



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 780**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03727901 .5**

(96) Fecha de presentación : **13.05.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1509618**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

(54) Título: **Afecciones autoinmunes y deficiencias de oxidasa NADPH.**

(30) Prioridad: **13.05.2002 US 380904 P**
27.11.2002 US 429609 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(73) Titular/es: **Arexis AB.**
c/o Biovitrum AB. (publ)
112 76 Stockholm, SE

(72) Inventor/es: **Holmdahl, Rikard y**
Olofsson, Peter

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Afecciones autoinmunes y deficiencias de oxidasa NADPH.

5 **Antecedentes**1. **Campo técnico**

La invención se relaciona con métodos y materiales involucrados en el diagnóstico y tratamiento de afecciones autoinmunes. En particular, la invención se relaciona con métodos y materiales involucrados en el diagnóstico de afecciones de artritis que están acompañadas por deficiencia de oxidasa NADPH, métodos y materiales involucrados en el tratamiento, prevención, o retraso del inicio de las afecciones de artritis que están acompañadas por una deficiencia de oxidasa NADPH, cualquier método del material involucrado en identificar agonista y antagonistas de la actividad de oxidasa NADPH.

15 **2. Información antecedente**

Las afecciones autoinmunes son afecciones en donde un sistema inmune del mamífero empieza a reaccionar contra sus propios tejidos. Tales afecciones incluyen, sin limitación, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide) (RA)), esclerosis múltiple, lupus, uveítis autoinmune. Diabetes tipo I, asma bronquial, artritis séptica inducida por estafilococos o estreptococos, y enfermedades cardiovasculares que involucran vasculitis.

El RA es una enfermedad inflamatoria crónica que se puede encontrar en aproximadamente 1-2% de la población. El RA afecta principalmente las articulaciones periféricas en donde la sinovitis inflamatoria conduce a la destrucción del cartílago, erosión del hueso, y finalmente la deformidad de la articulación y la pérdida de la función articular. El RA es una compleja enfermedad en la que los factores ambientales así como también múltiples regiones cromosómicas están involucrados en la susceptibilidad al RA. Los inductores de la artritis en los modelos animales incluyen adyuvantes, colágeno (por ejemplo, colágeno tipo II) (artritis inducida por colágeno (CIA)), hexadecano (artritis inducida por hexadecano (HIA)), aceite (por ejemplo. Adyuvante incompleto de Freund), escualeno (arthritis inducida por escualeno (SIA), y pristano (artritis inducida pro pristano (PIA)). Las regiones cromosómicas conocidas por estar asociadas con el desarrollo del RA incluyen la principal región compleja de histocompatibilidad. Adicionalmente las diferentes regiones genómicas se conocen por controlar diferentes fases de la enfermedad tal como inicio, severidad durante la fase de inicio aguda, y la severidad de la destrucción en la fase de recaída crónica.

35 **Resumen**

La invención proporciona métodos y materiales relacionados con el diagnóstico y tratamiento de afecciones autoinmunes tal como artritis (por ejemplo, RA), esclerosis múltiple, lupus, uveítis autoinmune diabetes, tipo I, asma bronquial, artritis séptica inducida por estafilococos o estreptococos, y enfermedad cardiovascular que involucra vasculitis. Por ejemplo, la invención proporciona métodos y materiales involucrados en diagnosticar afecciones autoinmunes que están acompañadas por una deficiencia de oxidasa NADPH, métodos y materiales involucrados en tratar, prevenir y/o retardar el inicio de las afecciones autoinmunes que están acompañadas por deficiencia de oxidasa NADPH, y métodos y materiales involucrados en identificar agonista y antogonista de la actividad oxidasa NADPH. Las afecciones autoinmunes que están acompañadas por una deficiencia de