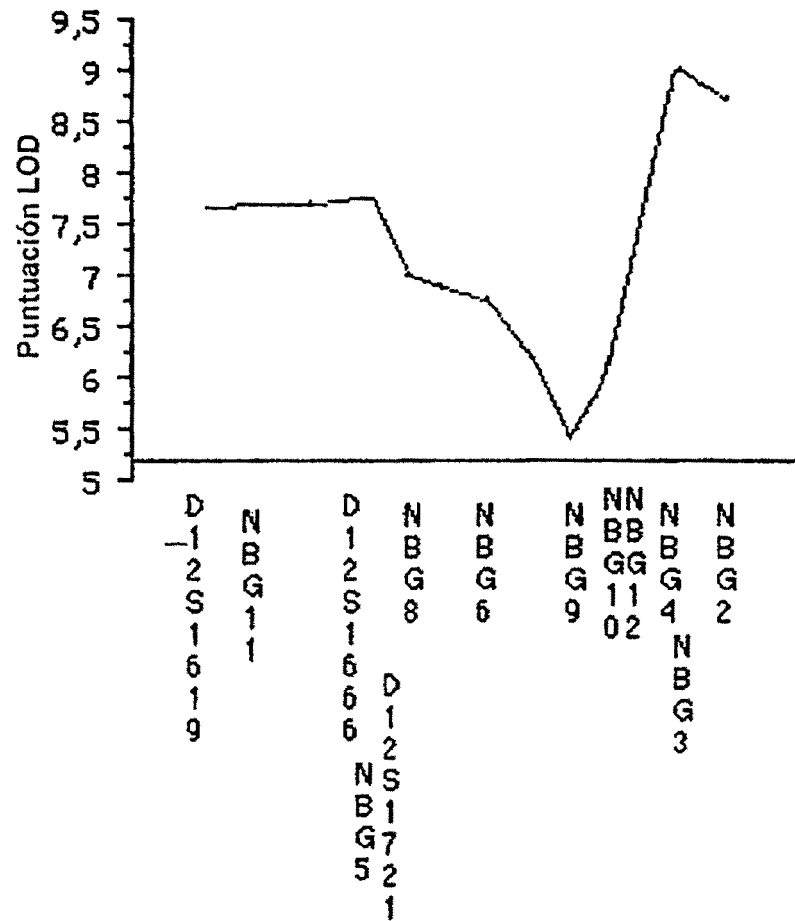


Figura 1c

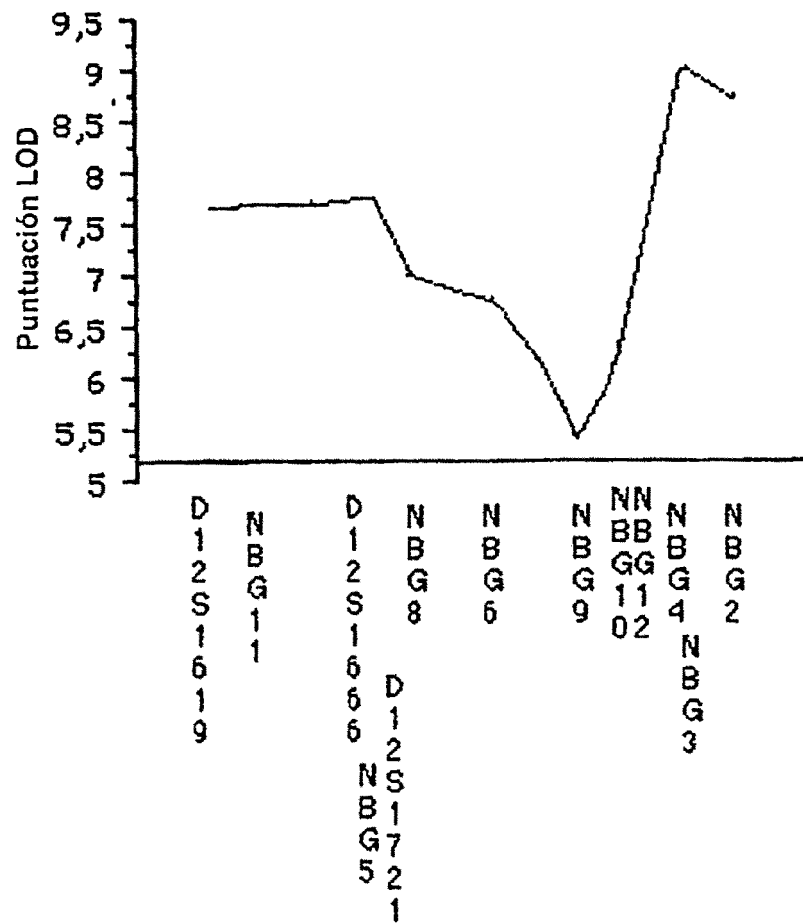


Figura 1d

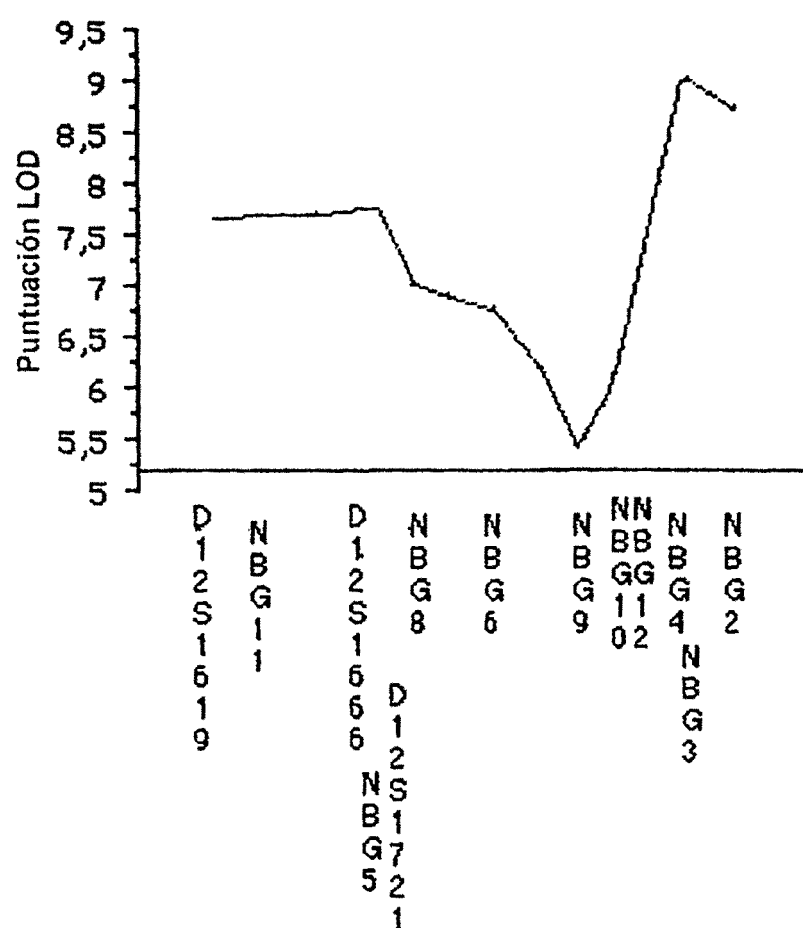


Figura 1e

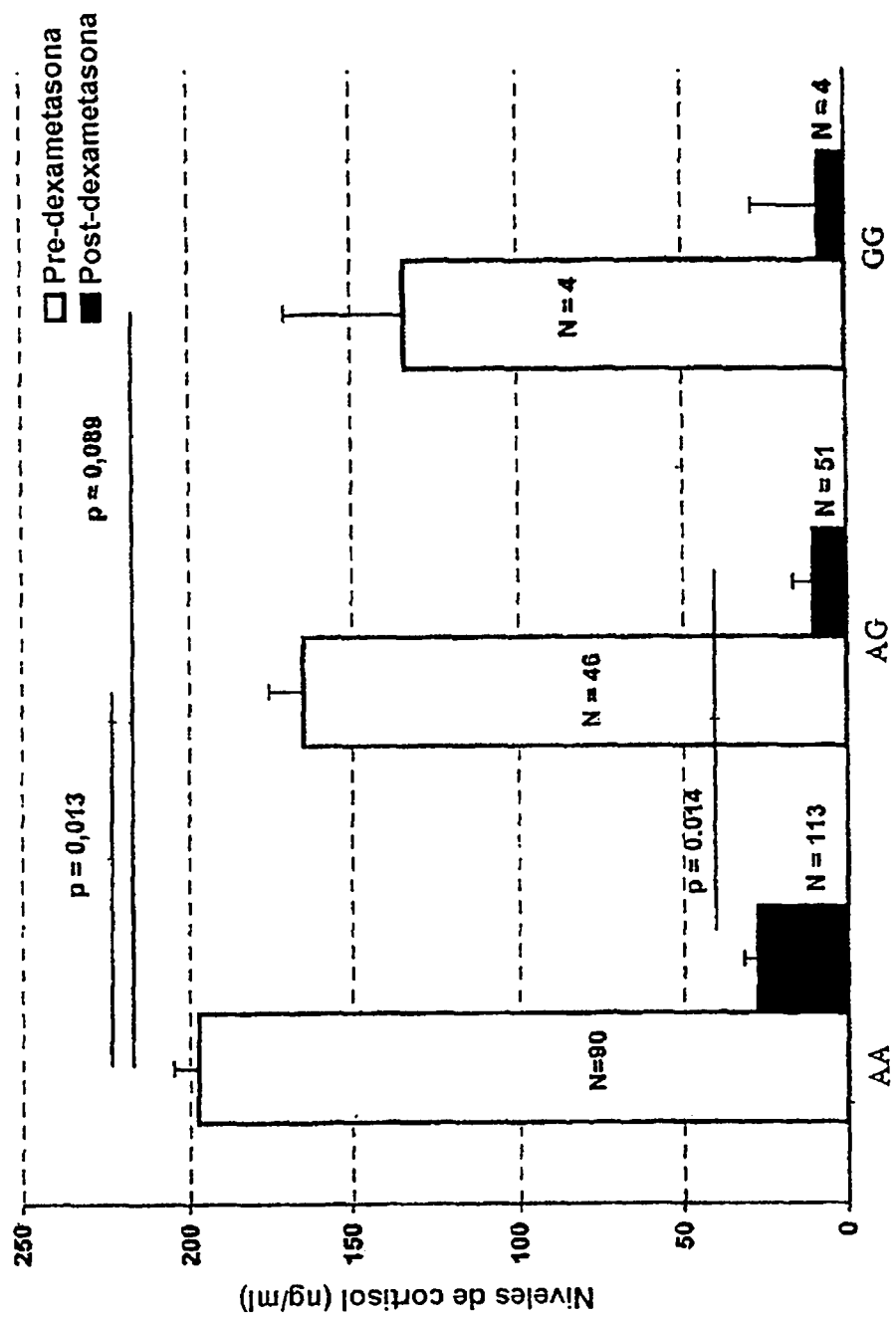


Figura 1f

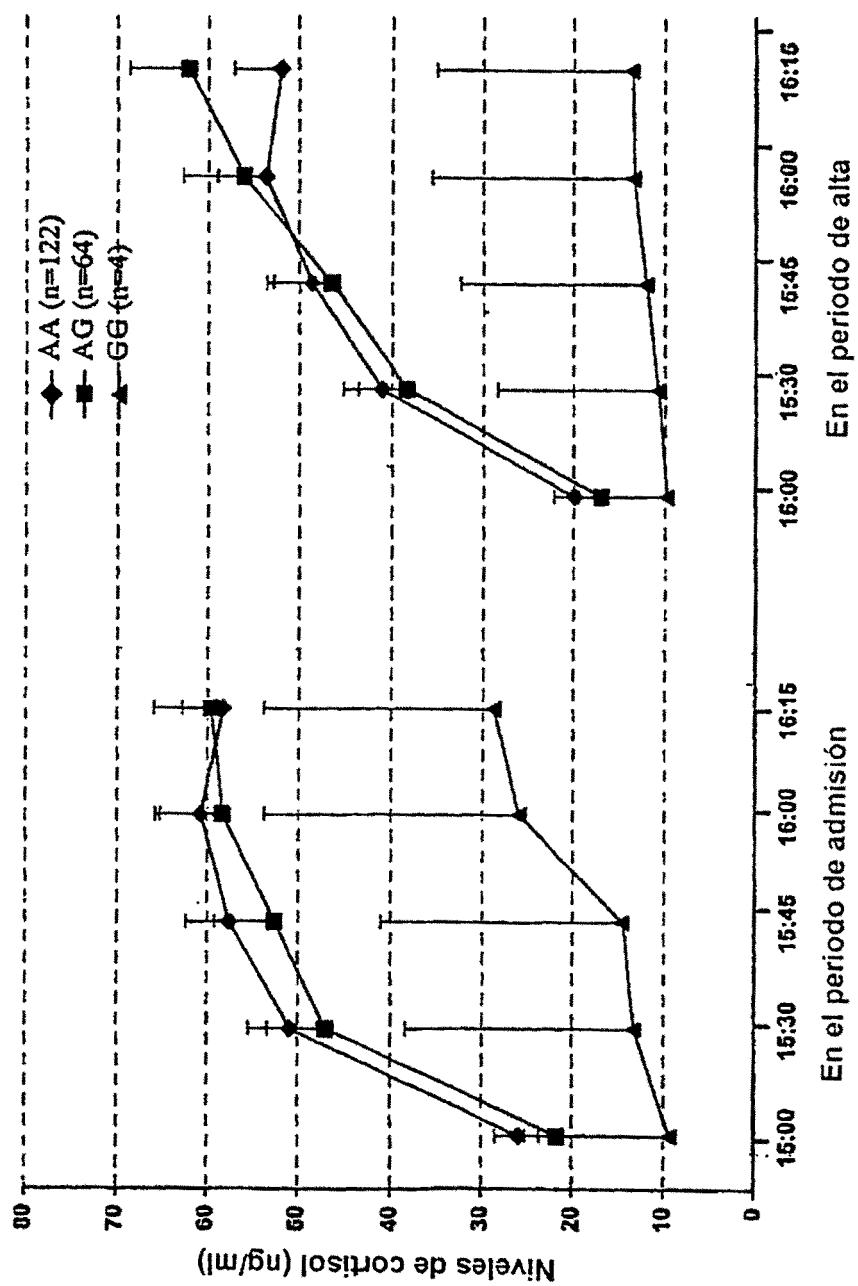


Figura 1g

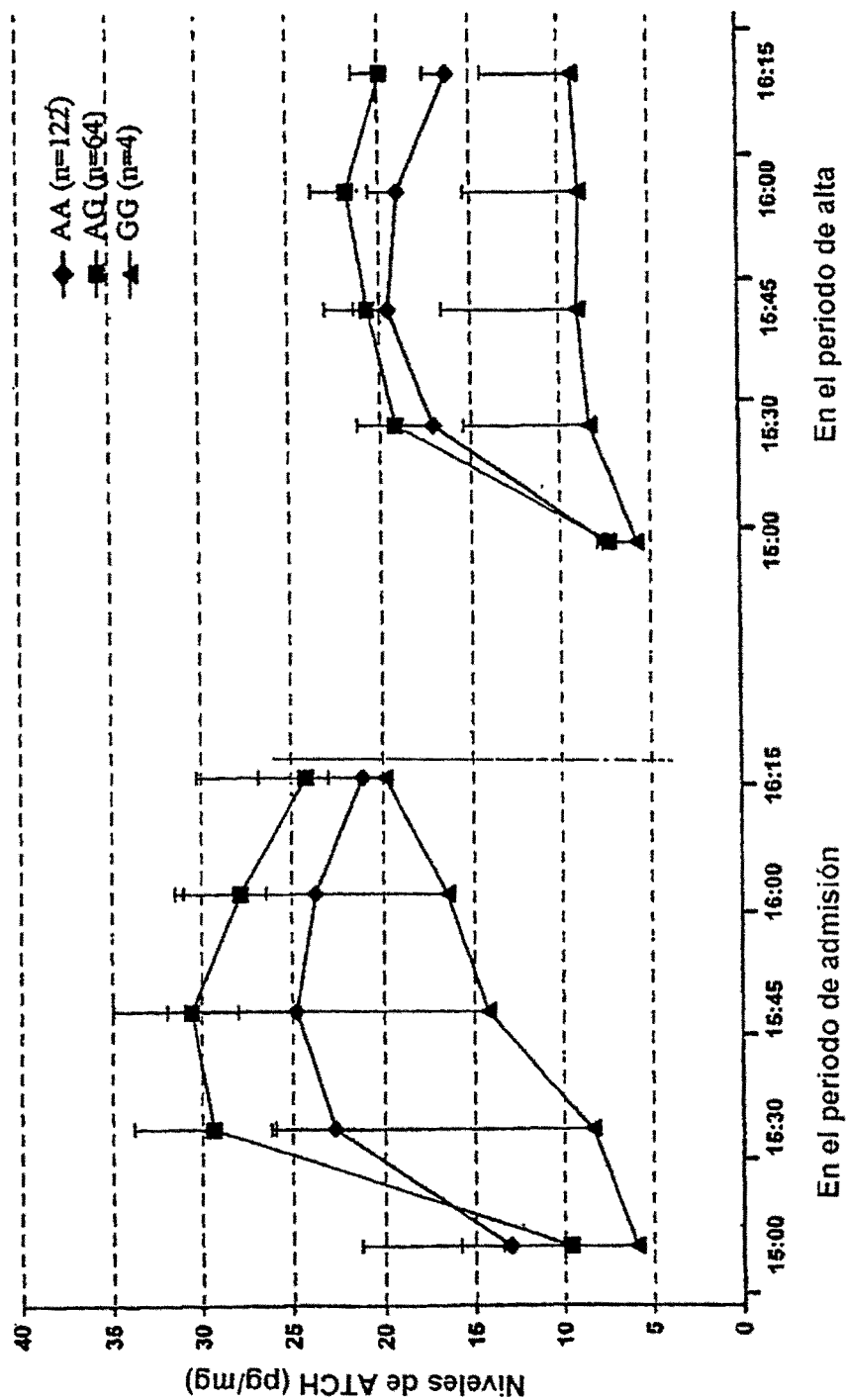


Figura 1h

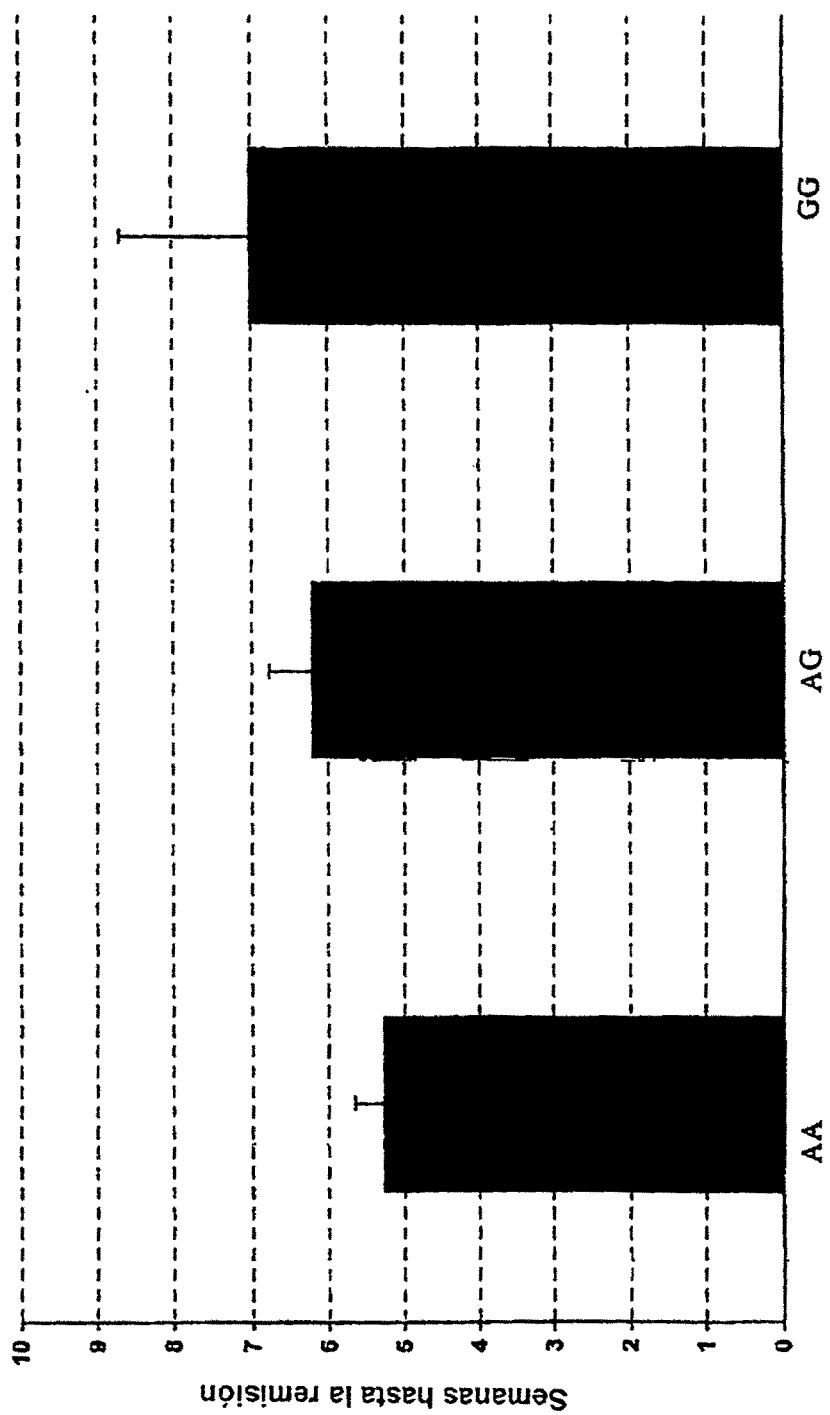


Figura 1i

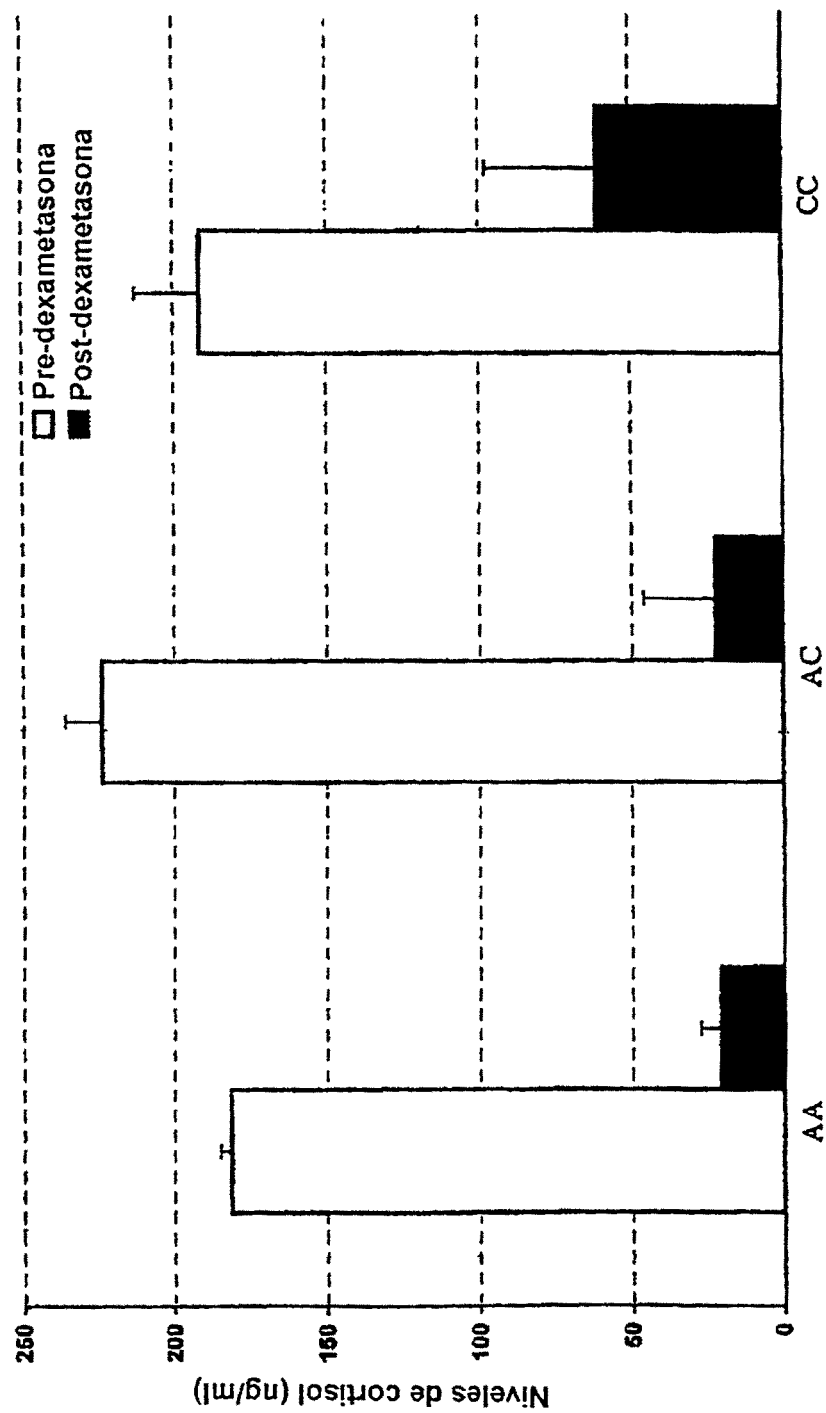


Figura 1j

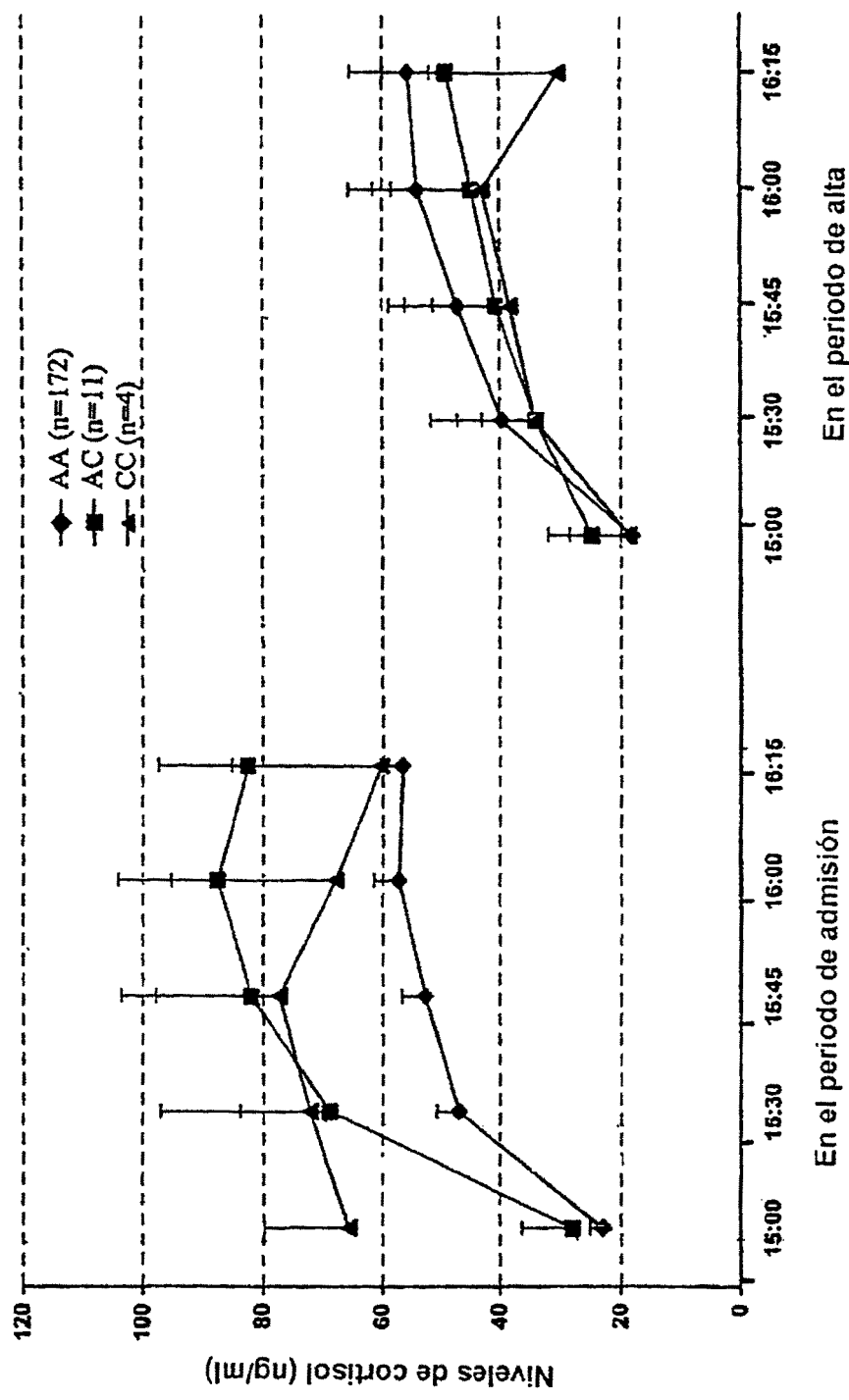


Figura 1k

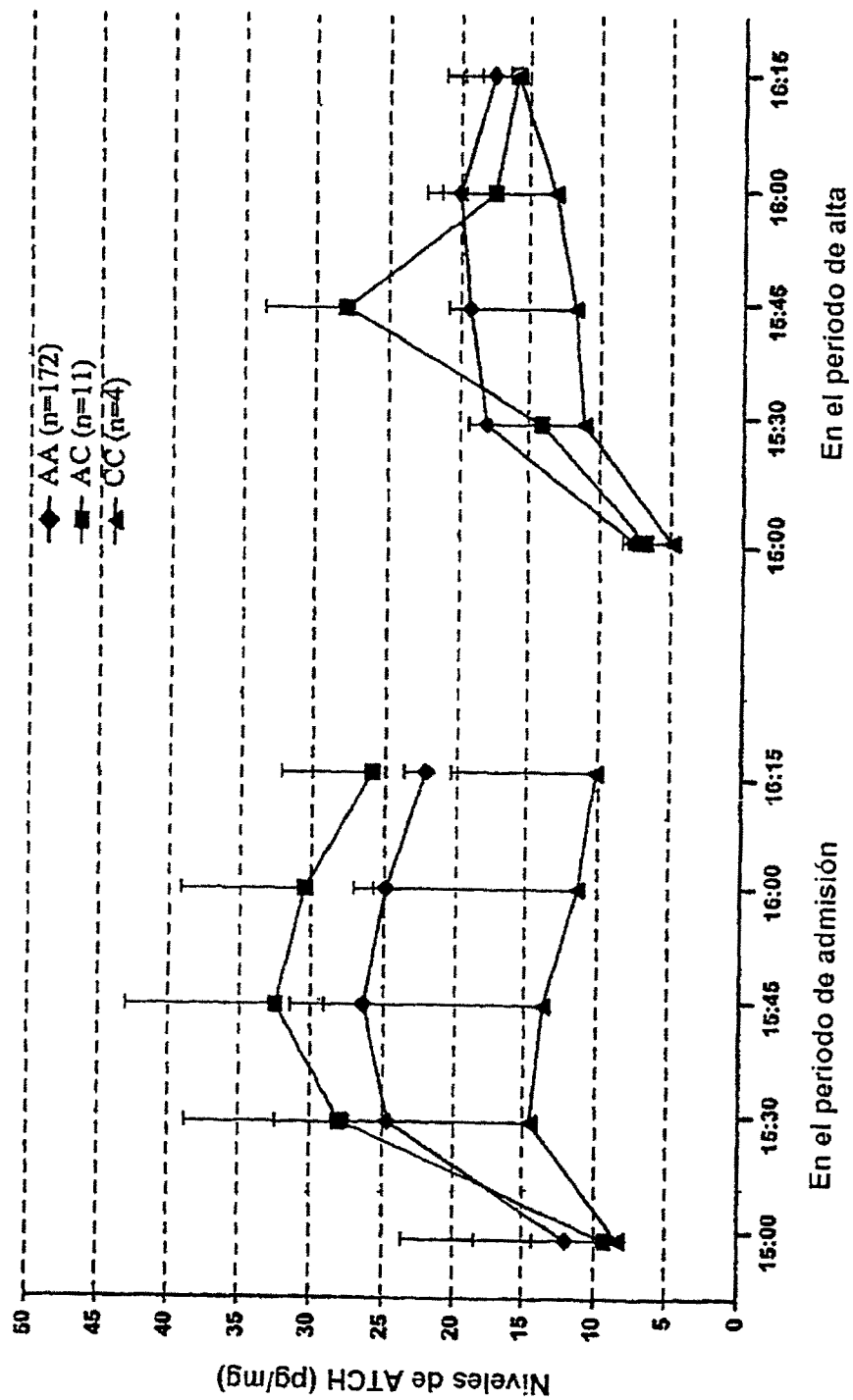


Figura 11

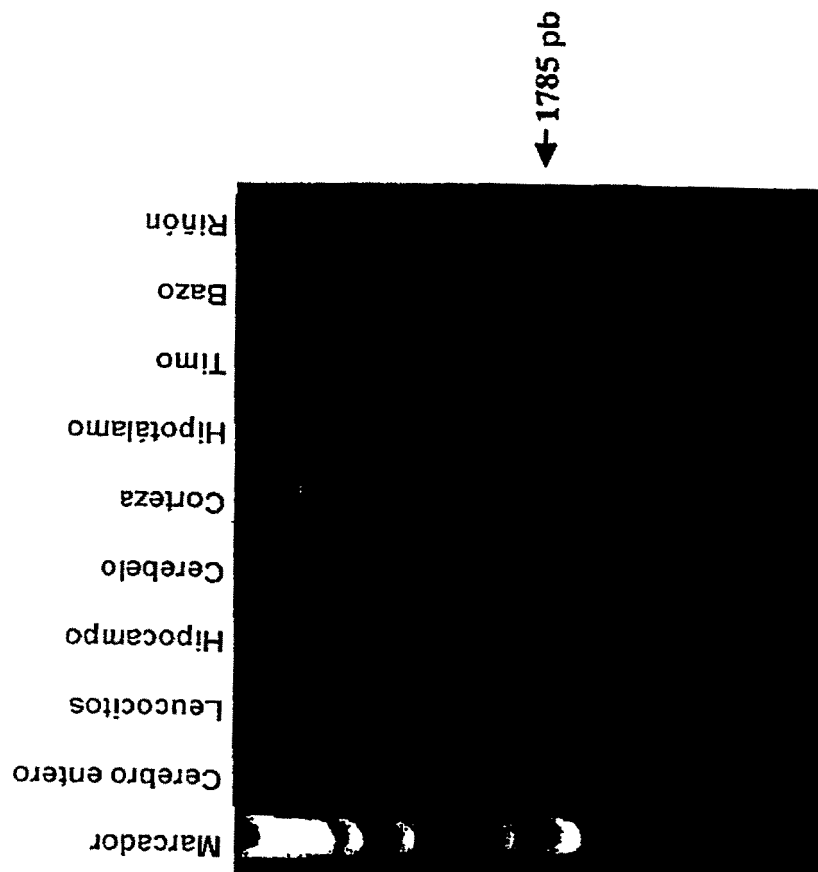


Figura 2

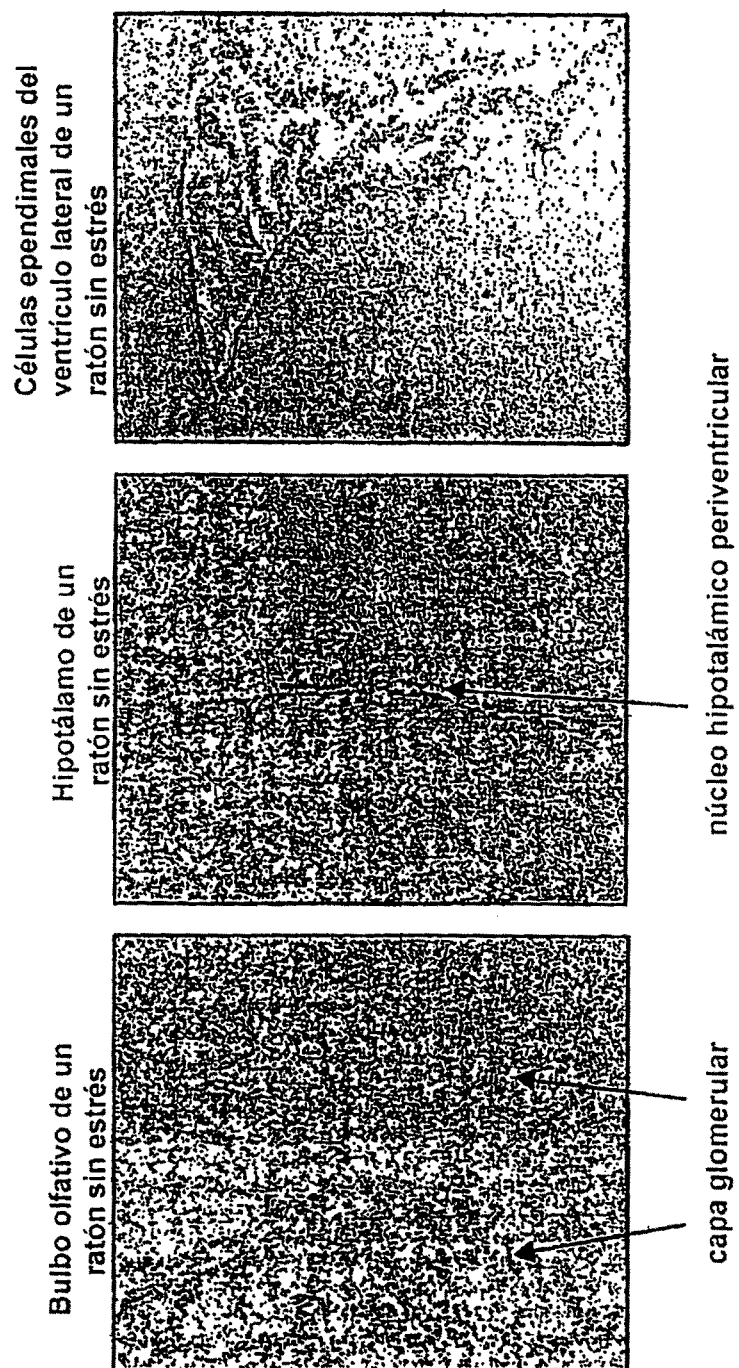


Figura 3

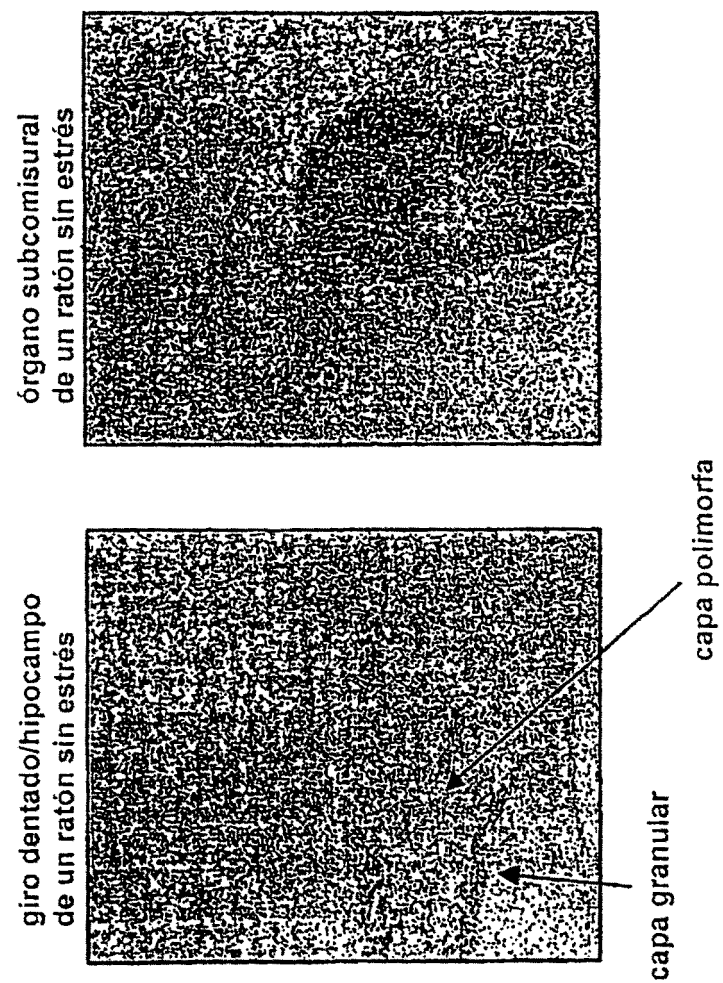


Figura 4

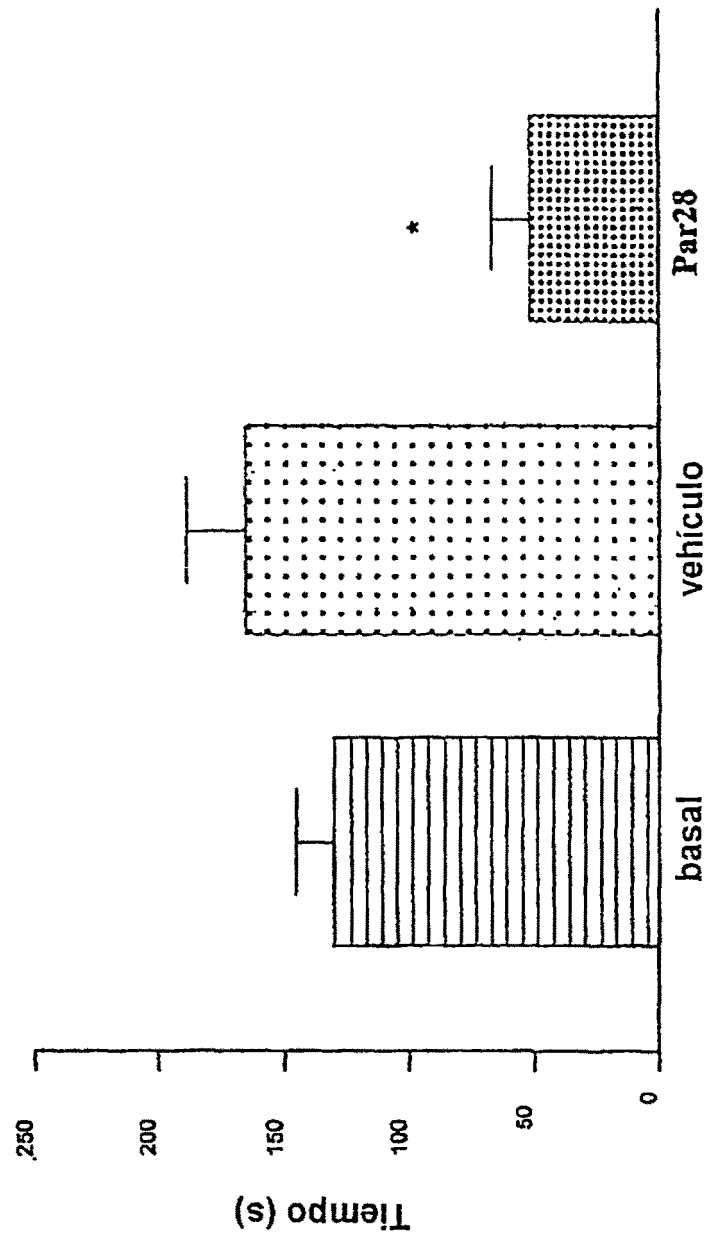


Figura 5

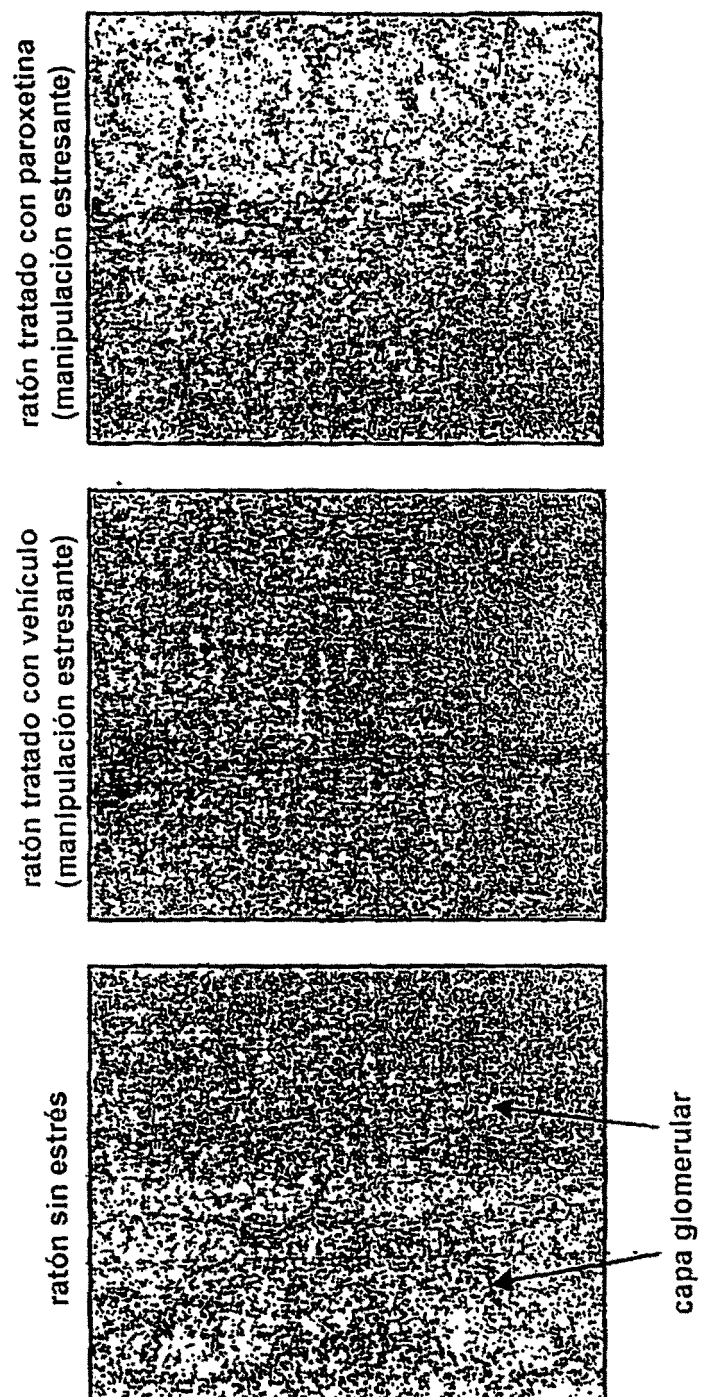


Figura 6

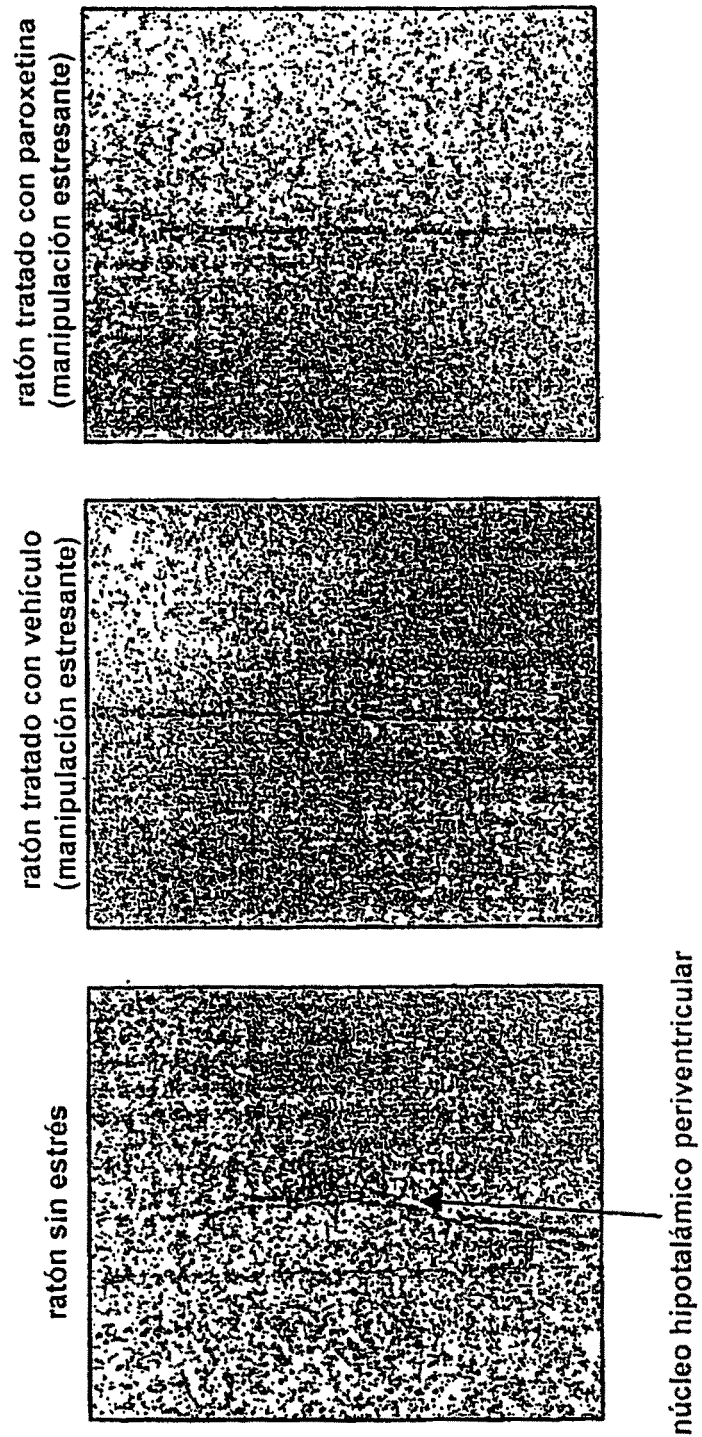


Figura 7

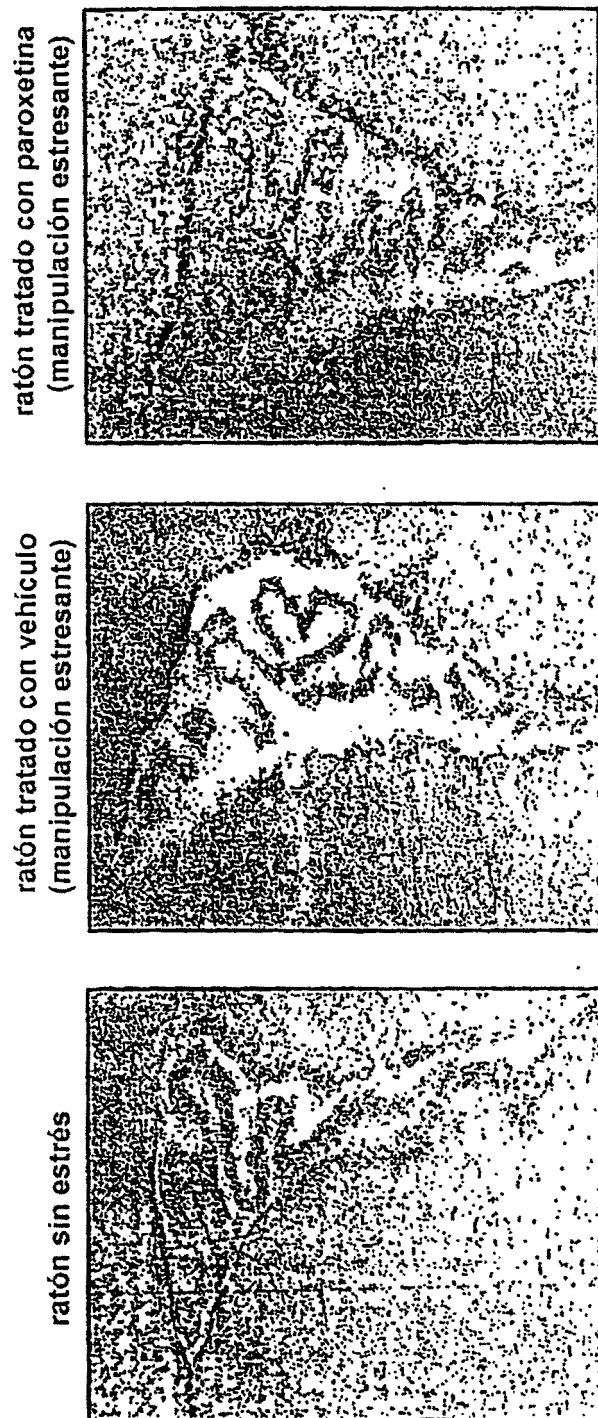


Figura 8



Figura 9

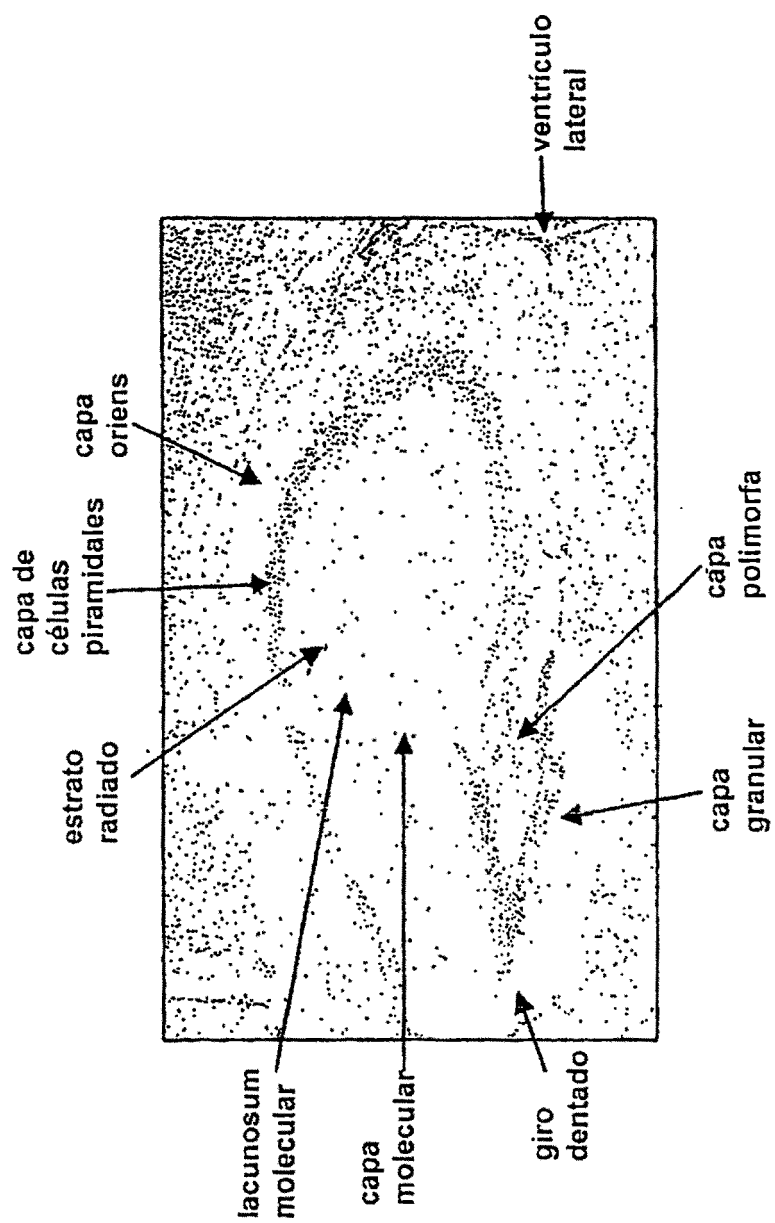


Figura 10

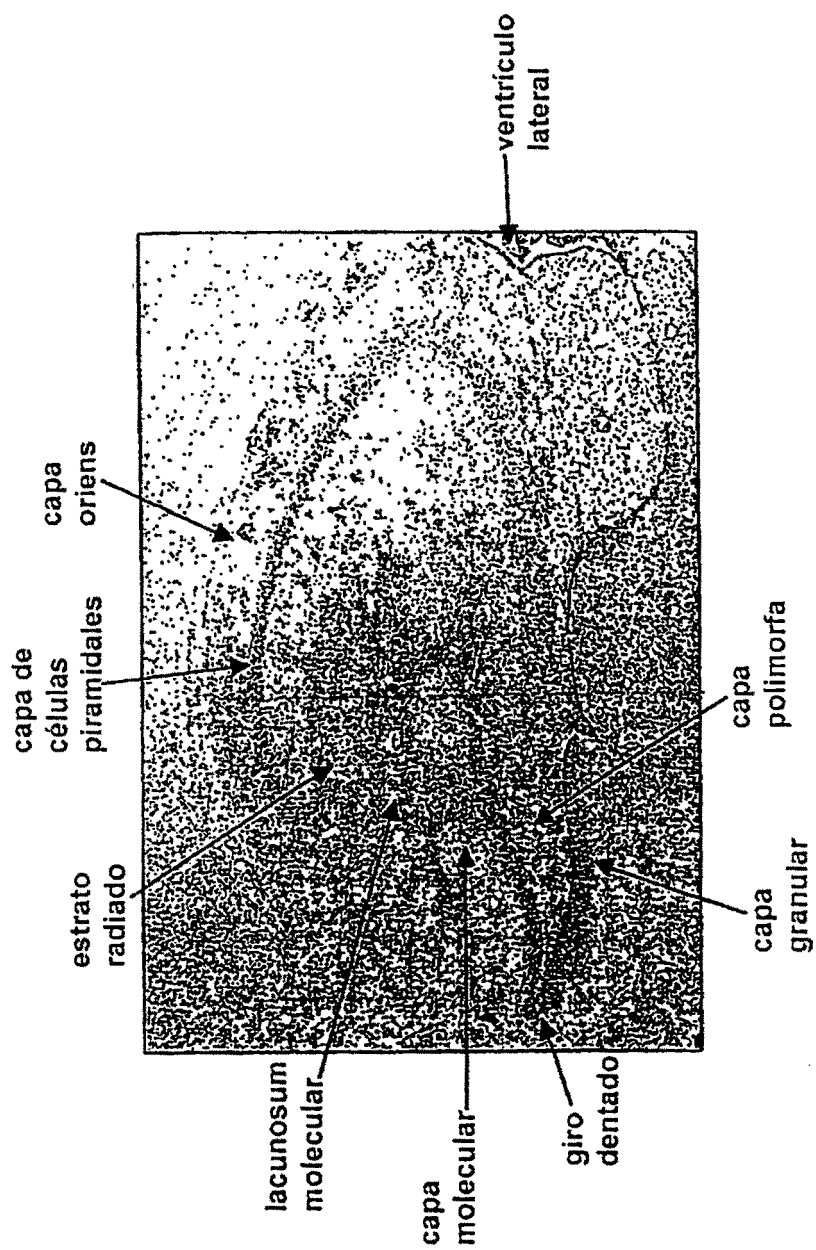


Figura 11

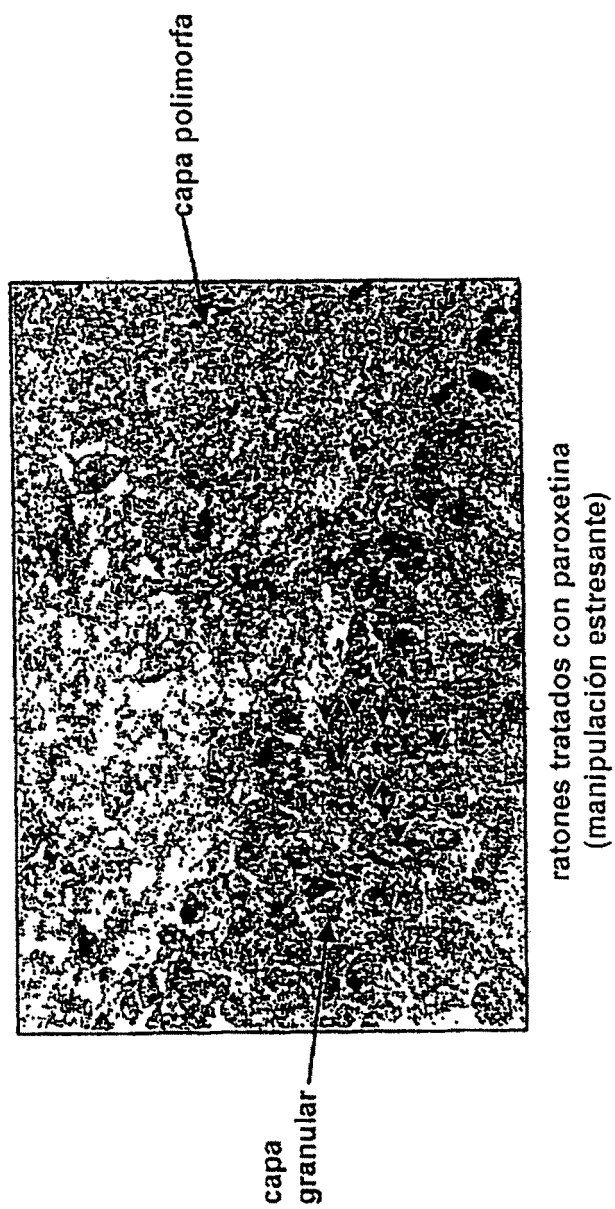


Figura 12

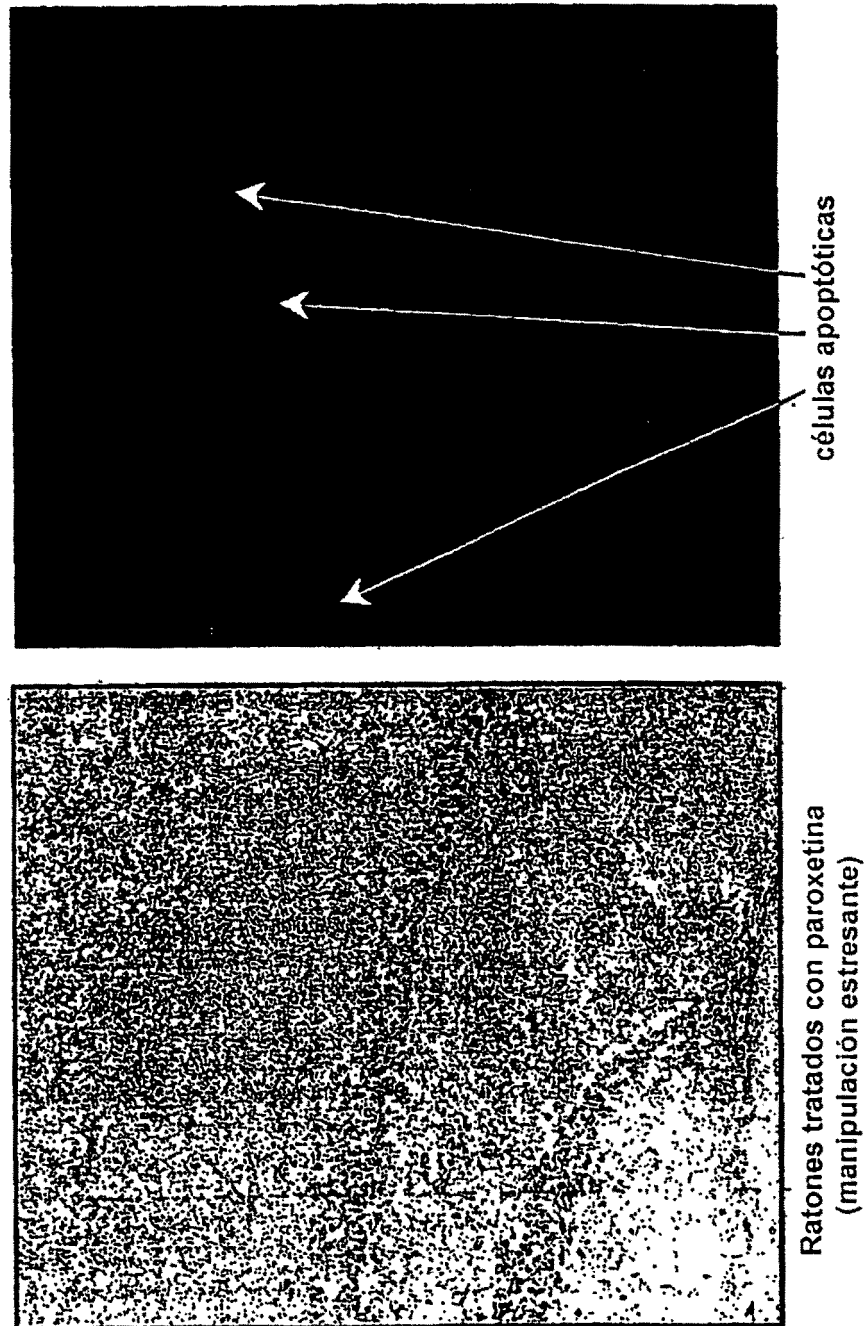


Figura 13

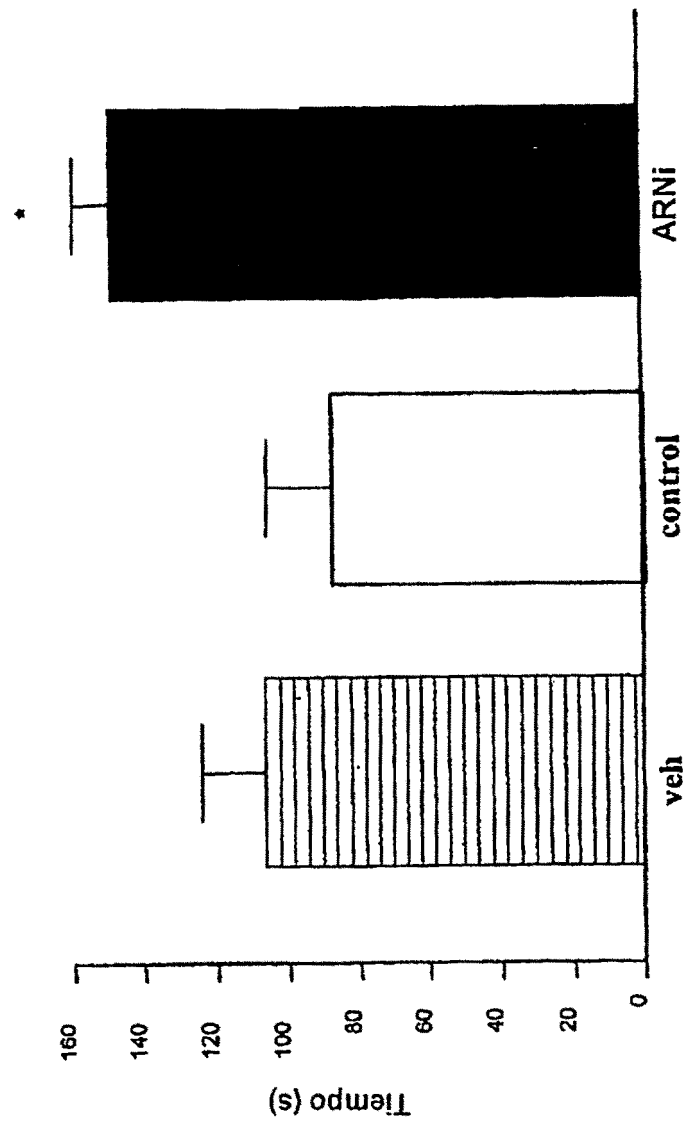


Figura 14

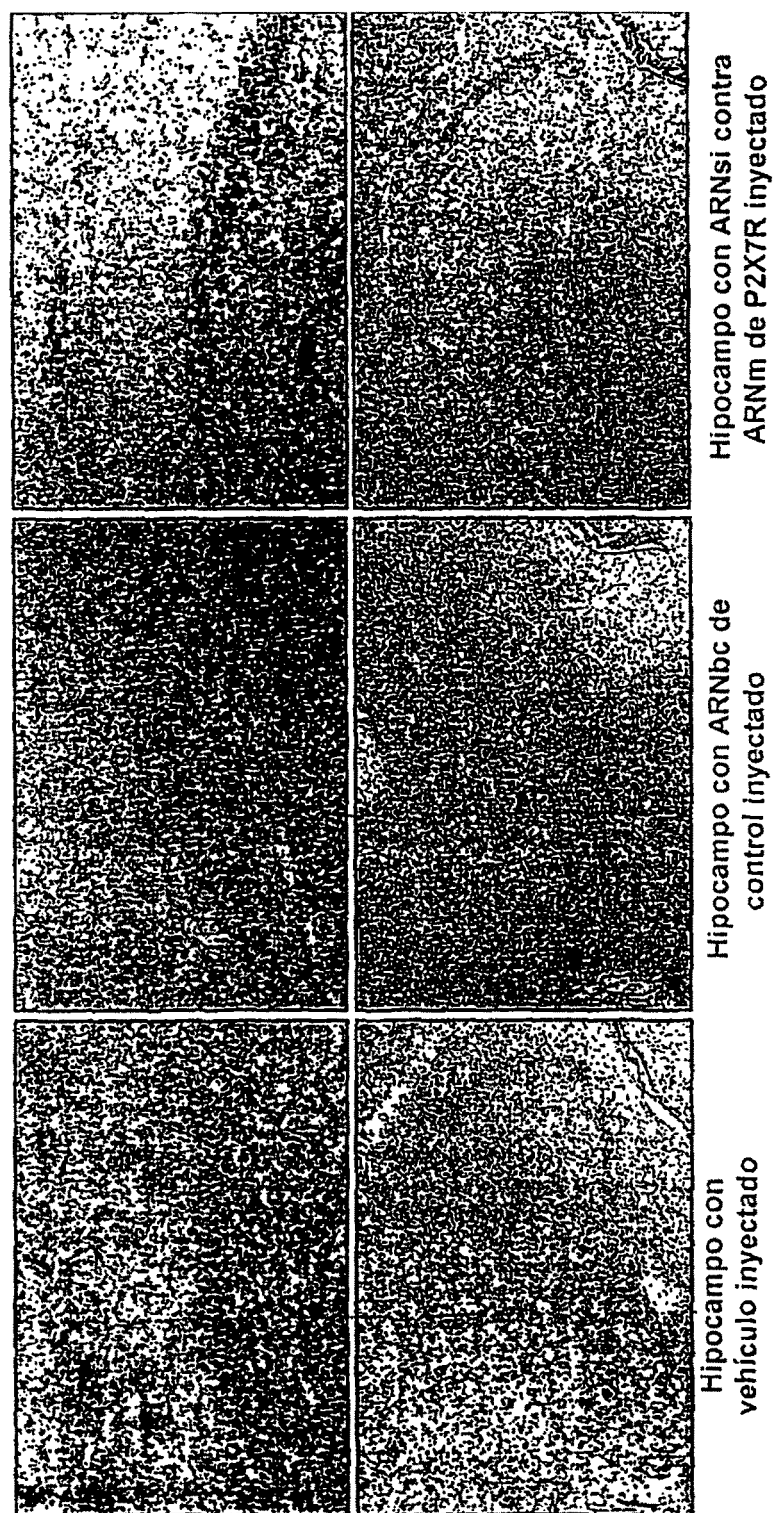


Figura 15

```

P2X7v01 MPACCS DVFQYETNKVTRI QSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v04 MPPVD-----APCLPFS---FALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v02 MPACCS DVFQYETNKVTRI QSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v03 MPACCS DVFQYETNKVTRI QSMNYGTIKWFFHVII FSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
          1.....10.....20.....30.....40.....50
P2X7v01 VHTKVKGIAEVKEEIVENG VKKLVHSVFDTADYTFPLQGN SFFVMTN FLKTEGQEQR LCP
P2X7v04 VHTKVKGIAEVKEEIVENG VKKLVHSVFDTADYTFPLQGN SFFVMTN FLKTEGQEQR LCP
P2X7v02 VHTKVKGIAEVKEEIVENG VKKLVHSVFDTADYTFPLQGN SFFVMTN FLKTEGQEQR LCP
P2X7v03 VHTKVKGIAEVKEEIVENG VKKLVHSVFDTADYTFPLQGN SFFVMTN FLKTEGQEQR LCP
          61.....70.....80.....90.....100.....110

```

Figura 16a

```

P2X7v01 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVCVVHEGNQKTCEVSANWCPIEAVEEAPRPA
P2X7v04 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVCVVHEGNQKTCEVSANWCPIEAVEEAPRPA
P2X7v02 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGLLS-----
P2X7v03 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVCVVHEGNQKTCEVSANWCPIEAVEEAPRPA
          121.....130.....140.....150.....160.....170

P2X7v01 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILLPGLNITCTFFHKTONPQCPIFRLGDI FRETGD
P2X7v04 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILLPGLNITCTFFHKTONPQCPIFRLGDI FRETGD
P2X7v02 -----
P2X7v03 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILLPGLNITCTFFHKTONPQCPIFRLGDI FRETGD
          181.....190.....200.....210.....220.....230

```

Figura 16b

P2X7v01 NFSDVAIQGGIMGIEIYWDCNLD RWFHHC PKYSFRRLLDDKTTNVSLYPGYNFRYAKYYK
P2X7v04 NFSDVAIQGGIMGIEIYWDCNLD RWFHHC PKYSFRRLLDDKTTNVSLYPGYNFRYAKYYK
P2X7v02 -----
P2X7v03 NFSDVAIQGGIMGIEIYWDCNLD RWFHHC PKYSFRRLLDDKTTNVSLYPGYNFRYAKYYK
241.....250.....260.....270.....280.....290

P2X7v01 ENNVEKRRTLIKVF GIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVYIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSS
P2X7v04 ENNVEKRRTLIKVF GIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVYIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSS
P2X7v02 -----
P2X7v03 ENNVEKRRTLIKVF GIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVYIGSTLSYFGLVSRDLSLFGKWF
301.....310.....320.....330.....340.....350

Figura 16c

```

P2X7v01  NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYYVSFVDESHIRMVNQQLLGRS
P2X7v04  NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYYVSFVDESHIRMVNQQLLGRS
P2X7v02  +-----
P2X7v03  EGSD-----
          361.....370.....380.....390.....400.....410

P2X7v01  LQDVKGQEVPRPAMDFDLSRLPLALHDTFPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v04  LQDVKGQEVPRPAMDFDLSRLPLALHDTFPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v02  -----
P2X7v03  -----
          421.....430.....440.....450.....460.....470

```

Figura 16d

P2X7v01	SCLPSQLPESHRCLEELCCRKKPGACITTSELFVKLVLSRHVLQFLLLYQEPLALDVS
P2X7v04	SCLPSQLPESHRCLEELCCRKKPGACITTSELFVKLVLSRHVLQFLLLYQEPLALDVS
P2X7v02	-----
P2X7v03	-----
	481.....490.....500.....510.....520.....530
P2X7v01	TNSRLRHCAYRCYATWRFSGQDMADFAILPSCCRWRIRKEFPKSEGYSGFKSPY
P2X7v04	TNSRLRHCAYRCYATWRFSGQDMADFAILPSCCRWRIRKEFPKSEGYSGFKSPY
P2X7v02	-----
P2X7v03	-----
	541.....550.....560.....570.....580.....590

Figura 16e

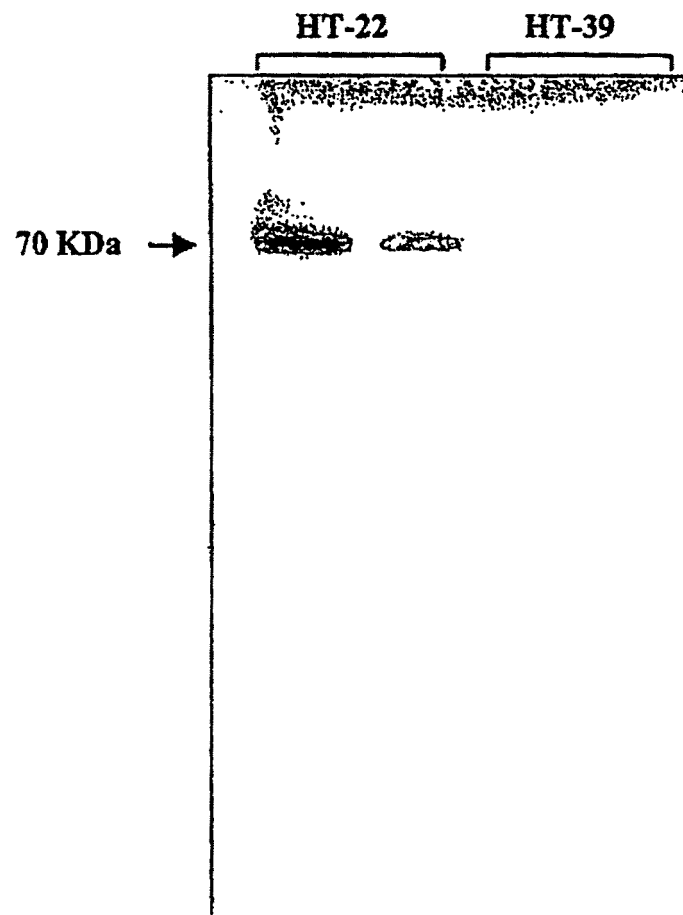


Figura 17

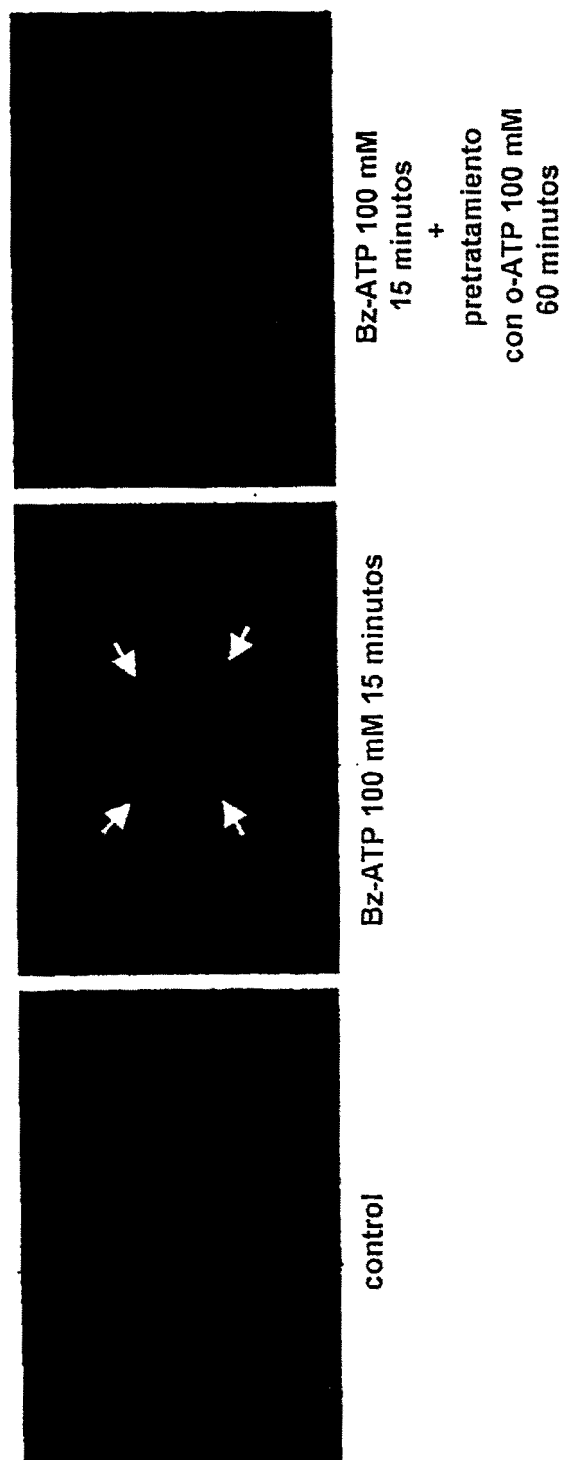


Figura 18

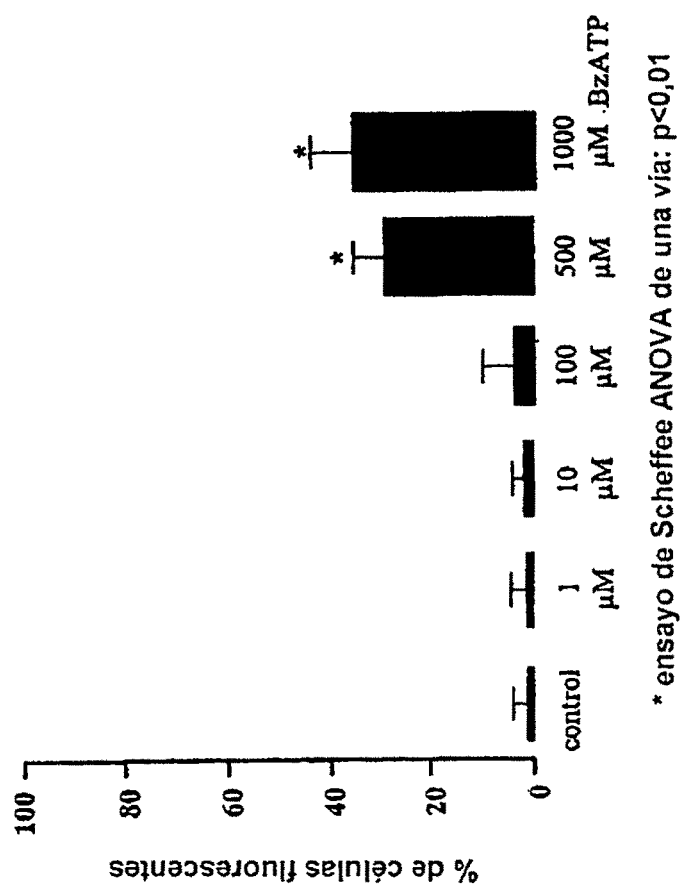


Figura 19a.

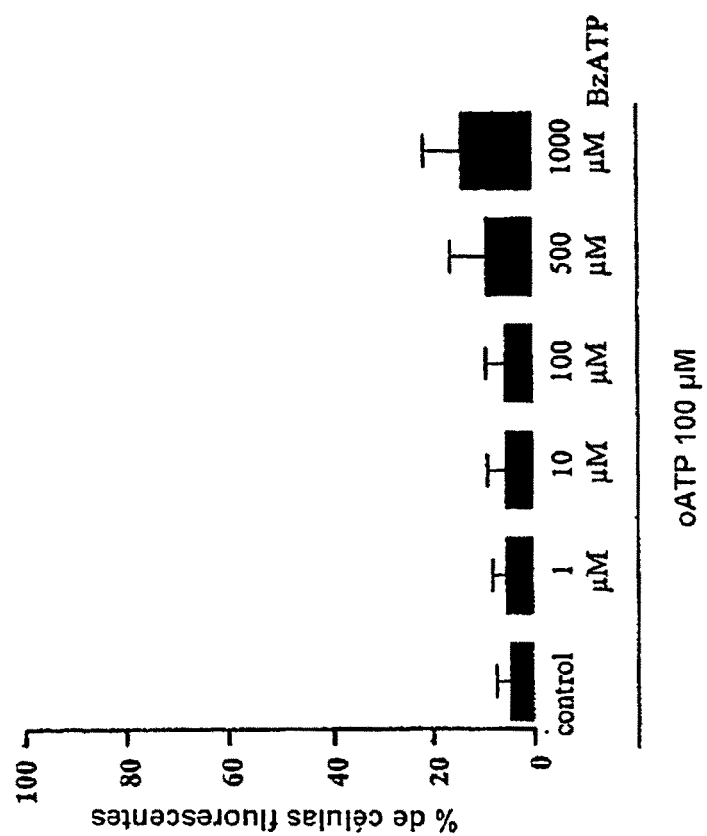


Figura 19b

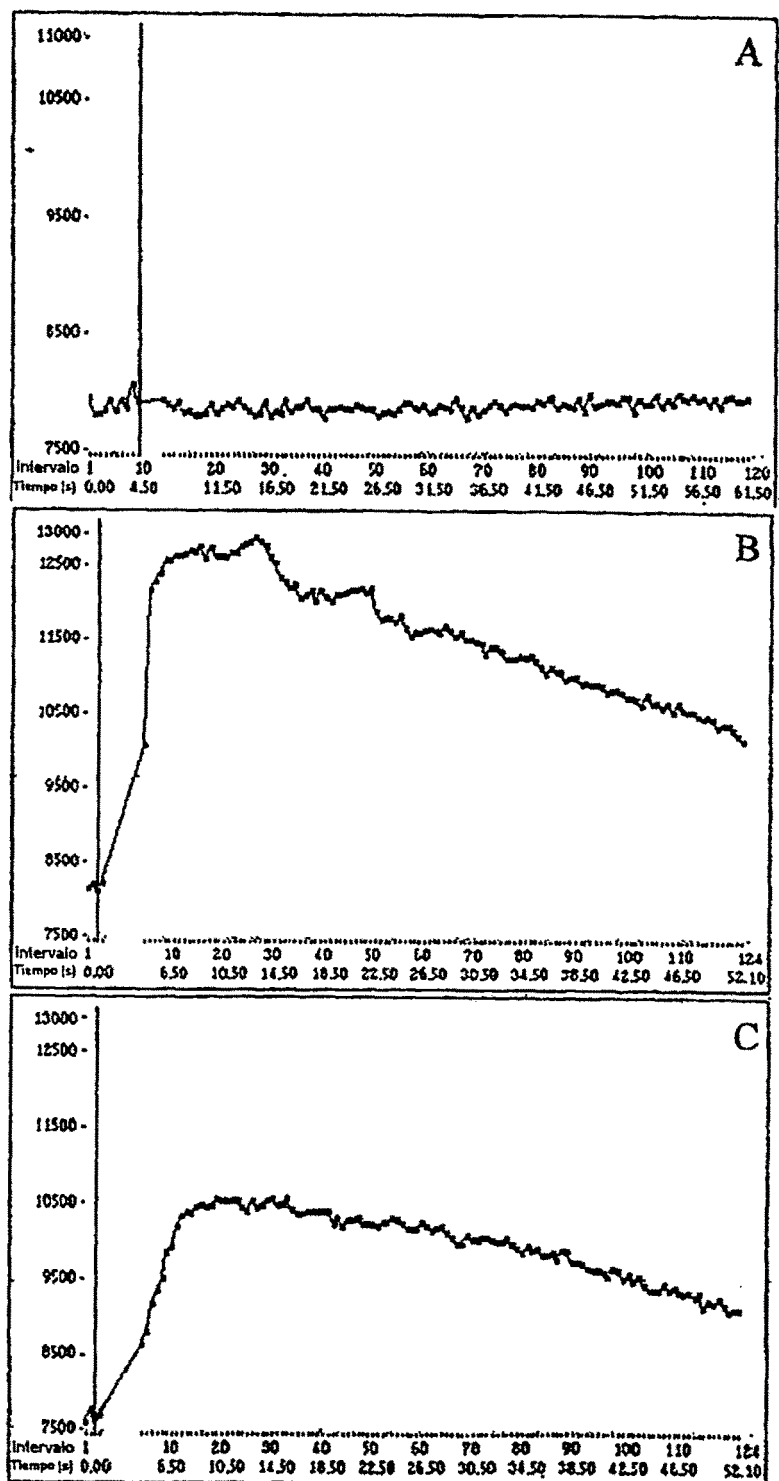


Figura 19c

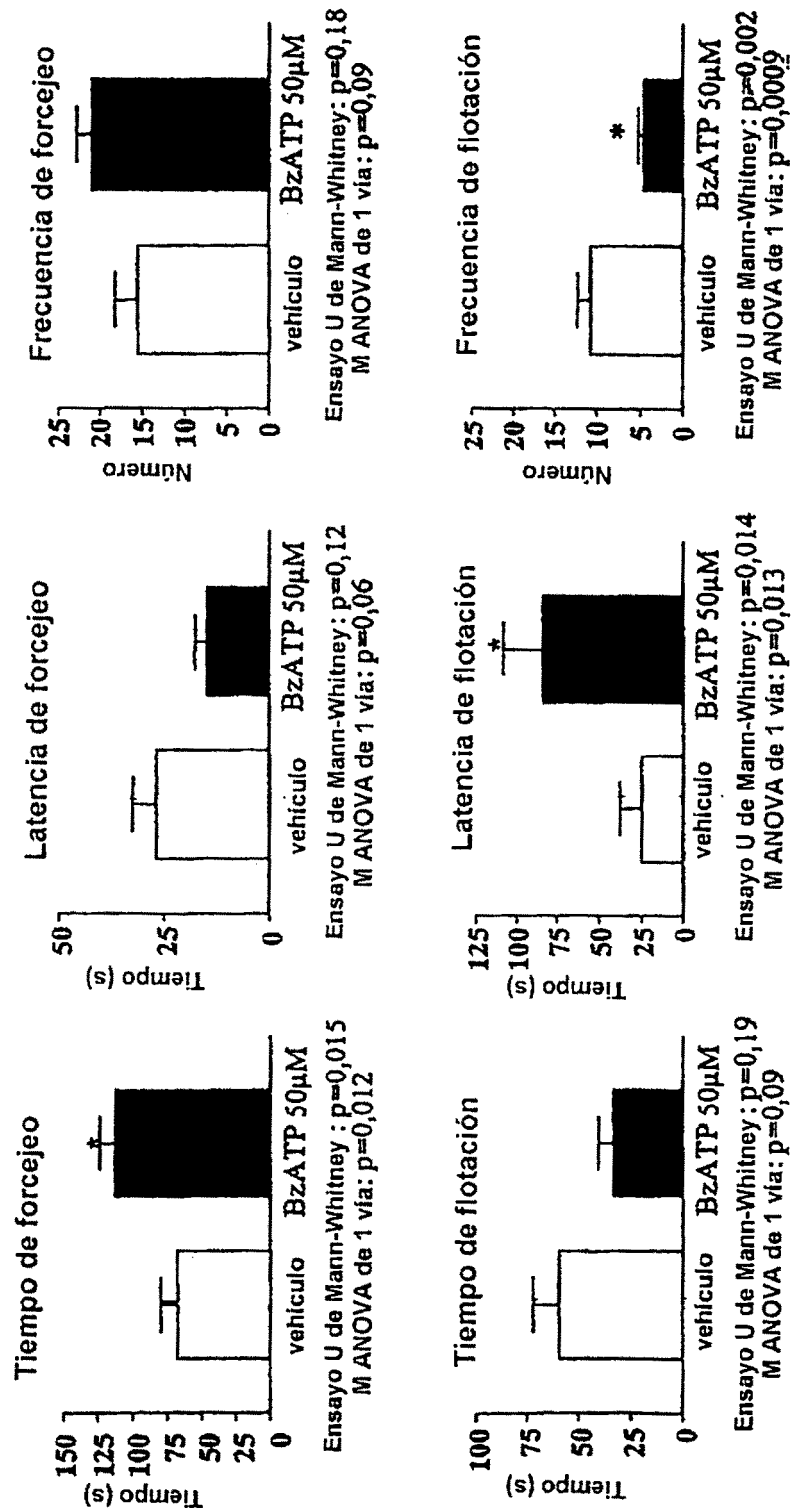


Figura 20

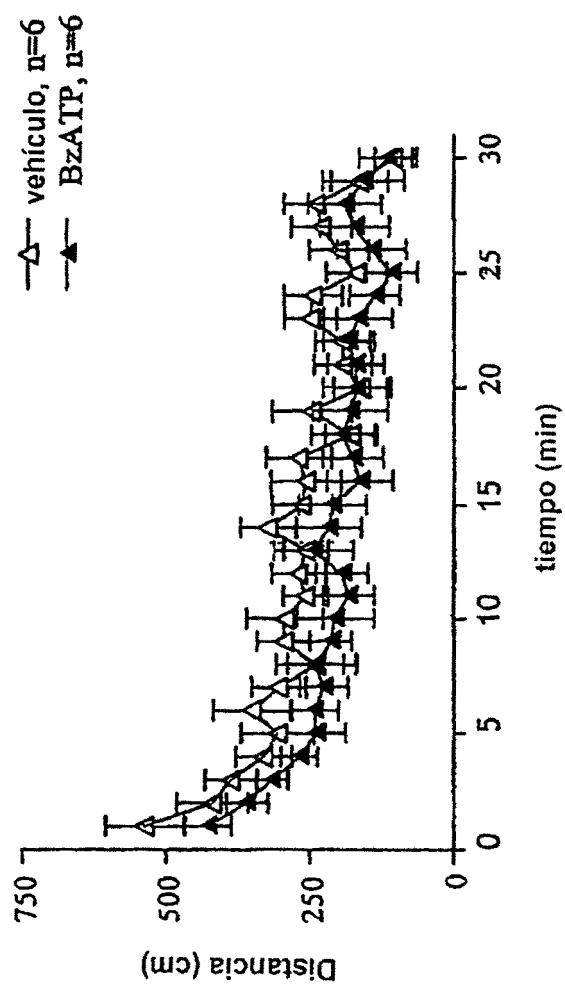


Figura 21

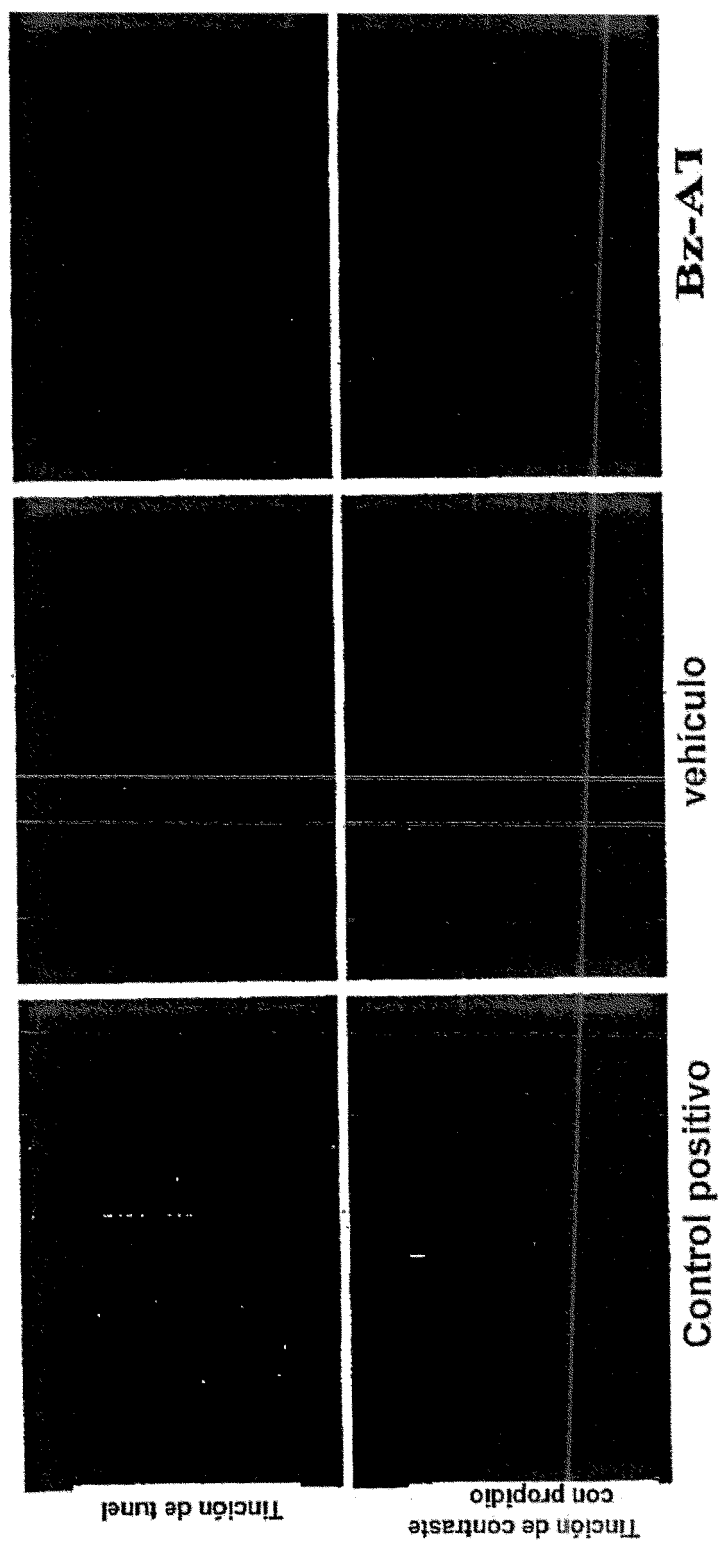


Figura 22

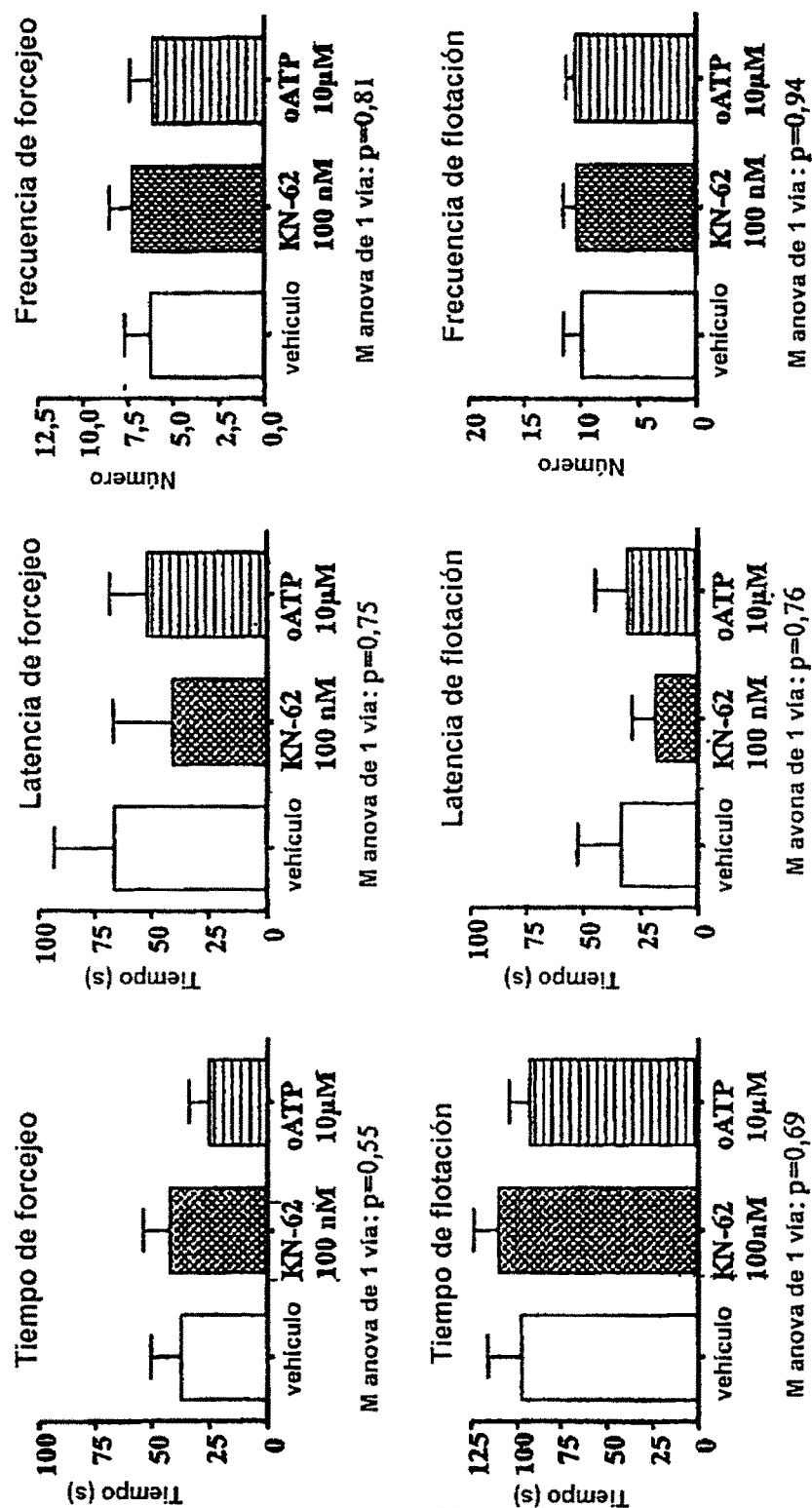


Figura 23

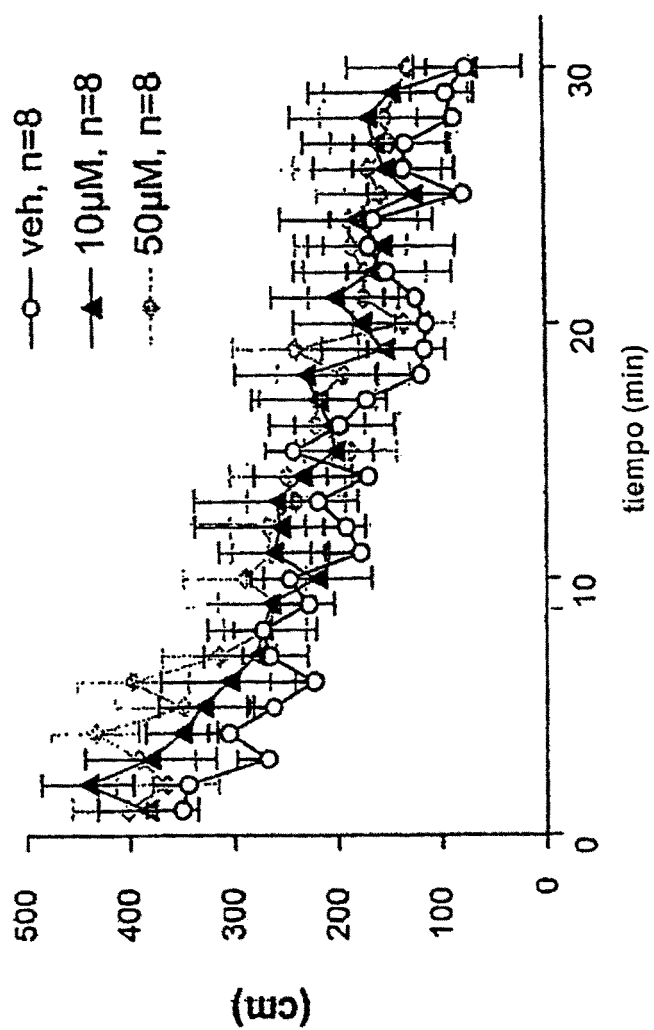


Figura 24

ES 2 293 114 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NeuroNova AG
5 <120> Un método para el diagnóstico y tratamiento de trastornos afectivos
<130> XXX
<160> 111
<170> PatentIn versión 3.1
10 <210> 1
<211> 56580
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
15 <220>
<221> exón 1
<222> (34000)..(3124)
20 <223>
<220>
<221> exón 2
<222> (24841)..(25009)
25 <223>
<220>
<221> exón 3
30 <222> (26134)..(26202)
<223>
<220>
<221> exón 4
35 <222> (13958)..(31030)
<223>
<220>
<221> exón 5
40 <222> (32481)..(32577)
<223>
<220>
45 <221> exón 6
<222> (35416)..(35496)
<223>
<220>
50 <221> exón 7
<222> (36113)..(36242)
<223>
55 <220>
<221> exón 8
<222> (37541)..(37677)
<223>
60 <220>
<221> exón 9
<222> (45470)..(45560)
65 <223>
<220>
<221> exón 10

ES 2 293 114 T3

<222> (47229)..(47295)
<223>
<220>
5 <221> exón 11
<222> (47380)..(47529)
<223>
10 <220>
<221> exón 12
<222> (50438)..(50539)
<223>
15 <220>
<221> exón 13
<222> (54392)..(54889)
<223>
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 293 114 T3

<400> 1

	tgtgggtccca gctactcagg aggtgtgtgt agggggatca ctggagccca gaagttttgaa	60
	gctgcagtga gctatgattg cgocactgca ctccagcctg gacgacagag caagaccag	120
5	tctctaaat aaattaatta aattaatttt ttaaaaagaa agataagata aagagtcata	180
	gaagtacaaa tgagaaacca ggagaacatg ggaccagga aagtcattga aaccaagggg	240
	aaatactggt ccaagatgca gaaagtagcc agtgatgttg aatgcatcca agagatcaag	300
10	taacataagg aataaaatat atccaccag tctggcaact gagaagtctt tggtaacctc	360
	attgagaaca gaatccatgg agtggaggag gtagcagtga tgaantagcg gacaaggggt	420
	gaaggagtgg agaggggaga gcatgagggg ccagtgcag agtgcagcag aaagacaaca	480
15	aacaggccgg gtgtagtggc tcacgcctgt aatcccaaca ctttggtagg ctaaggcggg	540
	cagatcgctt gtgaccagga gttcgagacc aacctagcca acatggtgaa accccatctc	600
	tactaaaaac acaaaaatca gctgagcgtg cgcattggctg taattgcaga tactcatgag	660
	gctgaggcac aagaatcgct tgaaccagg aggcaggggt tgcagtgacc caaagtcttg	720
20	ccactgcaat acagcctggg caacaggggg agactccatc tcaaaaaac aaaaaaaa	780
	aaagaagaaa gaaagacaa agaaagaaag aaagaagaa agaaagaaag aaagaagaa	840
	agaaagaaag aaagaagaa agaaagaaag agaaagaaag aaagaagaa agaaagaaag	900
25	atgtctttga gtggtagcaa gagcaacact gaagtgtttt gcctattctg gacatttcct	960
	ataatggag tcgtaaaaga tctatccttt tctgtctggc ctottteact taagcgtagt	1020
	gttttcaagg ttcattccatg ttggagcatg ggtcagtgtt tcattccttt ttatggctga	1080
30	ataatattcc cttgtatgga ctttcgtgct tttgtgtatc catccatcag ctgatggaca	1140
	tttgacttgt ctgcctgttc actgccatat ctactattcc tgggtcctctt gggaaatgag	1200
	gaatgaatag cataaacaga gctgtccaag gtcacagagc tggtaagatg tgaagccagg	1260
	atcggaagcc aggcatttag tcccctagag cctatgttct aagcatcagg ctttacctgt	1320
35	gaatctcttc tttttacaga tgaagatgac tgtatcactc agattcccg caggaaagca	1380
	atggcatact caagtgggtt aactaatgat ggaaccattt acaagggtgt ggacagagtt	1440
	aaagaaaagc aataggagat agtgagcttc ctggggctgg taagagtggg gagcccttac	1500
40	cactcccgag actaaaggag ggagtgggtc ccagaagccc tgcctatatg caactgagaa	1560
	gggcagggcc agggagtcaac gtccatcctc actgctctcc agtctcctga actggaagcc	1620
	agaaggtgag gggaaacctg atgcagtttg tatgtgtgag aaagtacaat tagtttagac	1680
	tgaaaaactg aaatctatcc cggccactta gcaggctgga ataacagaaa tggatcaagc	1740
45	cagctgtaaa gataacaggg aacaataatt ctctgtagct gtaagtgat aatacaacct	1800
	tgcattcttg agtgactgct gaaacattgt cctttaaaat cagagacctt cagaaacttc	1860
	gctgtttgaa attacatgac taagactgaa atattccaat tttgcctgga agatttaagt	1920
50	catcttgaca cagagaagca gcctcaattt acaactcagg agcagagctt cagataaaga	1980
	ttttctggac acatttgaca tgtatcttag ctatgttgc tccctaggaaa cagggccctg	2040
	ggtcctcttt gcaatccaga ctgaagtga ctgctttgta caaacctgtt ttgctttgag	2100

ES 2 293 114 T3

tccatcaaaa catgacttca tttagatttt atctcaactc cactttcttc ggaatcctat 2160
 actaaattgc tgttttcctt tgtttggtga tgtgcgtagc tcttctggtg ggtggtgtcc 2220
 ctccactgaat aggtcaacaa acctaaacttt gttggactgc cactgtgtcc ctggtgatct 2280
 ttggctgatt ggtctaggtc atagatcgac ctgccggggt gcagaggagg gtggagagta 2340
 actcagaggg tcaagcatga aagatctggc agaaaaataa agccctccca cccccaccac 2400
 ccctaccctt gcaaatctga tttcccccac caactgcaga ccagagtatt ataaggggcg 2460
 gtggaagaag agggggagat cttcatttac ccagagctcc tatacatcag gggctgaata 2520
 aaggggtgtg gaaatgaatg aatcaatctc tgagtggggc ttcaggcagt ggaagatct 2580
 cagtcccttt ctgaggcata atggaagctc ccagtcttgt gacatttgca aggctgcccc 2640
 tttctcccaa gagacatgag accaaaaaag tgaaggaaa ggggggaaa gggagaattc 2700
 tgaanaatgc catcctctga acaccatctt tgtgtaggca tctgggggag gccagctggg 2760
 gtgaggtcat ctgccagcca ggcccgtagg acttggcgct tcttgtttat cacagccaca 2820
 tgtggggcca ctgccagggc ccgccccaac tctgcagtca ttggaggagc ttgaagttaa 2880
 agactcctgc taaaaaccag tacgtttcat tttgcagtta ctgggggggg gcttgtgtgt 2940
 gccctgtcag gaagagtga gctctggtcc agctccgcgc agggagggag gctgtacca 3000
 tgccggcctg ctgcagctgc agtgatgttt tccagtatga gacgaacaaa gtcactcgga 3060
 tccagagcat gaattatggc accattaatg ggttcttcca cgtgatcacc ttttcttacc 3120
 tttgtaagt gggatctggg gaggaaccag atctctgcag tggccgacag cacagaaagc 3180
 cccagcgggc agcttcaggc gcacattctg aatctcacat ggttttctga tctgagacgt 3240
 gctctcacag ccagctgggc gggaggggag aagcagcagc aggcagagag aaacgggtgc 3300
 aggtctcagc agagagaagc cacaggacaa gcgggattcc tttctgctct acttcaggcc 3360
 cgccagggcg cgcagggcag ggcgtgcctg gggaaagtag gaaagcgcag ggcaacacc 3420
 tggatcccca gggaggaggc gaggatctca gggcacgcct ggtgatcatg ctggcatctg 3480
 agtcaccatg cttgggagga ataggaccag gcttgaaaat gtgtataaac tttaggtcct 3540
 caccaacgic aggaaggccc tgctttttgg tttttgttct tctaaaaa aacttactga 3600
 gatataattt atacaccata caattgacct atttaagggt taccatttaa tgattttcag 3660
 attatttcca gsgttgtgca accatcccca aatcaattt tagaatattt taatcgactc 3720
 aaaaggaaic ccacactcct tcaccatcat ttccaacact gttcctcctc ctcccccacc 3780
 atcaatttcc tttctgcctc tatggatttg ccgattcttg acatttcata taatgggaat 3840
 cacataatat gtgttccttt gtggcactta gcgtgttttc aatgctcacc catgtttag 3900
 catgtgttga tacttcattc aatttttttt tttaaagaga cggggtctca ctattttgtc 3960
 caggctggtc tcaaaactct ggaactcaag gatctgcctg cctcggcctc ccaagtgtc 4020
 aggattacag gcgtgagcca ttgcaccggc ctgatacttc attccttttt acggctgagt 4080
 agtactccat tgcattgata gaccactttt ttctatccat tcattccatt atggacattg 4140
 ggggtgttct tcttttttgg ctatcatgaa taatgccaca tgaacatttg tgtacaagg 4200
 tttatgttga tatatattct cctttctctc gaatatgtac ctaagagtaa aatttgctag 4260
 gtcatatgtt aactatgttt caccttttgg gggaaatgtg agctgaattt cacagcagct 4320
 gcagtttttt acattcctat cagcagagta tgagggatcc aatttctcca catcctcacc 4380

ES 2 293 114 T3

aacgcttggt atcgtctgtc tttttgggtt ttgttggtgt cattttgttt ttgtctttga 4440
 gatgaagctt tgctctgttg cccagggtgg agtgagtggt cgcaatcttg gctcactgca 4500
 acctccacct ccccggttca agcgattctc ctgcctcagc ctcatgagta gctgggatta 4560
 cagggtgtggt tcaccactcc tcaactaatt ttgtattttt agtagagatg aggtttcgcc 4620
 atgtaggcca ggctgggttc aaactcctga cctcaagtga tccgcccacc ttggcctccc 4680
 aaagtgtctg gattacaggg atgagccgcc acgcccggct gattgtctgt cttttttatt 4740
 atagccatgc tagtgggtgt gaagtggtag ttcatgtgtg ttgtgatttg aatttccttg 4800
 atggtgagtg cctcttattc tctgtgctga ttgataatga tgatgaaggc aatttgatc 4860
 tatagagtgg cagtgtagt tactaagagt taggtaact tatttcatag tactggctat 4920
 gtcttctggg ccaagtcatt aacttctctg agcctcagtt tctgcatctg ttcatagggg 4980
 tgtggcaatt aacaaaaaa aaaggcatg aacagccctt atcatgatga ctgacatagg 5040
 ataagagctc cataactagt atctattttt aaaaataatc tttttaagtc tgggagtggt 5100
 ggctcacacc tgtaatccca acacttttgg aggccgaggt ggggtggatca cgaagtcagg 5160
 agtttgagac cagcctggcc aatatggtag aaccccatct ctactaaaaa taaaaaatt 5220
 agtggggagt ggtgggtgac acctgtaac ccagctacta gggaggctga ggcaggagaa 5280
 tcgcttgaa cccgaggcgg aggttgaggt gagccgagat caagccactg cactccagcc 5340
 tgggtgacag agcaagactc catctcaaaa taataantaat agtaantaatt tttttgatta 5400
 tataantaga tatatgtata taaaatacat gtatgtattt ttatctatat cctctgctct 5460
 gacctcaaa gtaaccacgt ccaagttcag gatttgaaat ctggaacgt ggattcaaaa 5520
 atccttcacc tctttgagcc ttggtttcat catctgtaaa atggggagaa ttgttgatag 5580
 gaattattaa tgaactaata atgcanaagc tgtttgagaa atatatggca tatagtaatc 5640
 cctgattaag tgttagttct tattattaat aatgctatta ttaggattat tattattcga 5700
 ttcatatgtt tactgttcaa caaatattga atgataaaca tatatgtctg gtccggcatg 5760
 gtggcccatg cctgtaattc cagcactttg ggaggccaag gcgggcaggt cacttgaggt 5820
 caagagtttg agaccagcct ggccaacgtg gtggaacctc cgtctgtgct aaaaatacaa 5880
 aaattagccg ggcaltgttg tgggtgcctg taatcccagc tactcgggag gctgagacag 5940
 gagantcact tgaaccaggt aggtggaggt tgcagtgagc caagattgca ccactgcact 6000
 ccagcctgag ccacagagca agactctgtc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 6060
 tatatatata tatatatata tatatatata tagtattttt agtagagatg gggttttgcc 6120
 atctcttata tttttttata tttttatatt ttttatatat ttatatatat ttatatgtat 6180
 tttatatatt tatatatatg tgctgaatc taaaataaga catatcactt aaaccagcta 6240
 tcacaggacc aatggtaaa agcataatta gtaaagccc ccttctgcat taatacgtag 6300
 attgtatgtc acaatttcat gtacagggtg atggggcttc ctgacattct tgggccagc 6360
 atacaatctt tttatttctt ttttagagac aggttctcat tgtgttgccc taggctggag 6420
 tgcagtgtca ttatcacagc tcgccacagc ctcaacttct caggctcaag tgatcctccc 6480
 gectcatcct cccaagttagc tgggaccata ggcacacgcc atgatgtctg actaattttt 6540
 tatttttttt tgtggagatg ggggtctccc tatgttgctc aggtagtct caaactcctg 6600
 gactcaagtg atcctcctgc tttggcctcc caaagtgtct ggattatagg catgagccac 6660

ES 2 293 114 T3

5 tttgtctggc ctacaattcc ttttctttct ttctttcttt tttttttttt tttttgagtt 6720
 gagtctcact ctgtcaccta ggctgtagtg cagtgggtgt atctcagctc actgcaacct 6780
 atacctccca ggcccaagca atcctccac ctcaacctcc cgagtagctg ggaccacagg 6840
 tgtacaccac cagccccagc taattttttg ttttttttgt agagacaggg tttcaccata 6900
 gttgtccagg ctggtcttga actcctgagc tcaagcaatc caccgcctt ggctcccaa 6960
 agtgcctggg ttacaggtgt gggtcacat gccagcctt caattttctc agattattgt 7020
 10 atnataataa aatttctaaa aacagattac tatgagaaca ccttgtantg ataatattt 7080
 ttctttcaca tgggtaaatc ataacttaca tgtatttaac tccctcaat tcagttatac 7140
 atgttccatg gggacatgga gagagagaga acaatataaa taatgcaatg attcagcaac 7200
 15 cgggttcgct ggagtaggtg tgagatggga tactggcatc tgggttccc tccgtcaatc 7260
 tctgttccca cgtgcttttt agcagcatc ttgctgctct acttattaat ctaggtaac 7320
 atttttcagc cacatgacc ctataataag tcaactcctt cactttcac tggagcaaaa 7380
 ctgtaaaaac agcaacttgt tctagatctg gaggcaaaat tggttccagc agaccactg 7440
 20 ggaagtggga ggtgtttgct atgctttgtg gacaatttaa gtgtttaaa ggcattttg 7500
 atgagccatg attttcatct taagtccaa ctttagaaga taaccttcat ataaaagttt 7560
 ctctacagtt tgtattttta aatataaat ggaagaaaa actatacca gctttgcttt 7620
 25 tttctcttg gttaatggac tatctattaa cgtctcataaat gggccaaa tggagtctca 7680
 cagtacacag tttgggaat gctgccttaa gttgctctgt gaagccttaa gttcgtgtaa 7740
 ccatgactta gccatctgtg aatgggtag acccatggg cataggaatt ggggaatgta 7800
 30 ttttgcatac agtgggactg gtgtggacca caggtggaaa tccagacagg ctgagcaat 7860
 gttcaggata cagcagcaag tgacaggttc tggccagctg tccctactg ggctgcaagg 7920
 actaagagcc aggataagga gacaggccct cgttattga aatgggata caaagcagg 7980
 35 actggttatg gcggaatta accaagaggc gtctcagctt cttctattct cacaaccaat 8040
 tcagatctgg attcaaaggc agggatgcag ctacaagagg agtttgtgtt ggaggtctgt 8100
 gtatagatga tgctaagcag gtctgtgtca gccaggatcg tttgggcagt aagtacaga 8160
 aacctaacct acgttaacca caagcctca aagggaatt tattggtca tgtaactggc 8220
 40 cagttgaaga gatgtgtctg tctcggacg tggatgaaga taagagttca aactgtgtca 8280
 tcaggacgga tccgtctccc tacatcttg ctcatttgc ttctatttgg ctctctctt 8340
 gaacaactct gtatgtacaa gatatactca cattctcttc ttttaaac ctcagaggag 8400
 45 caaacaagtc tttctgata gctctgttaa gaaagtecca ggaagactc tgattgatca 8460
 gatgtgagtt acagatccat cctgaacca atcactgtg ccagggccaa ggtgtcatcc 8520
 cattggccag cctgggtcat gtgctggctc ccgtagcagg aagtagggag aagacgagg 8580
 50 agccgtgtga gccctacgtg aaccacatcc agtggatttt ccttaggaag gaagattctg 8640
 tgaccagacc aatgggaaa ggaagtggg agggtaggca gacaaaaatc ggtgatctat 8700
 tacaaggtct ttccaaaagc cagaattag ggatttctaa gtgtacctct ctagtcttg 8760
 55 ctgtctcag cctgcagct gggctgtgga gactccatca gcaattgtg acccctatt 8820
 cttacctcg cctctctg agtccacca ggagccctgc tctcatctg gacatgctt 8880
 cttggcccat ggaggttgcc agctacactt ggtactttac tactatttgg tttctgtgac 8940

ES 2 293 114 T3

5 caccaagctg ttgcttaaac caagccgcct atgggtggcac cactttggag aattcttttt 9000
 tattttttga gacagggtct cactctggtt accgagactg gagtgcagtg gtatgatctt 9060
 ggctcactgc agcctcgacc tcccggttcc aggtgatttt cccacctcag cctccccagt 9120
 agctgggact attggtgcat gccactacac ccggtcatt tttgtatttt tagtagagac 9180
 ggggttttgc catgttgccc gggctggtct tgaactcctg acctcaggtg atctgcccc 9240
 ctccgctgt caaagtgcgt aaattacagg cgtgagccac cgcacccggc tggataattc 9300
 10 ttttagatttt attccaagt ggttgagaag ccatgggaag attgtaagca aaggaaataa 9360
 agttggttgc attctctttg gaggatttcc ctcttccctg gagaccagtc ctacagaaag 9420
 cttttccaat ggccacagaa gactaaggaa gattgagaga ggcacaggaa acaattccac 9480
 15 tcagagctgc tgcttcgcca ctgccagtc agcctccact ggcgcacaa cyagcctatg 9540
 ctgtcatccc tgggccaggt ctggtgtctg ctgtggagat ggtgctgctg tgctagtgtg 9600
 tggtgtttaa aatggagctc ctggctggac acctgtttcc cagtgggttg ccacaaacct 9660
 20 gtgagctctg gctcctcca gctgagtaga agtgagccca gcacagaggc cggggaggcc 9720
 ccagacgcca gggaggagca atccaaatcc aacccaagca tggccctctc gacctgacc 9780
 atcttttttt tttttttttt ttttgagaca gagtctccct ctgtcaccca gactggagtg 9840
 cagtggcacg atcttggtc attgcaaccc ccacctcctg ggttcagtgc attctcctgc 9900
 25 ctacgctcc ctatgagga ctacaggcat gcaccactac acccagataa tgtctgtatt 9960
 tttagtagag atgggttct gctatgttg ctaggctggt ctgaactcc tggcctcaag 10020
 cgatccatcc gtcttggtt cccaaatgc tgagattaca ggtgtgagcc actgcgcccc 10080
 30 gctgttctct gactgccttc agaaagttag aagcaggagg tctgctcat tctcatccca 10140
 tccttgacac ctgggtgatg tgctagagct tgagggaag gtcagaggta acccagttcg 10200
 ggaagtgcac ccgtaggagg agaagaatcc agccacgtga cacacagtac gaagagaaca 10260
 35 gtaaatgcaa agacctgaa acgaggaa caaaggacag catgtccag aacctgggga 10320
 gagagggagg agcagccgga gctgagggca gctcagggga agagtgtcta tttgattttc 10380
 agtgcattgg aagccactga aaagttttat gcagagaagt aaaacctct cactcatgtt 10440
 tctagaagcc ttatgggcca ctgtgcagag catagagtgt ggtgggacaa gaatgacggg 10500
 40 gaggaaaccag tgagaagggt cctggagtca ccagatgca ggagatagag gcttgggcta 10560
 gaatgggctg gcggagcttg agagaggttg acaagctga gatgtgtttt ggaggcagaa 10620
 atgatagatt tgccaggagg tgaagatgg ctctagattc ctgaggaaag atgatgcctt 10680
 45 ttaccaacct gaagaagacc aaggagaggg ttgaggacta acacggaaact gtgaaggagg 10740
 ccaggcaaa gttggagctg ccgtgagctg tgatcacgcc actgcacctc cgcttgggtg 10800
 acagactgag acctgtctt aaaatatata tgaataaaaa aataataaat aaagggccag 10860
 gcgtggtggc tcaacgcctg taatcccaac actgggaggc tgaagcagg gtatcacctg 10920
 50 aggtcagaag ttcaagacca gcctgggtcaa catggcgaaa tcccatttat aataaaata 10980
 caaaaattag ccagacatgg tggcacatgc ctgtaatccc agctacttgg gaggtgagg 11040
 caggagaatc acttgaacct gggaggcaga ggttgagtg agcctaatac acaccactgc 11100
 55 actccagcct gggcaacaga gtgagacccc ataataaat aaataaatat ataataaag 11160
 gatatcaggc aagcaattea aacacctgcc tactaccatc tatccgcatc ctttttttca 11220

ES 2 293 114 T3

5 tgtctaacac caaaacacca aatatgctgg aaacatatca tgtcaaaaga taagcatgat 11280
 tctttcaaat gaattggctgt ggacttatga aaagctgcct ccgctctga ttttcttgtt 11340
 tcaaggggta atgatggagg ttctctcct gcacctgcag gcctccggg atgctgcccc 11400
 agtcagacct cccacctgg gctggagcct cccagcccc ctgcatgggt agcacagtgt 11460
 tgggaagagg aaggagcagt ttgtctggct ttttcacagg cccacagctg gccggtacag 11520
 10 tggcagagaa ggcgaggctg aggtggggct ggggaagcca gcaggggcct gatcatggag 11580
 cgcttggagc tgcacccac aggtactgag aaagcatgga gagctgtccc ccagcccca 11640
 gcatcttatt agaaatatt gaacataac agaaacatg aagggtttta tgttcattt 11700
 ttcatcttag agagatcatt ctgcttgaat tataacacct actgagtact gctgaggact 11760
 15 taccatgtgc cgggttctgt tcttagcatg tgacatgtat tggcctattt gattctccta 11820
 cataatcctg gaagatttgt tgtgggagtg ggtgatcatg acctgaacag cctaaccatg 11880
 tttaggggac actctgtgtt atgcttcca ccacacaatt catgtcacag ctgaatgtcc 11940
 20 cagtttccct tgcagctagg acacaacggg agacccaagc tttccaaaca tatgccccag 12000
 gcaacacttt gatacacaag gaataacact gvatgctggg tgtgcacaga attcaattc 12060
 aggaatggag ggaagtactg cctttgacc catacaatg gggatccct tccttggacc 12120
 ccatggtcta gagggcccca ctctgtccct ctgcagactg tgagctgccc tatggaatga 12180
 25 ggggtgtctg aggtgtatt aatttctatt tgttacacag cagtggaaac taatacagtc 12240
 ccacaggcct aatcaaggc gtcagcaggc tgagtctctg cctggagact ctgggggaaa 12300
 ttcaactcca aactcatttt tgtgttggc aaattcaat ccttgaggc tgcaggactg 12360
 30 ggctctgtgc ctactggct gtcagcctgg ggcaactctc agattctgaa gtcttccac 12420
 attccctgac acatggctct ctcatctcc aagcctgcta tgacacaacg cattgttctc 12480
 atgcttcaaa tctctgactt ctctccggg accagaagaa gaatactctc ttcttttaag 12540
 35 gggctcatgt gattgggtca ggtcaactct atcatatcat ggagtctcac cgtcttggcc 12600
 aggtgggtct tgaacacctg ggtcaagtg atcctcctgc gttggcctcc caaagtgtct 12660
 ggattacagg cgggaactgc tgtgcccagc caaggccagc atcttcagac ctctctgccc 12720
 tgttttcaca tggctctctc ctcttttgtt gttgttcaaa tctcctctct cctctcttat 12780
 40 aaggacgtgt gtaatagcac tcaggggcca cctggatgac acagggtcat ctgccatct 12840
 caaatcgtt aactttggc aggtgcagtg gctcatgcct gtaatctcag cactttggga 12900
 ggctgagaca ggtggatcac ttgaggtcag gattcaaga ccagcctggc cagcatgggt 12960
 45 aaacctgtc tctactaaa atacaaagt tagctgggca cgcacctgta gtcccagcta 13020
 ctgaggagac tgaggcaaaa gaattctctag aacctgggag gcagagactg cagtgaacca 13080
 agattatgcc actgcacttc cagcctggg gacagagtga gacttcatct caaaaaaaaa 13140
 50 aaaaaaaga tgactgggca cgggtggtca catctgtaat ccagcattt gggaggccca 13200
 ggtgggcaga tcacctgggt tcaggagttc attcaagacc agcctggcca acatggtgaa 13260
 agtctctctc tactaaaaa aaaaaaata caaaaattac ccagatgttg tggcaggtgc 13320
 ctgtaatccc agctacttgg caggccgagg caggagaatc acttaacct gggaggcaga 13380
 55 ggggtcagtg agctgagac actctgtctc actccagcct ggacgacaga gcgaactcc 13440
 atctcagaaa aacaaattaa ccaggcatgg tgcgtctgc ctgtagtccc agctactggg 13500

ES 2 293 114 T3

aaggctgagg tgggaggatt gcttgatcct gggagggtga ggctgcagtg agctgtgttt 13560
 gtgccactgc actccagcct gggcgacaga gtgagaccct atctgaaaa aaaaaatcg 13620
 gccaggcgcg gtggctcacg tctgtaatcc cagaactctg ggagactgag gtgggtggat 13680
 cacctgaggt caggagtctg agaccagcct gaccaacagg gtgaacccc gtctctacta 13740
 aaaaatacaa aattagctgg gcatgggtgc aggcacctat ataatccag ctactcggga 13800
 ggctgaggca ggagaatcgc ttgaactcag gaggcagagg ttgcagttag ccgaggtcat 13860
 ggcattgcac tccagcctgg tggcagagtg agactccgct tcaaaaaaa gaaagtctct 13920
 ttttacaact ttttgaggt ataacttaca tatcagaaaa tcaccgggtt taaatataca 13980
 tttcancgac ttttagtaa tttcccaagt tgtgcaacca tcatcacaat ccagtttcag 14040
 aacatttcat cagccagta agagccctca caccattaa cagtcactcc ccactccac 14100
 ttctcctgg tgggtgctca acccaggtaa ccatgaatct attctctgcc tctggagatt 14160
 tgtcttttct ggacaatctt tcttctttaa ctacagcagag tgagtctctg tgtttagaac 14220
 tagaaacct gcccaataga atactaatat cctcttgttt tgcaaggag ttagagtctc 14280
 gctctgtcgc ccaggctgga gtgcagtgtg atgatctcgc ctactctoga cctctacctt 14340
 ccggattcaa gcattctcc taccctagct tctgagtag ctgggattac agcgtgcac 14400
 caacacacct ggctaatttt tgtactttta gtagagatgg ggtctacca tgttggccaa 14460
 gctggctctg aactcctgac ttcaaatgag ccacccgct tggcctcca aagttctggg 14520
 attacaggca tgagccactg caccagccc taatatctc ttattacaa agaagaaca 14580
 atgactcaga aagattaagt cactaccca aggtcatgta gtcagtaagc aatagagctg 14640
 agaatgaacc tcactcoaaa gtctatgctc tcactaaagt attgcagtgt agagagtaga 14700
 ggggacaggg tgagactgga ggaaggagg gcatttagga gactattggg atgtccagat 14760
 ctgagagctg ttggcgacct ggactgggga ggtgatagag gcagaggaag gaagttagatg 14820
 aatttgagca tattaggag tgaaacagta ggatttggca actgaacggg tgagtggaca 14880
 agaaggagag gatgagtcac agagtgcacc atgcttctgg ctggggcaac tgatgggtac 14940
 tggmataact tgctgggata ggaatgcag gagaacagc caatttggg tggaaatga 15000
 ggtcaggact aaaggcattg agtttgaggt gtctatggaa tgtacaaatg gagatgttga 15060
 atggatggtt ggaatmcga atctgcagct gagatgtagg tttctatct accagcatat 15120
 agacggcaac cagaacctg gaagaagggt caaccgacca gcaagagaag atgtagatga 15180
 gaaagcaaaa gggcctagaa cagccccc aaagggtgcta acctttaagg cgtgggagcg 15240
 cagaagtccc caaaagattc tgaggagtag ccacggcgat ccagtgaag tcaggcaca 15300
 gtggactcct gcaagctaag ggaaggagtc gagggaagtg gggcatggc acagttagtg 15360
 tcaactgctg ctgagagttc cagggaagtc aggtccatgg tgtatctatt ggatttagtg 15420
 acaacgacat tgttgtttac ttggcaagag aggcctttaga gaagggatgg gggtaggagc 15480
 cagactagag tgggtagagg agtgagtga tcaagatgcg gaagtggatg tgatgactcg 15540
 ccctttcttt ctctttcttt tcttttttt ttttttgaga tgcagcttc ctctgtcgc 15600
 caggctggag tgcgatggg tgatctccac tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcag 15660
 tgattctcct gcctcagcct tccaagtagc tgggattaca ggcagtgtgc accacaccg 15720
 cctaattttt tgtattttta gtagagagcg ggtttacca tgttggccag gctggctca 15780

ES 2 293 114 T3

aactcctgac ctcttgatcc acctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg 15840
 agccaccgta cccggcctgg tgactcactc ttccaagga ctcagctata aagaagagag 15900
 gcatggagtg gtggtaggat gattaagct ggggagggga ggcattttta agatgagaaa 15960
 tgatgtttta atgcagatgg aaatgggaca ggagagaaag ggaagttgat gggataaatg 16020
 aaaattatca tcatcatctt cctcaccatc accagcagca accacaagga aagctcgttc 16080
 tgctctggga ctgccctggt agacatttct tccttatact gagccacaat ctatctccct 16140
 gtaactttcg cctttggta gagttctgcc ttgtgtccct cttctactct tcaaatggct 16200
 gcacgctgct actatgtctg tcctcttctt caaactcaca gccccatcc tacgggcccct 16260
 gtgctccag cctggtagcc cgacctcta ctgtccagc caagttcaca tgaccatcct 16320
 cttatttgc aagcctctct tttttttttt tttttttttt tttttggag gagtcttact 16380
 ctgtccaggg ctggagggca tggcacaatc tcagctcact gcaacctctg cctcctgggt 16440
 tcaagtgtat ctctgcctc agcctcctga atgctgggat tacaggcata catcgccatg 16500
 cctggttaat ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttggc caggctgggt 16560
 ttgaactcct gacctccagt gatccccctg cctcagcttc ccaagtgct gggattacag 16620
 cgtgagccac tgagccgggc caagccctc tgaagaggca gtgtgcacac tcttgctttg 16680
 ctgatagaag catgaaatgg ttcaagttt ttgtatttgg gaaatgaac tcagctataa 16740
 aatgtgcaca cccagaagtt gtcttatgga cttaatgtct taggggtgag aagaagcttg 16800
 tgcagggtat cctggcaaca tgaatgcggg atggacagac agtgagcaca gtgttgagga 16860
 gcacagcctg agtgcatctc cctgagatca ggaacaggac aaggatgcc gctttcaccg 16920
 ctgtgttctg acattgtact ggaagtctc gcagagcaa ttaggcaaga aaagcaata 16980
 aaaggcatcc agattgtaaa ggaagaagta aaactatct tagtcacag tggcacaatc 17040
 ccatataggg agaattccaa agaattcaca agaaaactgt tagagcaaat aaactaatc 17100
 agtcaagttg caaggaacaa gatcaaccac aaaaattaat tgtgtgggtt ttttttacac 17160
 cagcaantga catttgaana ggaattcga aaagtattc cattcactgt agcatttaag 17220
 aaagctgagg ctgtgaagct acatggctgt gtttggagct ggtgtgcta ttaccatgt 17280
 gaccttggac aagcttctca cttcattcat gacaccgttt attcagctat taagtggggg 17340
 taataatagt accttcttta tagagttggt tttttgtttt tgtttttgtt tttggtgggg 17400
 gagagtsagg attgcaagag ttaatatatg ttacaaaat ggacttagaa gagtggttgg 17460
 cacatggtaa ggactatatt agggttacca aaaaatgttt ataattggga aaattgaaca 17520
 aaggttccag taatatcca tcccagaggc tggttgacaa attatcaca tgtacctttt 17580
 agcttgaaac atatggaact gcctatatc tatagctatg gcctacaaa tgcaaatgg 17640
 gcagtttttt ttgtgttgt ttgtttttt ttgttttgt ttgtctgaga cagtctcagt 17700
 ctgtccag gctgaagtc agtggcacga tcttggctca ctgcaacctc tgccctccag 17760
 gttcaagcga ttctctgcc tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt gtgcaccacc 17820
 acgcccagct aatttttgt ttttttagtag agatgggggt tccaccatgt tggccaggcg 17880
 ggtcttgaa tcctggcctc aattaatctg cctgcctcgg cctcccagag ttctgggatt 17940
 acatgagtga gccaccgagc ccagccaaa tgggcccgtt catatgttca atttaaacac 18000
 taagatactc tttagccact gaaatgact gtgtatcata gatctatctt tatcacagat 18060

ES 2 293 114 T3

ctatctttac tgtcatagaa agaactaata acatattatt gaacaaaaat aacaagttac 18120
 aaaaacagctt gcagccacgt ttgtaacatc agtatatcta tttgtgtgtc taggtgtgga 18180
 cataangaga tatctagaag acactcccat tgcctatggg aatgacttgg gctgggatct 18240
 tttttattta tttatttatt tttttattta tttatttatt ttttttggga cagagctctca 18300
 ctctgtcacc caggctggag tgcaatggca tgatcttggc tcaactgcaac ctccgcctcc 18360
 caggttcaca cgattctccc acctcagcct cccaagtagc tggaattata ggcacccatc 18420
 accgcaccta gctaattttt gccttttttag tagaantggg gtttcgccat gttgcccagg 18480
 ctggtctcaa actcttgatc tcaaatatc cacttgcttc agcctccca agtgctggaa 18540
 ttacaggcgt gagtccaccg acccagctgt gatcttaatt tatatttttt ctttttaacc 18600
 cttgattttt accctgtttt actgacttta ggagctctgac ccccaaaact gcaaaagaat 18660
 aaattagtgt tgttgnaagc cactaagttt gtggtaattt gttagagcaa caaccagaaa 18720
 ctaatacaat cgggattaaa cttgccctgg gggtgctggc tctccccac tttcttctca 18780
 gagcatctct tgggtctctg ccccttgcgt agccccacc atggccgggt ggaccagcga 18840
 tggacctgat cggattctcc tcttgggatt ttaantaaga gatgcagagg ctgcacgcca 18900
 agcttctctg tgcgcactg caggcacagt cctggcgcta ctgttcttta ggggtccatg 18960
 aagatgtttg ttggcctggc ttagggtgta gctaagagat acaagggata cactttggag 19020
 gctcagccct ttgatgtac ctttgcgtg gaagcccagg ggctgtaaga cggagaggaa 19080
 ctttgcgtga agggaggctc tccctgcaga gcttgaagag caatctaacc atgctggcat 19140
 ggggcccac cccactgtga tgccagtga agtctgtgac agtcactcat attcagagca 19200
 tgtggattga gactctgaag aacgacttta tgggtggcac ctctatctcc atctggtggg 19260
 tccagagcaa gcagcctcag ggtcccatgg gcccacctc accctccatc cttatttccc 19320
 tgccactcca gggtcctcc tcagccagac ttgcctgtga gtgccccttg atggctgtat 19380
 tagtctgttc tcacgctgct aataaagaca tacccaagac caggttaatt ataaaggaaa 19440
 gaggtttaat ggccccacag tccacatgg ctgggaaggc ctcacaatca tggcagaggg 19500
 cgaaggcat gtcttacatg gtggcaggca aaaagtgaat gacaaccaag caaaagaaga 19560
 aacctcttat aaaaacctca gatcccatga gacttactca ctaccacgag aacagtatgg 19620
 gggaaactgc ccccatgatt caattatctc ccaccaggtc cctcccaca cacatggaaa 19680
 ttatgggagc tataattcaa gatgaattt ggatggggac acagccaac catatcagt 19740
 gccctggctt ctctcccat agctctgttc tacttccca aatctttcca gctttgttct 19800
 tttttagaga ctggagtctc actgtgttgc ccaggcttgt cttgaactcc tgggtcgaag 19860
 ggatcctcct acctcggctt aacaagtagc tgcgaatata ggtgcacacc accacacccc 19920
 cacaacttac ccactcctcc cggctcagt aaatccctag gtccttcaca ctcccgtag 19980
 ctccaggtag cagcggcttt gcctcttaca gaatgcataa cattatagcc tcttagagca 20040
 aaaaggctat ggggatggg aaggctggga gttctctctt cattcagga ttaaacctac 20100
 cactcggagg ggtgacatgg ctacacttag tcaccaagca aggtcgggag agtatctctg 20160
 ggatggtcat tagcactttc ttcccaagg gaggatacta caaactcact ttcagtatca 20220
 cagtatcccc ccgacaggt aaagtgtgca aactcgcttt cattcccttt ttgtctttga 20280
 cgcagctctg aagcatttta attcttaaaa ttacatgtt catgatgaca cagagacacg 20340

ES 2 293 114 T3

ttttctgttt agggaggggc ctgattccat taaggctgat cgatcatatg ttgcacattc 20400
 tgggataaat atgagagatc agaattgagc ttcccaaatg gtgggtcaca tgaccagtg 20460
 5 ttgttccagg agaactgtgc aacatccagc atgagaaagc gctgcatgca ccatgtatgt 20520
 gttgggatgc tgggctgaaa tgtattaatg agcaagtgtt atcatatttg tctatggaat 20580
 tctatttaant agctatgtct cgtatgtgct gattgggtct caaatctggg tatcttacc 20640
 caacatcttt cttgaaaate cttcttttta aataaatgtt ggcctgtgct actggcttat 20700
 10 gcctgtaac ccaacacttt gggaggccaa ggcgggtgga tcacctgagg tcaggagtgc 20760
 aagaccagcc tgaccaacat ggagaaaccc catctctact aaaaatacaa aaattagctg 20820
 ggcacgatgg tggatgcctg taatccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcact 20880
 15 tgaacctggg aggcggaggt tgcatgaagc tgagatcgcg ccattgcact ccagccttgg 20940
 caacagagtg agactccgtc tcaantaagt aataaataa tgttatagaa atactaaagt 21000
 gtattgtgca taatataaca cccacgtacc accatccaac ttaagaataa aagcattact 21060
 aatccagttt tgctccctgc aaactcatcc ttcaccccat tctctttcct tttgctttat 21120
 20 aaacatcctg cagccaggca cagtggctgc acctgcagcc tgagctactt gggaggctga 21180
 gatgggagga tcacttgagc ccaggagtgt gtggctgtcg tgtgctgatt gcacctgtga 21240
 aatagccact gtgtccagc atgggcaaca tagcaagact ccactctcaa atgaatcct 21300
 25 tttttttttt tttctttttg agacagagtc tcactctatc acccaggctg gagtgcagtg 21360
 gcgccatctc ggtcactgc aacctccgtc tccagggttc ctgcctcagc ctccggagta 21420
 gctgggacta caggcacatg ccaccacaac tggctaattt ttgtattttt agtagagacg 21480
 30 gggtttggcc aggttggttt cgaacccagc agctcagatg atccacctgc ctgggectcc 21540
 caaagattac aggcattgag caccatgccc agcctaaaag aaatcctgaa tttgacattt 21600
 ttaattccct tgtttgtttt aatatttcta cagcacatat atgtctacat atataaaaa 21660
 35 tataattttt tattggggtg aaattcacat aacgtaaaat taacctgt aaacatgaac 21720
 aattcagtg catttaggac attcatagta ctgtgcaacc accacctcta tctagctcca 21780
 gaacattttc atcaccccaa aaggacactc catgcccccc agggagtact ccccatttct 21840
 tcccactctg tcccctgcaa cgaccaatct actctctgtc tctgtggatt cacctattct 21900
 40 ggtatattca tataaatgga atcatacaat atgtggcctt ttgtgactgg tctctttgac 21960
 ttatgtgggt gtggtggcac gagctacca cctacttggg aggctgaggg agggagaatcg 22020
 ctgaaactcc agccataaat tatattgttt tcaaggttca tcaatattac tgcgccaggc 22080
 45 tggagtgcag taatgtgacc ttggccccct gcaacctcca cctccccggt tcaaaaggatt 22140
 ctccctgcct accctccoga gtagtggga ttacaggcgc ccccccccc caccgggcta 22200
 attttttgta tttttagtag agagagggtt tcaccatgtt ggtcatgctg gtcctgaact 22260
 cctaatttca agtgatccac ccaccttggc ctcccaaat gctgagatta cagggtgtgag 22320
 50 acactatgct aggcctagtc aattcatttt cactgctgca aagcatctca ttttaaaaa 22380
 ttattttatt attatttttt tgagacaggg tctactctg ttgccaggc tggagtacag 22440
 ggggtgcaatc acagcttact atagcctga cctccccggc ccaagcaatc ctcccactgt 22500
 55 ggcctccaga gtatgtggga ctacaggcat gtgccaccac acacagctaa tttttgttct 22560
 ttgttttttg tttgttttg tttgttttt tgagatggag ctttgcctct gtgcccagg 22620

ES 2 293 114 T3

ctggagtgca gtggcgcgat ctgagctcac cacaacctcc atctcccagg ttcaagcgat 22680
 tctcctgcct cagcctcccg aataggtggg attacaggct cagccaccg taccagtta 22740
 5 atttttatct ttagtagaga tgaggtttca ccatattggc caggatggcc tcaaatcct 22800
 gacctcaggc gatccatccg ccttggcacc ccaagttctt gggattacag gcgtgagcca 22860
 ctgtgcctgg ctcaagcat ctcatgttat gaatccaaca atttatttat ccattcgttg 22920
 10 tttgagtaca tgtaggttat ttctgtctt ccctcttaca agcaatgctg cagaaacatt 22980
 cttgtccata gctcctccgg cactgttaca agagcttctc tagggcaca atgtaagagt 23040
 tttattgctg ggccatgggg aatgctcttc ttcaaatgta cttgctattg tcaaatctga 23100
 gctatctttt caggagccta ctactggttc tcagccctgg ctatgcatta gaatcacttg 23160
 15 ggaactttta aaaaatatgt ggttatcttg ataactcccc cgaccctggg aatcctagtc 23220
 tccagggatg ggactgggga cttgaaagct ccttgggtga ttacacagcc aagggtggaga 23280
 acagctggga ctgagctctg gccactctg tctcagcttc ccaaggtcag ctcatagagg 23340
 20 gcagccatca tcttagactt gctaataca ctcagcagct gacagatag aagggaactaa 23400
 ataataaag tctgaatgag taaataaagc atttaaaaca aaccttttag ggttgggtgt 23460
 ggtggctcac acctgtaac ccagcacttt gggaggccaa ggtgggtgga tcccttgagg 23520
 ttgggcattc aagaccagcc tgaccacat ggcgaacct tgtctctact aaaaatacaa 23580
 25 aaattagcaa agtggtggg tacgcgctg taatcccage tactcggaag gctgaggcag 23640
 gagaactact tgaacccggc aggcagaagt tgcagtgcg tgagatggag tcaactgcact 23700
 ccagcccggg ctacagagca agactccatc tcaaaaaaa cataataaaa caaacctttt 23760
 30 aggttgggtg cgttggcgca tgcggtaact cctggttaact atctctact gttgtgaaga 23820
 ttaaggaga tgggtcatgc agagtacttg gcacatatga agtgctcaat aaagagtaac 23880
 tctgcagcc tgggtgtggtg gccacacct gtaaccacaa catgttggga ggctcaacat 23940
 35 gttggcagga ggattgcttg aggccaaagg ttgagacca gcctgggcaa cataaagaga 24000
 ccccgctctc tataaaaaat aataaaaact agctgagcat ggtgatacat gccgttagtt 24060
 ccagctactc agggaggctga ggtgggagga tcaacttgag ctggggagtt ggaggctgca 24120
 gtgagctacg atcacgccac tgcctccag cctgggcaac agagcaaggc cttttctctg 24180
 40 gaataaaaa aaaaagagag ctgggcgag tggctcacac ctgtaatccc agctacttg 24240
 gaggctgagg caggagaatc acttgaacct gggagggtga agttgcagt agccaagatc 24300
 gcaccattgc actccagtct gggcaacaag agcaaaactc tgtttcaaa aaaaaaaag 24360
 45 agagagagag agagttagctg ccattttcaa tgttattgat aaagcagggtg ggtgtttctg 24420
 aaaatgcacc agatgcagcc ttagactgga aggtgctgat gtgttactga gcctccagac 24480
 aaagctggcg aacctaccgg ggcgagactt tatgacttga gaagctgtcc tatctatgag 24540
 50 ggtccatggt agggaaatatt aaagaatagg attgggggca gtagctttcc ttagcaagt 24600
 gctagctatg tgccagatag tgggcaagg agtctgcaga cgtctctcat ttcacctca 24660
 caatccatga ggcaggtatg actattcttc ccattatcca gagagggaaa acaagtcaca 24720
 55 cggagcaag tcacgcagca gacttaggat tggacagaa gtgcctgcat cctccaacgc 24780
 ctgcatccca acccgctgtg ctatgctcc cgttgatgct tcccatgtc tgccatttag 24840
 ctttgcctg gtgagtaca agctgtacca gcggaagag cctgtcatca gttctgtgca 24900

ES 2 293 114 T3

5 caccaaggtg aaggggatag cagaggtgaa agaggagatc gtggagaatg gagtgaagaa 24960
 gttgtgtcac agtgtctttg acaccgcaga ctacaccttc cctttgcagg tgagcacctc 25020
 gtagcattct eccaggctcg tcgctggtca ccgtcgccag ggcttagctc ccttccccta 25080
 ggatctacag cctcactcca gaaaaaacgc tgggtctatt ttaaaagctc tgtgaacatc 25140
 ccaactgaga aaacctaaaa attgcanaac tgggtgagat ccaggagatg attctttgct 25200
 10 ttatcaagtc ctacagggtt tctcaaaata gcctcatgct ctggtgcatt gaaaacagga 25260
 tttgattcac tcgcgcttga tttacccgca gctttttaga cgcacagcca ccaagccagc 25320
 aaggtctgcc gagattcaga aggacagaga accttctacc aaagagcacc agcccttcta 25380
 gattgtgtag catttcatca acasaaatga ctccaggaga ccattcttgg gtacattttt 25440
 15 ccacaagaa aggatgtaaa tgacaaaaag aagaaggcca tcggtcactg agagaaggcg 25500
 tgtgacttct agatttgc aaaggggaaa tgaaagcaga attgccaaa aagagaattt 25560
 aaagtgggtg tgaggagtcc aaaaaacaga taagggggcg agagggacaa aggggcacgt 25620
 20 ttgcggttg gggggctaaa atgctttgca aagacctatg aagcccaagc tgctgtttgt 25680
 ttctaacagt ggttcattaa aatcctgtga ttgctcaggt ggtgggatgc cctagtgcct 25740
 tttcattaaa gtctgggaaa atctgaacag tgtgtgatg aagctgctc cctaccctc 25800
 gcctcccag gtctcctgag tttcaattta atgagatttt tactgcgtaa aaaaaaaaaa 25860
 25 aaacaaaac aaaaacatga aaaggctgct tttgagactg cattggtaaa tgactcttca 25920
 acccattcaa acgctcttc actctccctc agctcagcag ggtgctcgt ccagctttga 25980
 tattaagccc ttgcatatt ccaagttgcc cacagatcct gatttctaga agcttagaaa 26040
 30 agtggagagg ttgcgccagc aagctggatt attataatta agtagttctc ttttcaagg 26100
 ccttgcatth tcttagctc tccttctcca caggggaact ctttctcgt gatgacaaac 26160
 tttctcaaaa cagaaggcca agagcagcgg ttgtgtcccg agttaaggag gggacctgga 26220
 35 gtggtgggtc aggtcttaag agttcctggg ggaggtgcaa gtcggaagaa gcagaaatgc 26280
 ggaacctggg gtgtatttga gccacaaaat atctactgag cacctgcctc ttttggggg 26340
 tagggctggg ctgagtggag gaaggggag aacacatggc agtgtctctc catggccacc 26400
 agatctttgt ctgcctgct cggctcttgg ttctagcact agggacctgt gcagacggca 26460
 40 acctgctct tttatctct ggctctcttc gcagcttatg acaatggtga tttctggcat 26520
 ttgcacaaca tttcacattt tacttgaggc tcacaatgac tttaggagaa aaatggcatt 26580
 ttacaacca gaacacagat tcagagatgt tgtgacttcc ccagggtca cacagcttgc 26640
 45 tgcaaggcaga gccagggtta ggacctgagt gtctcactc acagcttctc ctaccatggt 26700
 tcacagtga ctgtctgcag ggctggtctt ggaaaacct ggacacagc tctcttgcct 26760
 attcatccac tttctagagt ctacgctct ccacacgctg catgtgccc catgactccc 26820
 50 tgccaccacc ccagacaatc tttcccaact tggctttgct ctctccaaag agccgctct 26880
 ttctggaaga gcttcttccc tatcaaatca tatttgtttt attctgggct aggcacggtg 26940
 gctcacacct ataactctag cactttggga ggccaaggca ggaggatcac tggagcccag 27000
 55 gagttcaaga ccagcctggg caacatagtg agacctgtc tctaaaaa aaacaaaaa 27060
 aaaactgtat ttgtcttatt ctttacctca cctcctgct ctctctctt aaaccagctt 27120
 tttctctaag tttatctata ccagcgtgtt actgctaggc attacctga actcccaacc 27180

ES 2 293 114 T3

tcccagcctc cccctcagg taacgtaact gtgctgtacc agggaccatt tccaacactg 27240
 accgttgtag cagcgctggg gataccagc cagatcctcc actgatgagc agggaccagcc 27300
 ctgcccgttg agttttgtct acgggcccac tctggcaaca aggtctagct tcttgagtgt 27360
 ccaggacctc tgggcaaaag tgctgtcttt gagtacagtc ttgcccata ttgtaccca 27420
 aattcaganc caagataaca ttcccttggg gtctatcttg ataacactcc gtctaaaagg 27480
 agagctttct acatttgttt tgctctcacc accccttaac tgtccctgct gctcagatga 27540
 aatctctgac agccaggcca gccaaagccct ccttctgtc tcccttccca gcagtgttcc 27600
 gtctccaatc cagtttgggg gctgtttcc cttttgtccc atcctttggg catctctaca 27660
 ccacactcta cctccatgta cacataaaga cacttttggg cttattgaga cttggaaga 27720
 aaagagttag gatagcccag agattmagag cctgggctca gaagctagac cgctaaagg 27780
 tcaaaactta aacttcttaa ctctgtgacc tcaggcagggt gactcttcac ctctctgtgc 27840
 caagttgtgt gcattctgaa aatggggctg agaacaanaa ctagctgttc ggattattga 27900
 aacaatagag tgaatacctg tgacacgctt aaacaaggc atggtacatt ataagcactc 27960
 aatgaatgac agttgttatg attcaaatga catgttactc ctcatagag atgtcactca 28020
 gagtgtactg aacccaacag gttccatgta agcacttcca gccagagag cacatgtgac 28080
 tctttgggat ttaacttat gctccaggct gggttgggct ggtctaattg ggcatttgc 28140
 tctctctgac ccatcaaac cctctatct cgggttgtct cggtaaatat gaccaagttc 28200
 cagttacaca ccaacatgaa tagatatgtg ctccatttat ctgtgtgtgc aaacaanaa 28260
 accctgatca tgggtggcct aacacaagca ttttattaac tctcacagtt cagtggttga 28320
 ctgagttcag ctggttgggt cttctgtgtg tctactagg gatctctca ggagctgcag 28380
 tcagatggca gctggggttg gcaccccttg gacccctaat tggcaccag ggatagctag 28440
 acatctcttc ctctctgga acccctaaga gttaccctct ctcaaggte tgtccgcat 28500
 gtctctccag cagggtagtc aaactttcta atagtggctc aggttctca aaacaanaa 28560
 aaaaaataga agcttcagg ccttcttaag gcttaggcct ggaactggca acagattcc 28620
 ttctgtgtct tctattgggt ttgcagtcac agcacaggct cagcttcaga aagtagggga 28680
 aacactccac ctctcaatg agaaagtac caagaatttg tggccattct taatccatgc 28740
 acaantcaca aaagagaaga ttaaaanaa actaatgtgc tgttttttaa aaaaaaatt 28800
 agaattcctt ttggagagca aataaaaact gatttctctt ctttctgag attcatctcc 28860
 agttgataat gaaaatgtaa ctttccatga gccacaatga atgatcacac attcattcct 28920
 tccatgacta tcaagaccta ctatttgca ggcacttggg ctgcaagat atgaccttgg 28980
 ctctgtattc aaagggttca taatctaate tggggagtca caaggggagg agaccaacgg 29040
 catgccatgt gacaaggcag cctgggaant aaagagatca tgagagagtt tgaanaactac 29100
 aagaaacatt cattgagcat gtactatgtg ctaaaacctt tctttcata actcacttaa 29160
 tcttcacaac aaccaggcaa gacaatttgt tggctgggca tgatggctca cgcctataat 29220
 cccagcactt tgggaggtcg aggcaggcag atcatgaggt caggagtcca agaccagcct 29280
 ggccaagatg gggaaacacc gtctctacta aaatacaaaa aattagccag gcattggtgt 29340
 gcgtgcctgt aatcccagct actcaggagg ctgaggcagg agaattgcct gaactcagga 29400
 ggtggaggtt acagttagcc aagatcacac cattgcactc tagcctggtc gacagagcaa 29460

ES 2 293 114 T3

gactctgtct ccaaaaaaa aaaaaaaa aaaaagaca aatctgttca ccctgctttt 29520
 acagatgaac agtgagctgg ccaaggtctc tcagctagaa aatggtgcag ctactgttga 29580
 accagatata cctgggtcca agacctaggt ccttgacctg aatcactgta gaagccacaa 29640
 attgcacaga tgacaaagag cagaggccat tttcacacct atgtcatgtt ctggcttccc 29700
 caagactggc catgaagcct gctccctaga aaacaggaag agaatatgc ataaaccagg 29760
 gcagctcatt tctctcttcc gtgttctgtc cttcagccct gagaccagc tggctctcatt 29820
 ttcttggggc aggcgaggtt cctggccaat gtctctcagt tccatgtgtc ctgctgagtc 29880
 tccgcacctg tttgcctgc tcagtccttt cagccacagg gccacttggg ccaagccacc 29940
 tgtcccccct cccagccagc atccctgaaa gtgatcccta gcttcccaga cctctgcttt 30000
 tcccattttt atttatttgt attggatat aattcacata ccataaaccc caccatttta 30060
 aagtgatcat acggttcagt ggtttttagt ataatacag agttgtgcaa ccatcaccac 30120
 cgtctaattc cagaatattt tcttctctt tcttctctt tttttctct tcttctctt 30180
 tttttctct ttttctctt ccttctctt ttttctctt taggtggagt tttgtcttt 30240
 tcaccaggc tggagtgcag tgacgcaatc tcagctcact gcaacctcca cctccagggt 30300
 tcaagtgtt ctcctgctc agcccccta gtagctggga ttacaggcgc acaccaccac 30360
 atctgataat ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttgag caggctgttc 30420
 tcagactcct gacctcaggt gatctgccc ccttggctc ccaagtgct gggattacag 30480
 gcgtgataag ccaagcgcc cagcccccag aacattttca tcacctacaa aggaaacccc 30540
 aaatccagta gcagtcact cccattctcc ccttcccctg tccctggcca cagtctactt 30600
 tctgtctcta tagatgcta ttctggacat tteetataaa tagaattgta tatgggtgtg 30660
 ccttttgtgt ctgtctctt tcaactcagca tcagtcttc caggtccatc catgttttag 30720
 cctgtgtcat tgcctcatc ttcttatggc taantaagat tctgtgtatg aatgtaccac 30780
 attttatttg tccattcacc cgtcagtggt cacttgcatg gtttccactt ttttggcgat 30840
 tctgagtagt gctgtataa gcattcgtgt gcacattctg gtggatatcg aatcacttct 30900
 ccacatctta gtaacacag tcacttactc cccactctgt catcttcta tctgcagtat 30960
 cccaccgca ggacgctctg ttcctctgac cgaggttgta aaaagggatg gatggaccgg 31020
 cagagcaaa gtaacctctg tttcttttcc cgagacccta ggggtggatg gtctggcatc 31080
 ttggtgacat ttgtgatgcc caggtcaggt cttcagctc tgcctcagc tgccctcttc 31140
 caccatcacc aagccatagg cgagtctgcc catgcttcgg ctctgtcccc agcagaccag 31200
 ctgctgactg taacatgac tccagttttc cagttagaga agaagctcct aaaaacctag 31260
 caggttcagg attctaactg gtgaaaaatt cacatggcct atagcatcat ctgagtattc 31320
 taaacttttc cctgaattt cctcaaaggt tgaggacat gaacttttac cccaggga 31380
 cctggcagca ataccatata taacctgcag aattttttt gttttttatt ttattttatt 31440
 ttttaaacat tttttgact gttttattt gattttgatt ttgattttat ttatatctaa 31500
 gtgcagtgtc attgcatgac ctgcagaatt tctttatctc acatttttac ttaaaaaggc 31560
 acagggcagc gagcgagag gctggtgctt gtaatcccag cactttggga gggtaggca 31620
 gatggatgct tgaggtcagg ggttcgagaa cagcctggaa aacatggtga aacccgtct 31680
 ctactaaaaa taaaaaatc agccagacat ggtggcacac gcttataatc ccagctactt 31740

ES 2 293 114 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

```

    gggaggctga gacgtgagaa tcacttgaac ctggaaggca gaggttgcag tgagccaaga 31800
    tcatgccact gcactccagc atgggtgaca gagcgagacc cctttaaaaa aaaaaaanaa 31860
    aggcacaggg caatttttaa aatctgcaa atagtaaaa aaaaaaatc agtggttata 31920
    atgcaaacac acacaaaaag gcatatgcc attactgcat tctactccat actgtatgtg 31980
    tatttgagtt agtataaaag ttattttaac attgctcact atttaattaa ttctcccttg 32040
    gaaactgatt aatcactctg gcactccagg aagatgtgcc atgttgattt catggctttg 32100
    cacatccctg gcaggctgtg tacccttga gggacttgtg cccctttgag aggccatgtt 32160
    ctatgccatt tatactaagt gagagcatac acctgttctg ctccctccat gggcaccttt 32220
    tcttataaag aaacaaaaa gccagcagaa tccacagtct tctgtgttc tctctgatct 32280
    ttattatggt ttgcttggtt gccttgccct gtgttcgttg tggtaggat gggcttgatg 32340
    gaagctgaag ctgcgtgggt tggaaagcct ggtcaagcc tagtctctcg cccgggttga 32400
    gttaatgatg tccctccctg agaactcct ctctgcagtt ctttcacatc tgtggttcta 32460
    cgatgctttg acccctatag gaattcagac cggaaaggtg gtagtgcatg aagggaacca 32520
    gaagacctgt gaagtctctg cctggtgccc catcgaggca gtggaagagg ccccccggtg 32580
    agtcgcagtg ggagacagac acagtggccc tcagcggcga ccagatgagg ccttgccgag 32640
    gctgcttggg ccttccctc tcagcacagc cctgcaaagt cctgggtcct accggcttgg 32700
    ggacccctgc gctctggatg cactgcttgg cacaaactag tatctctggt agggccatgg 32760
    tgggttgtaa actgttgtaa caatccctga ccaactggt aatagctact accctgagca 32820
    tccttgggtg tccctggccc ctcccttccc ccagatcttc cagggtacct ccagacccc 32880
    tcctgtatgt ccacagcagg atcccttctg acttgtcagt gtccatactg agtgatcaag 32940
    gatagaagg agggaggag atggaaggga aggacgaagc gaggaaagag aagggaagg 33000
    ggaggaaaaa gcaaaagggg tgaggtttaa agggggggga aaggaaagtt tctcagatta 33060
    aatgcttaca atgacataca gatttggttg tcccttgat tgatgcttcg cttcaataca 33120
    caaagtcaaa atgttaaatc tcagaagcca caagggtga tgtatttcag cagagaatag 33180
    ttagaagac ctggattcaa ttcctaactc taacaccatt ttgctgtgtg tccttgggaa 33240
    aatggcttaa cctctctgag ttccagtgc ctcacctgta aaagcagaat aataatttca 33300
    ccaacttcat agggctgttg taaggattaa atgagatgat acttgtagag ttattgtaag 33360
    gtaagcccca tgcattgctg gcttacacac acacacacac acacacacac acacgcacac 33420
    acgcacacac acacacacac acacaactca cccctagaag tgtggtggtt ctgaccagc 33480
    actgtccaat tgaacttgat gcagtgtg aaatttctgt atctgtgctg tccaataggg 33540
    cagctactag gtacatgttg ctattgagta catgaatgc gactactgaa tttttgaag 33600
    agatgataga tgatagatag aagatagat agatagata atagataata gatagataga 33660
    caggtagata gatagataga tagatagata gatagataga tagatagata gatagagttt 33720
    tgctatgttg cccaggctgg ttttgaactc ctgggtcaa gcgacccctc tgccttggcc 33780
    tcccaagtg ctgggttac aggtttgagc cattgctccc agcctgaatt ttttaattaa 33840
    ttttaattta aatagccaca catgtctagt ggctaccata ttggacagc cagttctaga 33900
    ccgagtgtat tcaggatcat tccctcagca tcgtggggca aagagaaac tgccccaagc 33960
    tggcctgtag aaggctcagg cgaaggttcc ccaatgccgg gatgggggtt gcgctcagca 34020
  
```

ES 2 293 114 T3

gcatcaccac ttatgattct caatcgctaa tagctccact cagggttcatt tctcgggtcag 34080
 gggcattttct ttgggaatca cccagctctg ggagatcacag cagcctccac tcaggtagtc 34140
 5 cttgtttcaag acaagcggcc cttgactgac tgcagtttca gttccagctc tgcctatcaac 34200
 tcactcatta aataaactgc atctccagtg tgcctgcctc tgggctggat tttgacgtga 34260
 cctgggcaag caactccctg aacttcagtt tctcatatat tatatgaatt agctaagatg 34320
 10 gttcgtttta tcattcattc aacacatcca tcaccacgta gtaggtgtta gatattttatt 34380
 tcatacgtaa ctacgcataa gagactttgc taagttttag gtanaataca agtcccagat 34440
 acggagcaag tctcaaccac tgtacatacc tgaatgtgta attacatcac tgaagaggt 34500
 gccacagtaa atgccactgg gtcttgtgtt agtccattct cacacaaga actacctagc 34560
 15 cagggtgcgtt ggctcacgcc tgtaatccca acactttggc aggttgaggc aggcggatca 34620
 cttgagggtca ggagtttgat accagcctgg caaacatggt gaaaccccat ctctattaaa 34680
 aamtgcataa attagccagc tgtggtggca cagcctgta atcccggtca ctccgggaggc 34740
 tgaggcagga gagtgcctt aacccgggag gtggaggttg cagtgaaccg agatcgcgcc 34800
 20 actgcactcc agcctgggtg acagagtgg actccatctc agaaaaaat aaaaataaaa 34860
 ataaagaact acctgagacc aaatacttta cgaaaaaaa gaggtttaat tgactcacag 34920
 ctccacaggc ttaacaggaa gcctcaggag acttacatc atggcagaag gcgaagggga 34980
 25 agcaaacaca tcttaccatg atggagcagg aggcgagttt cgggggatgt gccgcacact 35040
 tttaatgat cagatctcgt gagaactcac tcaactatcac gagaacagca aggaggaagt 35100
 ccgcccccat gattcagtc cctcccacca ggccctcct ctggcacatg gggattacaa 35160
 30 ttcaagatga gatttgggtg gggacacaga gccaaacat atcagatctc aagaagggag 35220
 aaattcttct tggaggagct ggaggggctt tgtggagagt ttcagaatgc tttgccact 35280
 aggtttgctg tatccatttc tcttcatgta tcccaaagac caagccaaga aaccagaagc 35340
 35 ctctggctcc actggcccat gggctccctc ggtccccacc gtcactaatg gccattttgc 35400
 atgtctctct cccaggctg ctctcttgaa cagtgcgaa aacttcactg tgcctatcaa 35460
 gaacaaatc gacttcccg gccacaacta caccacgtaa gtgccaggc tgcctggctg 35520
 tcttagttat ctactgctga gtaataaatt atcccaacc tcagaagcct gaacacaaa 35580
 40 acgectattg tctcccacgg tttctgtggg tcaggaatct gggaaatgact ttgctgcgtg 35640
 gttctggctc aaggtctgtc aggttgtagc caagctgtca accagggctg cagtcatctc 35700
 taggcttgac tggggctgga gaacactttt ccaagctctc acacagttgc tctggggaga 35760
 45 gctcagttcc tcaccacgtg aacctcgccc tagaccactt gagtatcctt ggtatatggt 35820
 ggctggcttc tcccagagca agtgacctaa gagagacaga gcaagcaacc aagagtataa 35880
 ccaagatgga agccacagtc tttgggggga gacccaaca cttctgccat atgccattgg 35940
 tcacacagat caacctgggt ccagtgtgag aggcactgc ccaggggtcc caggaggcag 36000
 50 tgatcatttg gggctttcat ggaacctctc caccacactg gctcactcct gggaaagaga 36060
 cagatctggt ttcaatcgag atgtttgttt gtttgctttt aattatgcac aggagaaca 36120
 tctgccagg ttaaacatc actgtacct tcacaagac tcagaatcca cagtgtccca 36180
 55 ttttccgact aggagacatc ttccgagaaa caggcgataa tttttcagat gtggcaattc 36240
 aggttggtgg tgccttgtag actgggatgt ggggctgtgt gtctaggat ggaggatgtc 36300

ES 2 293 114 T3

5 aaacagccaa gaggccgggc cactgggtct tcataatgtg gctcacattt actgagcatt 36360
 tagtaaatcc acccgtgcg ctaagggtctt tacctacgct acctcgtcaa atcccaaac 36420
 aatccttatg agtgagagct acttggtgta ttcttttctt gtggtgctg tagcaagtta 36480
 tcaaagctta gtggcttcaa acnacacata ttgtcttatg ttgccagaga tcagaagttg 36540
 gagatgattt tccctgagcc agggcggtgc tccctccggg actttaaggg agaattcagt 36600
 tcttcagctt ttccaccttc tggagctgca ttctttgcat ttcttcaag ccagcagcat 36660
 10 aacatcttgc ctgagtggcc actttcactc cctatcctgt gtccaatctc cctttgcctc 36720
 tgtcttcaaa agagagagag catttacaa agggggcatt taaggacca ctggataatc 36780
 caggataatc tcccatctca agatccttca tttaggctgg gcacgggtggc tcatgcctgt 36840
 aatcccagca ctttgggagg ctgaggtggg tggatcacct gaggtcagga gttcaacacc 36900
 15 agcctggcca acatgggtga agcccatctt tactaaaaat acaaaaaaa aaaaaaatag 36960
 ccgggcatga ttgcaggctc ctgtaatccc agctactcgg gaggtcagga caggagaatc 37020
 gcttgaacct gggaggcaga ggttgcagt agccgagatc gcaccactgc actccagcct 37080
 20 aggtgacaag agcgaactc catctcaaaa aaaaaaaaa atccttcat gtattcgcat 37140
 ctgcaaagag ctttccctag gggagtacta ggaggtaaa cagaaaagat atttgataga 37200
 gtgccctgaa ttccagtcta ataagtttgg acttgatctt taatgggggc gtggggggca 37260
 25 ttaaagggtg ttgggtacag gagtgtctg ttgaaagtgg tatttttagga caatgagttt 37320
 aacagtgatg tgtccagac ggggttaggg agagtggga gatgcgattg tggctgccac 37380
 aataacactt gtgcgagttt ggtggggctg tacatatggt tcttcaatca gcatttttcc 37440
 30 tctaaaaacc ttaagcaatc ctggctatgc agggagatgt ctggcggttg cgttaactac 37500
 acccagcagc catagagact gtcccttgtt gatccttcag ggcggaataa tgggcattga 37560
 gatctactgg gactgcaacc tagaccgttg gttccatcac tgcgtccca aatcagttt 37620
 35 ccgtgcctt gacgacaga ccaccaactg gtccctgtac cctggctaca acttcaggta 37680
 actccaaggc ccaggtcaaa ctacccactg ggtgaatcg cattcccagg aactgggtgag 37740
 actaattttg gtttccaagg caacaagatg aatgaaaaa gactttctct aagaactagg 37800
 tgataactga attttttcca taatttttta aaattctcaa aagagatgca cactctttat 37860
 40 ttttttactt attttttttt ttttgaatg gagtctcact ctgtcaccca ggctgaagtg 37920
 cagtggcgcc atctcagtca ctgcaaaact cgcctccca ggttcaagcg actctcctgc 37980
 ctccagcctc caagttagct agattacagg cggatgcaca ctgtttataa aacaaaacta 38040
 45 ttgggaaaca gaaaagcata gggggggtc aaatcaccc ataattccc taccctgaaa 38100
 taatcaataa caaccctcgg gggaattttc ctcatctgta ccaattatct catacagctc 38160
 ctatgagata atagcatata tatatatatc ttgtggtatt ctgcagggtt ttcatacca 38220
 cagccactca aaattctttg taacctcac attaatgac ataacattcc atttttagg 38280
 50 tgaacaata acaactgcta caattcagga agtggtttct tttctttct tttctttct 38340
 ttttttttt tagatggagt cacactctgc ttgccaggc tggagtgcag tggcatgac 38400
 tcagctcact gcaacctctg cctcctaggt ccaagcgatc ctcccacctc ccaagttct 38460
 55 gggaccacag gcatgtgcca ccacaccag ctattttttg tatattcagt agagatggg 38520
 tttcactgtg ttggccagtc tggctcgaac ctcttgacct caagtgtct tcccacctg 38580

ES 2 293 114 T3

gcttcccaaa gtgctaggat tacaggcatg agccactgtg cctggcccaa ggaggggttt 38640
 ccataacca agcactcccc atcgccatcc ctaaattccc caacaacctt ggaagggaaga 38700
 tattgtttct ggaagatgat ttgcccaga cccacagctg atagtacatg ttgcataatt 38760
 ctaaccacag tcaactctgac cccacactca cactccatcc ctcccttccc atctcatgat 38820
 ttcttcacct acgcctccat gattgaatat ttgagttgct tccagttttt ctattacaag 38880
 taaccacagt gtgcatcttt gcacataaac ttctctttga attccaggtt acttccttag 38940
 gataaatttc tagacttatt gaatcaaggt ttgtgaacat tttatcatat gctttttatt 39000
 tttaaaaata tctatagtta taatgtttca ttttttttcc tgagacagag tctcactctg 39060
 tcacccaggt tggagtgagc cgggtgcaat tatagctcac tgcaacctct gcctccaggt 39120
 cccaagtgat cctccacctt cagcctcctg agtagctagg actacaggtg cagccacca 39180
 tgcccagcta atttttaaaa tttttttgta ggtcgggggt ctactatat tgcccaggtt 39240
 ggttcataac tcttggtcca agcaatccgc ctgccttggc ctccataagc gttgggattg 39300
 caggtgttaag ccactgcacc tggcctataa ttttcatttc taggaktttt atttggtgct 39360
 ttttcaaggt catctattat tgttccagtg agtcccatc ttaccttaag gactcactc 39420
 ctctgtcca ttctactgta tcattccttt cataccgacc tattatctga agtaacttgg 39480
 gtgggagttc tctctgtggg ctttgaata ctgtcttcag tagaaaagat cttatgcana 39540
 gttctgcatg tgctgtgtgt tatggagtat tccctatata ttactcaag cagctccata 39600
 aactggcagc cagccctta aatgtgtttc tgtttctgtt tttttgtttt ttggtctgca 39660
 tgatgtttta aaacttgaga caggccaggt ggggtggctt atgcctgtaa tcccagcact 39720
 ttgggaggcc aaggtgggag gatcacttga acccggggtt ttgaggctag cctgggcana 39780
 ataggagagc cccatctcta caataataa tttttaaac atcagccagc tgtgggggca 39840
 tgacactctg gtcccagcta ctcaggaggt tgaggcagga ggattgcttg aacctgggag 39900
 gtggaggttg cagtgaaccg tggttgtgac actgcactcc agcctgggtg acagagttag 39960
 acccttcatc ggtggccact ggttgagctt gagtatcagt ggtcctattt agaaaggggc 40020
 tgggctttct ggttcatcac tgtcccgcc actccttagt gcttatacct ggccacatc 40080
 actcattttc gtcatctgcc tggccctgt gtagacattt gattttgaaa ccttgactc 40140
 aaaggcaggt tgatgctttt tgcttctctt ggtcaaatg aatttcatcc aaggcaatgg 40200
 aaccagctcc taattgtgat aactttttga tcatccctg ccactgtgct gaataggctt 40260
 atggccatta agaagagagg acaggatgaa tggccctctg actgactgcc ctccaggggt 40320
 gtttttttag ctgtcagcag aagcatgagg ggcagtgtac caatcaggtg tcagcaagtg 40380
 tccttccagc gactgagttg agcacaataa catctgtccc tggagagacc tgagccctct 40440
 gaaggcctca gccagttatg atgttaatgt tcttttagaa caaagtggta gagcatttgt 40500
 tgtctggaat gaggaccaga agaatctctt ggccaaaaat aaattgttga gggccgggag 40560
 cagtggctta tacctgtaat ccaacactt tgggaggccg aagcaggagg atcacctgag 40620
 gtcaggagtt cgagaccagc ctggccaaca tgggtgaaac ctgtctctcc taaaaataca 40680
 aaaaattagc ggacgtgggt acaggtgcct gtaatacagc tactgggagg ctgaggcagg 40740
 gagaactgct tgaaccggga aggtggaggt tgcagttagc cggggtcagc ccacttact 40800
 ccagcctggg caacagagca aagctctgtc tttaaaaaca acttaataa ataataaat 40860

ES 2 293 114 T3

5 tgttgaggtc tgatgagtaa gtggacaagt tattttccag cagacacaca aaagagaagg 40920
 aaattacagg ttatacagg tttttcaga aatataactt tctaaaacat aggaagtga 40980
 agaagttagt cacattacag aattctgttg tttagaaaat gacctgtggc gaattgtcct 41040
 tattcagtga ataggtgatt cgccttatgc acgacctgtg tgaagtggat caggccaccc 41100
 agaatgcacg acgcgcttct caggcccagc aggagtatgt gtctgtgtta atttctctgtg 41160
 gctattatga ctaattgcc acaatgtggt ggcttamaac aacagaaatt aattcttctta 41220
 10 tagttcttga agccagaagt ttggaatcaa gatgtcagca gggccacact cgctctgatg 41280
 ctctacggga gggctccttc ttgcctcttc cagcgtcttg tggctccagg cattccataa 41340
 ctttatagca gcgtcccaca aattctctgc tccatcctca catggccttc tccactgtgt 41400
 ctctatgtct tcaatctctt tttttttttt tttttttttt gaggcagggg ttcactccag 41460
 15 tctcttagac tgaagtgc aatggctaatt tggggtcact gcaacctctg cctcccgggc 41520
 tcaagcgtat tgatctctcc tttatcttat aaagatacta gtcattggat ttggggctta 41580
 ccctaaatcc aggaataatct catcttgaga tgtttaactt aattatatct gcaaacactg 41640
 20 tattttccaa taaggtcata tcacagccac tagggattag atacttgaac atattcttatt 41700
 tgggggtcca accattcca gtgtacgaaa aacactcttg ttcaaggccc gatgtttctc 41760
 agggcatagc cactgacta cctgcatcag aataatcact tggtaacctg actggaaata 41820
 25 cagactccta gaacatctc agagcttctg caaccactct ttgagtggg ggtcaggag 41880
 tctgcctctg aacacactca cccaagtga ttctttcttt cttttttttt tttttttttt 41940
 tttgagatgg agtcttgctc tgtccccag gctggagtgc agtggcgtga tctcggctca 42000
 30 ctgcaagctc cgtctcccg gtccacaga ttctcttgc ttagcctccc gagtagctgg 42060
 gactacaggt gcccgccacc acaccggct aatttttttg atttttagta cagacggggg 42120
 ttaccatgt tagccaggat ggtctcgatc tctgacctc gtgacttgc tgcctcggcc 42180
 35 tcccaagtg ctgggattac aggcattgac caccgcgcc agccatcac ccaagtatt 42240
 ctgacctta gtttaagagc cactgtaca agactatga agcagaaatt cactgtctta 42300
 ctacacatg ttaaccttc caggcaaac aactcacata gggagataat gccaatccca 42360
 gggcaggcag tggcaatgca tgccttctg cgaattaaa acaaatcac tgcctgggca 42420
 40 cgttggtcca tgcctataat cccaacaatt tgggaggctg agtggtgtgc atcacttgag 42480
 ctcaggagtt caagccagcc tgggcaaac agtgagacca tcactcttat aaaaaattt 42540
 taaaaattag tgggtgttaa tggtttgcac ctgtagtccc agctgcggg aggtgaagt 42600
 45 gggaggatga cttgagccc gaggcggag gccacagtga gctgtgtta agccactgca 42660
 ctccagcctg gatgacagag ccagatcctg tctcaaaaa aacaaaaa aacaacaaca 42720
 acaagataa atcactcaat acatcagca gagaanaagc tctcttgaaa tagtcacatg 42780
 caaagaaatt gaattccctc cagtcagaaa gagccactaa agtgcttgag aatatctgat 42840
 50 cgatttcaat gtcaggtttt gagaggtttt ttaaaaaag tttcagatgt ttcttactat 42900
 tttttggcag aacatctgac atctgcttct tctcttccct acatcttcta actagacggc 42960
 gaattataa ctcaaaaa ataaacatgt atatgtact ttatctaaa agaattcata 43020
 55 aagtgtggtg agaagaagg gcatatttaa aagttttatg aagcgttcat ttaagcctc 43080
 cttaattatt cttgaaaaa aaacacacc acttttcttg actgcagcac tggtagggg 43140

ES 2 293 114 T3

5 tgcatatcac gggtagactgt gatgatttgt gcctggcgct taatttttaa agttagtact 43200
 gagtgatgac agagagaggt caatgccact caaagaatat tttgtttgtt tgtttgtttg 43260
 tttgtttgtt tgagaggcag tcttactctc tcaactcaggc cggagtgcag tgggtgtgata 43320
 tcggctcact gcaacctctg cctcctgggt tcaagtgatt ctctctgctc agcttctctga 43380
 gtagctggga ttacaggcgt ctgccaccac atccagctaa tttttgtatt tttagtagag 43440
 10 atggggtttc atcatgtttg ccaggctggg ctcaaaactcc tgacctgagg tgatctgctt 43500
 accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc attgcacctg gccaagaaga 43560
 attttttaca tacttttccc aagagatggg gccacaccac accataccag gccacaccag 43620
 gccatgccat gctagacagg gccacaggag gaagtaccag atccgctcaa gaggcagaat 43680
 15 aaagggtaaa gaatggtcca gagctttatt gtgttactca gtggaagggc aaggcaggac 43740
 tagggaaaca gcttaggggt aactactttg aataatgcca gtaggttctg agttacagga 43800
 atggtctcta aatgtctggc cctcacccta cctgtccta aggagaaata ctggagagtt 43860
 agaaaaggag gtggttgagg gattggttgg agggtttcta atatgatttt cacaccctca 43920
 20 caaaagctgg attgcagagg agatgtaaac aacttcagcc ttgggaggcc aagatgaag 43980
 gatggcttga agccaggagt tcaaggctgc aacaagctat gattacacca ctgcactcca 44040
 gcctggttga agaatgaga tcctgattct acaaaacatt tttgaaaaaa acttttttat 44100
 25 ttttcttttt cctttctttt tttttttttt tttttgagac agtcttctc tgtcaeccag 44160
 gctagagcgc agtgatacga tctcggctca ctgcgacctc catctcctgg gttcaagtga 44220
 ttctcgtgcc tcagcgtcct gagtagctgg gattacaggt gcctgccacc atgcacggct 44280
 30 aatttttcta tttttagtag agtgggggtt tcacctgtt gtccgggctg gctctgaact 44340
 cctgacctca agtgatccac ccgcctcggc ctcccaagt gctgggatta cagggtgtgag 44400
 ccacggctgc cgaccaaaaa atttaaaat aaaaattagc cacctgtagt ggtgcacgct 44460
 35 tgtagtccca cccagctact tgggaggctg aggtgggagt atcacttggg cccaggaggt 44520
 ggaggctgca gtgagctctg atcatgcca tgctctccaa cctgggtgac agaacaagac 44580
 cccacctcaa aacaaaacaa aacaaaaaac acnaactcag ctttagttt ggccctgtga 44640
 ttaatgattg ccaantaggc atacacagaa tctaagaaaa tacagtttgc tgagggtgtc 44700
 40 ctgtctccag tccagtaatt agtatgcaag atttaccacc gccactccc actttgttct 44760
 agatgccaaa cctctcttc ccccttaagg aatagtcata ttgcttgaa tttttttttt 44820
 ttaattttct tgcttgttgt taatcctgtg ttggttttaa atgtgcattt taatcttaag 44880
 45 cgacaagctg attttccgtc actctgagat gatgcaggta cagggtgtga catggggagg 44940
 ggggactgct ctttggttcc aggtgggttg agagagacc agggcttttg attgtgttcc 45000
 ttccctgccc acctgtcaca gagccagggg acagaccagg aggaactagac aggccactgt 45060
 50 tttggctttt ccttccataa aataccagca ttttttgcca gatgcagtgg ctcatgctctg 45120
 taaccccaaa actttgggag cctgaggcag gcaaatcact tgagctcagg agttcgagac 45180
 cagcctgggc aacatggcaa aagccctct ctacaaaaa taaaaaaat tagccgagca 45240
 cgttggtgca tgctgtagt cccagctacc tgggagactg aggtgggaga atcatctgag 45300
 55 cctagcaagt caaggctgca gtgagtgtta atcctgtac tgcactccag cctgggtgac 45360
 agcgtgagac cctgtctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ccccaaaacc 45420

ES 2 293 114 T3

cagcactttc aaagggatct tacaatata gatccttttc ttccctacaga tacgccangt 45480
 actacaagga aaacaatgtt gagaacgga ctctgataaa agtccttcggg atccggtttg 45540
 acatcctggg ttttggcacc gtaagtctcg ttccccagct ccgggcaccg gcacccctatg 45600
 actgtgtcct aattactgct gtggggcctc catggagggg aggggttttg tctcagcctt 45660
 cagctagcac tgggcatttc gcacatggga taaaagaggg agaagatgtt ctccggctgc 45720
 tgtccctgaa tgagtcatct gacgagtaca gtagtgggce tggaaagcaa ttctaactt 45780
 cggctttaa aatactctga tacttaacaa gagagagaaa gaattctctc tgtaaaatag 45840
 tttgtaagta acagaatcca attcaaatg gcttaagggg aaaaaaaaaa gttttgagtg 45900
 ggcttttttg ggttcacgta actgaaaaaa tccagggggtt atttttaagc tacaagcatg 45960
 gttggatcca ggtgtcmeta caacaacatc atcatcanga acttgccacc ttccgtgtct 46020
 tatatacgtc ctccctgggc ttggcagcca tctctctatg aaggtatcag gcagcacctt 46080
 cgtatcgacc agtttagcaa cctcagtga aagaaaacac ctctttgcca gaaggttcag 46140
 caaaggctc agacaaatgt cattggctct gattggccca ctatggatga catgcccact 46200
 gctgaactaa tcaactgtac caggytcatg ccatactccc agtgggttagt gtcgaaccag 46260
 cctaactta gccagggggc cagcagagag gccaacaccc cagccccttc aacacacaca 46320
 cacacacaca cacacacaca cactacatgg actgaaaaga aaattggagt 46380
 gttgccttct gaagatggaa ggaagagatg ccagctatgc aaaaatcaac atatccacg 46440
 acatcctgtc caagagcatg ttatctatgt aacacagtga taagcaggac tagaagcaat 46500
 aagatatagc tgagagaatg caaagacgc tgggaataaa aaccacaagg ctgggccggg 46560
 caggttggct catgcctgta atccagctc ttggggaggc tgaggcaggt ggatcaacag 46620
 gtcaggagct caagaccagc ctggccaaca tgggaaacc ctgtctctac taaaaatgca 46680
 aaaaattagc tgggcgtgac ggtgggtact tgtaatccca gctacttggg aggctgaggc 46740
 aggagtatct cttgaaccca ggaggcggag cttgcagtga gccgagattg cggccactgca 46800
 ctccagcctg ggcaaaagt cgagactctg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaccac 46860
 gaggccaccc agacattcct tccctctgct tctgaangta tgtcaaacct tttggaggag 46920
 aagcttgtct gaaaccctca ccttgatgg agaatgata gcccttcagt gggctctccc 46980
 ttaatgtgtg ggccccagtg cttgtctatg taaaaccttt atgggtccaa gcacaccctg 47040
 caggtctgaa gcaggtatgc tgagagtcat ttccagtctg cgtagtctct gcctcagcca 47100
 gcacttgaac gcctctatcc aagtcacagc atgaggtctc gtcctctgat agaaccacaa 47160
 attgcacgtt gaagcaaaag agcgttgctc tgaatttcac ctgagttaac tctccactc 47220
 tgtttttagg gaggaaaatt tgacattatc cagctggttg tgtacatcgg ctcaacctc 47280
 tctactctcg gtctggtaag agattctctt ttccatgctt taggaaaatg gtttgagaa 47340
 ggaagtgact aacgcagcgc ttgtctgcat tctccccagg ccgtgtgttt catcgacttc 47400
 ctcatcgaca ctactccag taactgtgtt cgctccata tttatccctg gtgcaagtgc 47460
 tgtcagccct gtgtgtgcaa cgaatactac tacaggaaga agtcgagtc cattgtggag 47520
 ccaagccgg tgaggccgct gtgttcacag gacaccaaga catggagaga ttccatgaaa 47580
 tcactcagaa atgcacgaaa attagggcca aatcacaggc ttcatcctgt agtggatag 47640
 tcgtgggtt ctaccccgat caaccaactc tcagataaat ttttgggtt tagagaagaa 47700

ES 2 293 114 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

tggaaacaaa aatggagggg caagatagag ggaaggcaaa tttttatgtc taggacttgc 47760
 caattttgtc atttatttat ttatttattt atttatttat ttatttattt atttatttcc 47820
 agatggagtc ttgctctatc acccaggctg gagtgagag gcatgatctc ggctcactgc 47880
 agcctctgcc tcccagggtt aagtgtattt cctgcctcaa cctcccaagt agctgggact 47940
 acaggggcac accaccacac ctggctaatt ttgtatttt tagtagagat ggtgttttagc 48000
 tatgtttggc aggtgtgtct caactcctg acttcaaatg atccaccac tcggcctccc 48060
 acagtgtctg gattataagt gtgagccact gagcccagcc tgttttgtca tttattaat 48120
 tggatatagc aaaaagaaa aagaaaaga aaataacaa ctttggagaa caatttggca 48180
 gtgactaatg ttttaattgg acatacttta cagcctggca ttttcagtcc tccatactgc 48240
 ccctagagaa acactcacat gagtaccgc agtacctgag tacagatgt tcaagcagg 48300
 attgtttatt aaattatcaa taatatatga ttattaacag tgaagaaata gcatctaac 48360
 aaatatccaa caggtgaatg gtgaactat ggtaaatcca tagaaggaa taccaggcac 48420
 cagcttaaaa aantgagata gateataata atggcaaca tttacacagc acttctaant 48480
 gcttttatct ttaactcaat cttcacaa caactgatga gacagatgct actattatct 48540
 ctttctatat atgaggaat tgagccacag aaaggtttaa taattggccc aaggctgggc 48600
 acagtggctc acgcctataa tcccaactc ttgggaggcc gaggcagyc gacacttga 48660
 ggtcaagagt tcgagaccag cctggccaac atggtgaac cccatctcta ctAAAAatc 48720
 aaaaattagc cagycgtggt ggtgcatgcc tgaagtccca gctacttggg aggttgaggc 48780
 aggagaattg cttgaacctg gtaggcagag gttgcagtga gctgagatca tgccattgca 48840
 ctccagcctg agtgacagg ggaactctg tctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaattat 48900
 aggaactgac aagagcagat ctccaagaca ttttgttaa agaaaaaag caaactgtag 48960
 aacaatatat gttatatgat atataggta aaaaaaatc actagacaca gaagctaact 49020
 tgtatatttt ctgcatgtat attctatata tacacaagt tacacacaca cacacataca 49080
 tatacatatg tgtgggtgta tatatgtaca caaaattgta ccagtggctg ctctcggaaa 49140
 ggagcttagg gtgggggagt aggagtatgc aaagagattt tagcgtcatc tgtattgttt 49200
 tgatttgatt aattcagact ttatcaagca ggtcctctgc gttcaactcc atgattttcc 49260
 ccaaagataa atctctggtt cctaaaaaca aagacgattg gctagacgtg gtggctcacg 49320
 cctgtagtcc cagtactttg ggaggccaag gagggggat cacctgaggt caggagttca 49380
 aaaccagcct ggtcaactg gagaacccc gtctctacta aaatacaaa aaattagcca 49440
 ggcattggtg cgcattgctg taatccagc ttctctagag gctgaggcag gagaatcgct 49500
 tgaacccagg aggtggaggt tgtggtgagc caggattgca ccattgcact ccagcctggg 49560
 caacaagagc gaaactccgt ctcaaaaaa aaaaaaaac aaagacgatt tctttgtctt 49620
 tccctcatcc aagaacatga ttgtcctgtt ccagcagctg atgcacaatt cactgtccat 49680
 tgtatatgca ttcaaattt gaaataaag ttcatcttg cagctaaac taatcaccac 49740
 ttcattggcc aagatgagat gaaatttaac aaacatgta ataatttaag ttgcaatagt 49800
 acaaatctct ggagatactg antctagagt tactgaatt gacagaatc acaaaagaaa 49860
 ttttatgcag caactggggg gtccantgta aaacattaa gcagtaagct gtggctgtgt 49920
 tgaatttaca agttaagatg catgggggtc cgctggcgt ggtggctcac tcctgtaac 49980

ES 2 293 114 T3

ccagcacttt ggtaggccaa ggcgggcgga tcaactgagg tcaggagttc aagaccagcc 50040
 tgaccaacat ggagaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aattagctgg gcatgatggt 50100
 gcatgcctgt aatcccagct actcaggagg ctgaggcagg agaatacattt gaacctggga 50160
 ggcggagggt gcagttagcc aagatcatgc cattgcactc cagcctggca acaagagtga 50220
 actccaactc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcatggggt tccatttctg atttatcttt 50280
 agactcagaa atcattaatt cttggttaat gagagttttg agccagcttg ttcaatagtc 50340
 tatcatttgg caaataggaa ttacagtgc ctttagatag gcaattcttg ataattctgt 50400
 acaaaaatgy gtaaaacttt aaaccatctt ttcttagaca ttaaagtatg tgtcctttgt 50460
 ggatgaatcc cacattagga tggtagacca gcagctacta gggagaagtc tgcaagatgt 50520
 caagggccaa gaagtcccg taagttaaat ctttttctct tttttttttt ttaagaanaa 50580
 tttactgtta aatataaaca catctagaaa cttgtacaaa tcaaaactga tggattttta 50640
 caaagtaaac atactcatat aaccggcact cagattaaac aattgaaat tactagcagg 50700
 agtccctttt atgccccctt ccaatcacta ccctctcttt ctctcttttt aatttttaaa 50760
 atttggtctg gcacgggtgc tcacacctgc aatccagca ctttgggagg ccaagggtgg 50820
 tggatcactt gaggtcagga gttcagacc aacctagcca acatggtgaa acctcgtctc 50880
 tactaaaaat acaaaaatta gccgggtggt gtggtggcac acatgtaatc ccagctactc 50940
 agaagactga ggcaggagaa ctgcttgaac ccaggagggt gaggttgtag tgagccgaga 51000
 ttgtgccatt gcactccagc ctgggtgaca gagcaagact ccatctcaaa aaaaaaaag 51060
 aaaaaaatgt atattcttaa attacaaacg aggtctcact atgttggtcca ggctggtctc 51120
 aagcagctct cccacctcag ctgtaccaag cccaccaact gccctctctt aaaagtagtc 51180
 attatctctg ttccaagat taattttact ttggctagaa ttttctaaaa actgaatcac 51240
 gtagtatgta agcggtatat acgcggttga gtgtctggct tcctttactc aacattattt 51300
 ttgtgagagt tgttcatgat gccatgtata gttcattctc attgtataat tctgttttat 51360
 aaatatccaa ctatttcagc catcctactg ttgatggaca ttgggtagt gtccagtttg 51420
 gggctaattg caataacgct gctatgctca acatatggca ctctactgga cagttacctc 51480
 agagtggaaat tgctgagtca taaggcagac atatgttcgg ttttaggaga tactaacaaa 51540
 cgggtgctgaa aaatggttgt tcacatttgc actctcccca gcagttcttg ttgctgggca 51600
 tcttcaattt ctagggctg aattaccaca aactaagtgg cttaaaacaa cagaaatggc 51660
 caggcatggt ggctcatgcc tgtaattctc gcactttggg aggctgaggg aggcagatca 51720
 cctgaggtca ggagtttag accagcctga ccaacatgga gaaaccccat ctctactaaa 51780
 aatacaaaaa aatagccagg catggtggca ggcgactgta gtcccagcca ctccaggagg 51840
 tgaggcagga gaatggcatg aacctgggag gcagagcttg cagttagcca agattgcacc 51900
 actttgagag gccaaagtgg gcggatcacc tgaggtcagg agttcaggaa cagcctggcc 51960
 aacatggcga aacctgtct ctattaaaaa tacaaaaatt agccaggcgt ggtggtgcac 52020
 acctgtaatc ccagctactc aggacgctga ggtgggagaa ttgcttgaac ctgggaggca 52080
 gaggtgcgg ttagctgaga tcacacctct gcactctagc ctgggcaaca gaacaagctc 52140
 catctaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagtctt ttctgctctt tttgaaatat cagttagttt 52200
 tcttcttttt ttctgttagt tgaattgtac tgattgattt tcaaatatta agccaaactt 52260

ES 2 293 114 T3

gcatttoetga agtaaaactca atttgaatgt gttgtactat tctttgtatt tattgctgaa 52320
 ttccattcac taatatttag gatttttaca tctcttcttg agaaagactg accaaagtgt 52380
 ttccattctt gtaatgttct tgttggtatt gtgtatgaag tgaactacag tcatgcatca 52440
 cttaatgatg gggatatgtt ctgaaaaacg catcagtagc tgattctgtg gttgtctgaa 52500
 tatcatggac tctatttaca caaacctaaa tagaatagcc tattatactt aggttatatg 52560
 gtgtagteta ttgctcctag gctgcaaac tgtacagcat gttactgtac tgaatacggg 52620
 aagcaactgt aacagaatgg taagatttgt atatctaaat atagaaagg tacagtgaag 52680
 atatgatata aagccttaaa aatggtagat ctgcataggg cacttaccat gaatggagct 52740
 ttaggactg aaagtgtctc tgggtgagtc agtgagtagt gagtgaatgt gaagcctag 52800
 gttgttaccg tgcactacag tagacttcat aaacactgta cacttaggct acactaaatt 52860
 tacttcaaaa tttttatctt tcttcaataa taatttaac ttagcttact gtgactgttt 52920
 tactttataa attttttaaa ttttttaact ctgtacagtg gtataaaaa attttctttc 52980
 tcaccgggag tgggtgctca tgcctgtaat cccatcactt tgggagggcg aggcagggcg 53040
 atcacagat caggagattg agaccatcct ggccaacatg gtgaacccc atctctacta 53100
 aaaaataaaa aaatagcca ggcattggtg caggcgctg tagtcccagc tactcggag 53160
 gctgaggcag gagaatggc tgaaccagg aggcagagct tgacgtgagc caagatcaca 53220
 ccactgcact ccagcctggg cgacagagca agactccac tcacacacac aaaaattctt 53280
 tctctataac cttattctat atactttttt ctatttttaa cattttttat ttttattttt 53340
 acttttttaa ttttttgtt aaaaactaag tcatggccgg gtgcagtggc tcacgcttgt 53400
 aatctcagta ctttgggagg ctgaggtggg tggatcactc gaggtcagga gttcaacacc 53460
 agcctggcca atatggtgaa actctgtctc tactaaaaat ataaaaatta gccgggtgtg 53520
 gtggtgcacg cctgtagtcc cagctactca ggaggctgag gcagaagaat cgcttgaacc 53580
 caggagggcg aggttgacgt aagccaagat catgccactg cactccagcc tgggagacag 53640
 agcaagactc catctcaaaa aaaaaaaca acaacacaca cacacacaca cacacacaca 53700
 aaaaaccattt ccaatagtgc taagtctat gaagaatgtg gaataccaca gtgtgataag 53760
 ggaatcatgt gggagaaaag ctgctagata ggggtgtcag gacaagaggt gacatctcaa 53820
 cagagggctg gcttttctga atttcatttt ccaaaatctg taaaataggt cagggtgcgt 53880
 ggctcatgcc tgaatccca gcactttgag aggctgaggc aggtggatca cctgagggtca 53940
 ggagttccaa acaagcctgg ccaacatgtt gaaatcctgt ttctactaga aatacgaag 54000
 aattagctgg gcattggtgg atgcacctgt aataccagct acttaggagg ttaaggcatg 54060
 aaaattgtct gacccctggg ggtgaagtt gcagttagcc aagatcacac cactgtgtc 54120
 cagcctgtgc gacagagtga gaccctctct caaaaaaaa aaaaaaatct gtaaatataa 54180
 gacaaggata cattatctca caagcgtctt caaaggcctg aatgaggcaa tgettacaga 54240
 acacatgcat ggtcctgata tctacaccta ataatgacg gctactataa atcatgtaat 54300
 attaaacgta actttataag ttaataaaat taaagaacct agaaccctgag ggcttgtcat 54360
 ggctaantag tttggaaact tgctttttca gagacctgcg atggacttca cagatttgtc 54420
 caggctgccc ctggccctcc atgacacacc cccgattcct ggacaaccag aggagataca 54480
 gctgcttaga aaggaggcga ctcttagatc caggatagc cccgtctggt gccagtgtgg 54540

ES 2 293 114 T3

aagctgcctc ccattctcaac tccctgagag ccacagggtgc ctggaggagc tgtgtctgccg 54600
 gaaaaagccg ggggcttgc taccacctc agagctgttc aggaagctgg tctgtccag 54660
 acacgtctctg cagttctcc tgctctacca ggagcccttg ctggcgtgg atgtggattc 54720
 caccaacagc cggctgcggc actgtgccta caggtgtac gccacctggc gcttcggctc 54780
 ccaggacatg gctgactttg ccaacctgcc cagctgtgc cgtggagga tccggaaga 54840
 gtttccgaag agtgaagggc agtacagtgg cttcaagagt ccttactgaa gccaggcacc 54900
 gtggtcacg tctgtaatcc cagcgtttg ggaggccgag gcaggcagat cacctgagat 54960
 cgggagttgg agaccgcct ggctaacaag gcgaatcct gtctgtacta aaatacaaa 55020
 aatcagccag acatggtggc atgcacctgc aatcccagct actcgggagg ctgaggcaca 55080
 agaatacatt gaaccggga ggacagaggt gtagtgaacc cagattgtgc cactgtctc 55140
 cagcctggga ggcacagca actgtccca aaaaaaaaa aagagtcctt accaatagca 55200
 ggggctgcag tagccatgtt aacatgacat ttaccagca cttgaacttc acctgcagg 55260
 ctctgtggcc acattttcag ccaagggga atatgctttc atcttctgtt gctctctgtg 55320
 tctgagagca aagtgaacct gttaacaaa ccagaatccc tctacatgga ctgagagaa 55380
 agagattgag atgtaagtct caactctgtc cccagggaag tgtgtgacct taggcctctc 55440
 acctctgtgc ctctgtctcc ttgttgcca actactatct cagagatatt gtgaggaca 55500
 attgagacg tgcacatgaa ctgtctttta atgtgtaag atctacatga atgcaaaaca 55560
 ttccattatg aggtcagact aggataatgt ccaactaaa acaaccctt ttcacctgg 55620
 ctggagaatg tggagaacta aaggtggcca caattcttt gacactcaag tccccaga 55680
 cctaagggtt ttatctctcc ccttgaata tgggtggctc tgattgctt atcaaaaagt 55740
 ggaagtgaac ttgtgtcagt ttcatcct gatcttaaga ggtgacagc ttctacttgc 55800
 tgtcccttgg aactcttgc atcggggaag ccagacgcca tttaaaagtc tgcctatcct 55860
 ggcaggtgt ggtggctcac acctgtaatc ccagcacttt gggagacca ggcggcgga 55920
 tcaacttaag tcaggagtcc aagaccagc tcgccaacat ggtgaaccg tatctctaat 55980
 aaaaatacaa aaattagctg ggcattgtgc gggcacctgt agtcctagct atcaagaggc 56040
 tgagacagga gaaacacttg aacctgggag gtggagggtg cattgagctg agatcgtgc 56100
 actgcactcc aggtgggtg acagagcgag actccatctc aaaaaaaaa aaaaagaaa 56160
 aaaaaaatgt ctgcctatcc tgagactgcc ctgctgtgag gaagcccaag cagtcacgtg 56220
 gacagtgcct gaccagcccc agctttcag ccatccaagc ccagtcacca aacatgagag 56280
 agaagaagcc ttcagggtgt tctggactcc actaacatat gactgatacc gcatgataca 56340
 tcccaagtga gaactgcccc ataatccag aaaccacat tgctatctta agtccctaag 56400
 tttggggctt atttgttcca cagcaacagg taactggaac agagggcag cctgatgaat 56460
 gggcacacag actcagccca taccttccct ggttctaagt ttctcaggga gcccgacca 56520
 accctgggag cctcagggaac ttaggtttcc actggacagt tctagaaggg ctatagacca 56580

- 55 <210> 2
- <211> 2164
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 60 <220>
- <221> CDS
- <222> (79)..(1863)
- 65 <223>

ES 2 293 114 T3

<400> 2

5	ggcacgagggg cttgctgtgg ccctgtcagg aagagtagag ctctgggtcca gctccgcgca	60
	gggaggggagg ctgtcacc atg ccg gcc tgc tgc agc tgc agt gat gtt ttc	111
	Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe	
	1 5 10	
10	cag tat gag acg aac aaa gtc act cgg atc cag agc atg aat tat ggc	159
	Gln Tyr Glu Thr Asn Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly	
	15 20 25	
	acc att aag tgg ttc ttc cac gtg atc atc ttt tcc tac gtt tgc ttt	207
	Thr Ile Lys Trp Phe Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe	
	30 35 40	
15	gct ctg gtg agt gac aag ctg tac cag cgg aaa gag cct gtc atc agt	255
	Ala Leu Val Ser Asp Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser	
	45 50 55	
	tct gtg cac acc aag gtg aag ggg ata gca gag gtg aaa gag gag atc	303
	Ser Val His Thr Lys Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile	
	60 65 70 75	
20	gtg gag aat gga gtg aag aag ttg gtg cac agt gtc ttt gac acc gca	351
	Val Glu Asn Gly Val Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala	
	80 85 90	
	gac tac acc ttc cct ttg cag ggg aac tct ttc ttc gtg atg aca aac	399
	Asp Tyr Thr Phe Pro Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn	
	95 100 105	
25	ttt ctc aaa aca gaa ggc caa gag cag cgg ttg tgt ccc gag tat ccc	447
	Phe Leu Lys Thr Glu Gly Gln Glu Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro	
	110 115 120	
30	acc cgc agg acg ctc tgt tcc tct gac cga ggt tgt aaa aag gga tgg	495
	Thr Arg Arg Thr Leu Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp	
	125 130 135	
	atg gac ccg cag agc aaa gga att cag acc gga agg tgt gta gtg cat	543
	Met Asp Pro Gln Ser Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His	
	140 145 150 155	
35	gaa ggg aac cag aag acc tgt gaa gtc tct gcc tgg tgc ccc atc gag	591
	Glu Gly Asn Gln Lys Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu	
	160 165 170	
	gca gtg gaa gag gcc ccc cgg cct gct ctc ttg aac agt gcc gaa aac	639
	Ala Val Glu Glu Ala Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn	
	175 180 185	
	ttc act gtg ctc atc aag aac aat atc gac ttc ccc ggc cac aac tac	687
	Phe Thr Val Leu Ile Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr	
	190 195 200	
45	acc acg aga aac atc ctg cca ggt tta aac atc act tgt acc ttc cac	735
	Thr Thr Arg Asn Ile Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His	
	205 210 215	
	aag act cag aat cca cag tgt ccc att ttc cga cta gga gac atc ttc	783
	Lys Thr Gln Asn Pro Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe	
	220 225 230 235	
50	cga gaa aca ggc gat aat ttt tca gat gtg gca att cag ggc gga ata	831
	Arg Glu Thr Gly Asp Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile	
	240 245 250	
	atg ggc att gag atc tac tgg gac tgc aac cta gac cgt tgg ttc cat	879
	Met Gly Ile Glu Ile Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His	
	255 260 265	
55	cac tgc cat ccc aaa tac agt ttc cgt cgc ctt gac gac aag acc acc	927

60

65

ES 2 293 114 T3

	His Cys His Pro Lys Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr	
	270 275 280	
5	aac gtg tcc ttg tac cct ggc tac aac ttc aga tac gcc aag tac tac Asn Val Ser Leu Tyr Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr	975
	285 290 295	
	aag gaa aac aat gtt gag aaa cgg act ctg ata aaa gtc ttc ggg atc Lys Glu Asn Asn Val Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile	1023
	300 305 310 315	
10	cgt ttt gac atc ctg gtt ttt ggc acc gga gga aaa ttt gac att atc Arg Phe Asp Ile Leu Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile	1071
	320 325 330	
	cag ctg gtt gtg tac atc ggc tca acc ctc tcc tac ttc ggt ctg gcc Gln Leu Val Val Tyr Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala	1119
	335 340 345	
15	gct gtg ttc atc gac ttc ctc atc gac act tac tcc agt aac tgc tgt Ala Val Phe Ile Asp Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys	1167
	350 355 360	
20	cgc tcc cat att tat ccc tgg tgc aag tgc tgt cag ccc tgt gtg gtc Arg Ser His Ile Tyr Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val	1215
	365 370 375	
	aac gaa tac tac tac agg aag aag tgc gag tcc att gtg gag cca aag Asn Glu Tyr Tyr Tyr Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys	1263
	380 385 390 395	
25	ccg aca tta aag tat gtg tcc ttt gtg gat gaa tcc cac att agg atg Pro Thr Leu Lys Tyr Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met	1311
	400 405 410	
	gtg aac cag cag cta cta ggg aga agt ctg caa gat gtc aag ggc caa Val Asn Gln Gln Leu Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln	1359
	415 420 425	
30	gaa gtc cca aga cct gcg atg gac ttc aca gat ttg tcc agg ctg ccc Glu Val Pro Arg Pro Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro	1407
	430 435 440	
35	ctg gcc ctc cat gac aca ccc ccg att cct gga caa cca gag gag ata Leu Ala Leu His Asp Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile	1455
	445 450 455	
	cag ctg ctt aga aag gag gcg act cct aga tcc agg gat agc ccc gtc Gln Leu Leu Arg Lys Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val	1503
	460 465 470 475	
40	tgg tgc cag tgt gga agc tgc ctc cca tct caa ctc cct gag agc cac Trp Cys Gln Cys Gly Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His	1551
	480 485 490	
	agg tgc ctg gag gag ctg tgc tgc cgg aaa aag ccg ggg gcc tgc atc Arg Cys Leu Glu Glu Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile	1599
	495 500 505	
45	acc acc tca gag ctg ttc agg aag ctg gtc ctg tcc aga cac gtc ctg Thr Thr Ser Glu Leu Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu	1647
	510 515 520	
	cag ttc ctc ctg ctc tac cag gag ccc ttg ctg gcg ctg gat gtg gat Gln Phe Leu Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp	1695
	525 530 535	
50	tcc acc aac agc cgg ctg cgg cac tgt gcc tac agg tgc tac gcc acc Ser Thr Asn Ser Arg Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr	1743
	540 545 550 555	
55	tgg cgc ttc ggc tcc cag gac atg gct gac ttt gcc atc ctg ccc agc Trp Arg Phe Gly Ser Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser	1791
	560 565 570	
	tgc tgc cgc tgg agg atc cgg aaa gag ttt ccg aag agt gaa ggg cag	1839

ES 2 293 114 T3

Cys Cys Arg Trp Arg Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln
 575 580 585
 tac agt ggc ttc aag agt cct tac tgaagccagg caccgtggct caggtctgta 1893
 Tyr Ser Gly Phe Lys Ser Pro Tyr 595
 5
 atcccagcgc ttggggaggg cgaggcaggg agatcacctg aggtcgggag ttggagaccc 1953
 gcctggctaa caaggcgaaa tcctgtctgt actaaaaata caaaatcag ccagacatgg 2013
 10
 tggcatgcac ctgcaatccc agctactcgg gaggtcagg cacaagaatc acttgaaccc 2073
 gggaggcaga ggtttagtg agcccagatt gtgccactgc tctccagcct gggaggcaca 2133
 gcaaaactgtc ccaaaaaaaaa a 2164
 15
 <210> 3
 <211> 595
 <212> PRT
 20
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 25
 Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30
 30
 Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45
 Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60
 35
 Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80
 40
 Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95
 Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 45
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 50
 Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160
 Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 60
 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 65

ES 2 293 114 T3

Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 5 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 10 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys His Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 15 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 20 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 25 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 30 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 35 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 40 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 45 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 50 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 55 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510

ES 2 293 114 T3

Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595

<210> 4
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(20)
 <223> Dominio intracelular
 <220>
 <221> TRANSMEM
 <222> (21)..(46)
 <223>
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (47)..(320)
 <223> Dominio extracelular
 <220>
 <221> TRANSMEN
 <222> (321)..(356)
 <223>
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (357)..(595)
 <223> Dominio intracelular
 <400> 4

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

ES 2 293 114 T3

Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95
 Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160
 Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365

ES 2 293 114 T3

Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510
 Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595
 <210> 5
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30
 Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp

ES 2 293 114 T3

	35	40	45
5	Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys 50 55 60		
	Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val 65 70 75 80		
10	Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro 85 90 95		
	Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu 100 105 110		
15	Gly Gln Glu Gln Trp Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu 115 120 125		
20	Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser 130 135 140		
	Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys 145 150 155 160		
25	Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala 165 170 175		
	Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile 180 185 190		
30	Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile 195 200 205		
35	Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro 210 215 220		
	Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp 225 230 235 240		
40	Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile 245 250 255		
	Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys 260 265 270		
45	Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr 275 280 285		
	Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val 290 295 300		
50	Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu 305 310 315 320		
55	Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr 325 330 335		
	Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp		

ES 2 293 114 T3

	340	345	350
5	Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr 355 360 365		
	Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr 370 375 380		
10	Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr 385 390 395 400		
	Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu 405 410 415		
15	Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro 420 425 430		
	Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp 435 440 445		
20	Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys 450 455 460		
	Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly 465 470 475 480		
25	Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu 485 490 495		
	Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu 500 505 510		
30	Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu 515 520 525		
35	Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg 530 535 540		
	Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser 545 550 555 560		
40	Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg 565 570 575		
	Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys 580 585 590		
45	Ser Pro Tyr 595		
50			
	<210> 6		
	<211> 595		
55	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 6		
60			
	Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn 1 5 10 15		
65			

ES 2 293 114 T3

Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30
 5 Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45
 Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60
 10 Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95
 15 Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 20 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 25 Lys Gly Ile Gln Thr Arg Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160
 Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 30 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 35 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 40 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 45 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 50 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 55 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320

ES 2 293 114 T3

Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 5 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 10 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 15 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 25 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 30 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510
 Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 40 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 50 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595

55

<210> 7

<211> 595

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 293 114 T3

<400> 7

	Met	Pro	Ala	Cys	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Val	Phe	Gln	Tyr	Glu	Thr	Asn	
	1			5						10					15		
5	Lys	Val	Thr	Arg	Ile	Gln	Ser	Met	Asn	Tyr	Gly	Thr	Ile	Lys	Trp	Phe	
				20					25					30			
	Phe	His	Val	Ile	Ile	Phe	Ser	Tyr	Val	Cys	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Asp	
10			35					40					45				
	Lys	Leu	Tyr	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Ile	Ser	Ser	Val	His	Thr	Lys	
			50				55					60					
15	Val	Lys	Gly	Ile	Ala	Glu	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	Val	
	65					70					75				80		
	Lys	Lys	Leu	Val	His	Ser	Val	Phe	Asp	Thr	Ala	Asp	Tyr	Thr	Phe	Pro	
				85						90					95		
20	Leu	Gln	Gly	Asn	Ser	Phe	Phe	Val	Met	Thr	Asn	Phe	Leu	Lys	Thr	Glu	
				100					105					110			
	Gly	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Cys	Pro	Glu	Tyr	Pro	Thr	Arg	Arg	Thr	Leu	
25				115				120					125				
	Cys	Ser	Ser	Asp	Arg	Gly	Cys	Lys	Lys	Gly	Trp	Met	Asp	Pro	Gln	Ser	
				130			135					140					
30	Lys	Gly	Ile	Gln	Thr	Gly	Arg	Cys	Val	Val	His	Glu	Gly	Asn	Gln	Lys	
	145					150					155					160	
	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ala	Trp	Cys	Pro	Ile	Glu	Ala	Val	Glu	Glu	Ala	
					165				170						175		
35	Pro	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Asn	Ser	Ala	Lys	Asn	Phe	Thr	Val	Leu	Ile	
				180				185						190			
	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	Phe	Pro	Gly	His	Asn	Tyr	Thr	Thr	Arg	Asn	Ile	
40			195					200					205				
	Leu	Pro	Gly	Leu	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Phe	His	Lys	Thr	Gln	Asn	Pro	
		210					215					220					
45	Gln	Cys	Pro	Ile	Phe	Arg	Leu	Gly	Asp	Ile	Phe	Arg	Glu	Thr	Gly	Asp	
	225					230					235					240	
	Asn	Phe	Ser	Asp	Val	Ala	Ile	Gln	Gly	Gly	Ile	Met	Gly	Ile	Glu	Ile	
				245						250					255		
50	Tyr	Trp	Asp	Cys	Asn	Leu	Asp	Arg	Trp	Phe	His	His	Cys	Arg	Pro	Lys	
			260						265					270			
	Tyr	Ser	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Asp	Lys	Thr	Thr	Asn	Val	Ser	Leu	Tyr	
55			275					280					285				

ES 2 293 114 T3

Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 5 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 10 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 15 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 20 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 25 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 30 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 35 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 40 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510
 Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 45 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 50 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 55 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595

<210> 8
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 293 114 T3

<400> 8

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

ES 2 293 114 T3

Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510
 Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595

<210> 9

ES 2 293 114 T3

<211> 595

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

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

ES 2 293 114 T3

[illegible]

ES 2 293 114 T3

	530	535	540
5	Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser 545 550 555 560		
	Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg 565 570 575		
10	Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys 580 585 590		
	Ser Pro Tyr 595		
15			
	<210> 10		
	<211> 595		
20	<212> PRT		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 10		
25			
	Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn 1 5 10 15		
30	Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe 20 25 30		
	Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp 35 40 45		
35	Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys 50 55 60		
	Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val 65 70 75 80		
40	Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro 85 90 95		
45	Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu 100 105 110		
	Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu 115 120 125		
50	Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser 130 135 140		
	Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys 145 150 155 160		
55	Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala 165 170 175		
60	Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile 180 185 190		
	Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile 195 200 205		
65			

ES 2 293 114 T3

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

ES 2 293 114 T3

Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Asn Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 Ser Pro Tyr
 595
 <210> 11
 <211> 588
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30
 Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45
 Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60
 Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95
 Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160
 Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175

ES 2 293 114 T3

Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 5 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 10 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 15 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 20 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 30 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 35 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 45 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 50 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480

ES 2 293 114 T3

Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Glu Glu Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro
 485 490 495
 Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser
 500 505 510
 Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala
 515 520 525
 Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg
 530 535 540
 Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala
 545 550 555 560
 Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys
 565 570 575
 Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys Ser Pro Tyr
 580 585
 <210> 12
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe
 20 25 30
 Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp
 35 40 45
 Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys
 50 55 60
 Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro
 85 90 95
 Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu
 100 105 110
 Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu
 115 120 125
 Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser
 130 135 140
 Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val His Glu Gly Asn Gln Lys
 145 150 155 160

ES 2 293 114 T3

Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala
 165 170 175
 5 Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile
 180 185 190
 Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Thr Arg Asn Ile
 195 200 205
 10 Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro
 210 215 220
 Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 15 Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile
 245 250 255
 Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys
 260 265 270
 20 Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val
 290 295 300
 25 Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr
 325 330 335
 30 Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp
 340 345 350
 Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr
 355 360 365
 35 Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr
 370 375 380
 Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr
 385 390 395 400
 40 Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu
 405 410 415
 Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro
 420 425 430
 45 Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp
 435 440 445
 50 Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys
 450 455 460
 55
 60
 65

ES 2 293 114 T3

Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 5 Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu
 485 490 495
 Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu
 500 505 510
 10 Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg
 530 535 540
 15 Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser
 545 550 555 560
 20 Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg
 565 570 575
 Ile Gln Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys
 580 585 590
 25 Ser Pro Tyr
 595

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

gtaacctcac tgagaacaga

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

tttggtaggc gaaggcgggc

20

<210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

ccttgatagg gctttcgtgc t

21

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 293 114 T3

	<400> 16	
	ttgtgtatcc gtccatcagc t	21
5	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 17	
15	actgccatat gtactattcc	20
	<210> 18	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18	
25	aaatctaccc agccacttag	20
	<210> 19	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 19	
	tgcagtggcc cacagcacag	20
40	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 20	
	catcctccaa tgcctgcatc	20
50	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
60	tttcccatgt ttgccattta	20
	<210> 22	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 22	
	caagagcagt ggttggtcc	20
5	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
15	gagccacag atatctactg	20
	<210> 24	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 24	
25	tgctgcctc agtctctggt	20
	<210> 25	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 25	
	tctctgccc aggttgagtt	20
40	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 26	
	acgtcctctc cgcagtctt	20
50	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	
60	attcagaccg aaaggtgtgt	20
	<210> 28	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 28	
	tgcctggtgt cccatcgagg	20
5	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 29	
15	gttgtaacac tcctgtacca	20
	<210> 30	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30	
25	aacagtgcc aaaaacttcac	20
	<210> 31	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 31	
	tcactgtgcc catcaagaac	20
40	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 32	
50	tgctgcgtgc ttctggtca	20
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 33	
60	ctggagaacc ctttccaag	20
	<210> 34	
65	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 34	
	caggaggcag ggatcatttg	20
5	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 35	
15	tccacccgct acgctaaggt	20
	<210> 36	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 36	
25	tcgcgctaagg actttaccta	20
	<210> 37	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 37	
	tttacctacc ctacctcgtc	20
40	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 38	
	ccatcactgc tgtcccaa	20
50	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 39	
60	tcgccttgat gacaagacca	20
	<210> 40	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 40	
	gtaaactctt ccactctgtt	20
5	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41	
15	accaagacac ggagagattc	20
	<210> 42	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 42	
25	taatattaaa tgtaacttta	20
	<210> 43	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 43	
	aatattaaac ataactttat	20
40	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 44	
	ccatctcaac tggaggagct	20
50	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 45	
60	gactttgccca tcctgccag	20
	<210> 46	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 46	
	tggaggatcc agaaagagtt	20
5	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 47	
15	aatcccagca ctttgggagg	20
	<210> 48	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 48	
25	aaactgtccc aaaaaaaaaa	20
	<210> 49	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 49	
	aactgtcccc caaaaaaaaaa	20
40	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 50	
50	ctgtccccac aaaaaaaaaa	20
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 51	
60	caaggcgggt ggatcactta	20
	<210> 52	
	<211> 19	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 52	
	cgtaggactt ggcgcttct	20
5	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 53	
15	gagcacgtct cagattcgaa a	21
	<210> 54	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 54	
25	ccatgaggca ggtatgacta ttc	23
	<210> 55	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 55	
	ctcctggatc tcacccagtt	20
40	<210> 56	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 56	
50	ctcgtccagc ttgatatta agc	23
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 57	
60	ggtccttagt gctagaacca ga	22
	<210> 58	
	<211> 18	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 58	
	attcatccgt cagtggcc	18
5	<210> 59	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 59	
15	gccatgtgaa tttctaccg at	22
	<210> 60	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 60	
25	ttcgttgagg ttaggatggg	20
	<210> 61	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 61	
	caaggatgct cagggtagta gc	22
40	<210> 62	
	<211> 25	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 62	
50	cactaggttt gctgtatcca ttct	25
	<210> 63	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 63	
60	gcaactgtgt gagagcttgg	20
	<210> 64	
	<211> 19	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 64	
	tcaaccctgg tccagtgtg	19
5	<210> 65	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 65	
15	caccaagtag ctctcactca taagg	25
	<210> 66	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 66	
25	caataacact tgtgcgagtt aggt	24
	<210> 67	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 67	
	catcttgttg ccttggaac c	21
40	<210> 68	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 68	
50	gtgagtggtg atcctgctac tgc	23
	<210> 69	
	<211> 19	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 69	
60	aggeccactc ctgtactcg	19
	<210> 70	
	<211> 19	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 70	
	ccaagtcaca gcatgaggc	19
5	<210> 71	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 71	
15	accagcgac gtatccac	18
	<210> 72	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 72	
25	aagcatgggg ttccatttc	19
	<210> 73	
30	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 73	
	gcataaaagg gactcctgct agta	24
40	<210> 74	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 74	
50	gcttacagaa cacatgcatg g	21
	<210> 75	
	<211> 19	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 75	
60	gcacctgtag gcacagtgc	19
	<210> 76	
	<211> 21	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 76	
	atcaccacct cagagctgtt c	21
5	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 77	
15	gttaacatgg ctactgcagc c	21
	<210> 78	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 78	
25	gcttagaaag gaggcgactc c	21
	<210> 79	
30	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 79	
	ttgtgacatt tgcaaggctg cc	22
40	<210> 80	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 80	
	tctgaagctc tgctcctgag	20
50	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 81	
60	ctcaccttct ggettcagt	20
	<210> 82	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 82	
	cttaccactc ccaggactaa	20
5	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 83	
15	gtctgcctgt tcaactgcat	20
	<210> 84	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 84	
25	cagagacctt cagaaacttc g	21
	<210> 85	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 85	
	agatcaccag ggacacagtg	20
40	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 86	
	ctcaactcca ctttctcgg	20
50	<210> 87	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 87	
60	cctttcactt ttttgtctc atg	23
	<210> 88	
	<211> 21	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 88	
	gggagaattc tgaaaatgcc c	21
5	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 89	
15	ggaccagagc tctactcttc	20
	<210> 90	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 90	
25	aggtcataga tcgacctgcc	20
	<210> 91	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 91	
	aagaagcgcc aagtcctacg	20
40	<210> 92	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 92	
50	gcaatccaga ctgaagtga c	21
	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 93	
60	actcctgggtc gcagttggtg	20
	<210> 94	
	<211> 24	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 94	
	cctttaaact cagagacctt caga	24
5	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 95	
15	gcccacctc tgaacacat	20
	<210> 96	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 96	
25	cccttggaac tcttgctatc g	21
	<210> 97	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 97	
	ggcagtacag tggcttcaag a	21
40	<210> 98	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 98	
50	gtgggacagt ttgctgtgcc t	21
	<210> 99	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 99	
60	gagtccttac caatagcagg	20
	<210> 100	
	<211> 21	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 100	
	gtcaaagaat ttgtggccac c	21
5	<210> 101	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 101	
15	catgaactgt cttttaatgt gtaaag	26
	<210> 102	
	<211> 22	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 102	
25	gagatacggg ttcaccatgt tg	22
	<210> 103	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 103	
	aattagctgg gcatggtgcg	20
40	<210> 104	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 104	
50	ttgagatgga gtctcgctct g	21
	<210> 105	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 105	
60	cactgtccac gtgactgctt	20
	<210> 106	
	<211> 25	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 293 114 T3

	<400> 106	
	tctacttcg gtctgtaag agatt	25
5	<210> 107	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 107	
15	gggcctaatt ttcgtgcat	19
	<210> 108	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 108	
25	aagaacctag aacctgaggg ctt	23
	<210> 109	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 109	
	ttgagatggg aggcagctt	19
40	<210> 110	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 110	
	ttcggctccc aggacat	17
50	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 111	
60	cacagagctt tgcagtgaa	20
65		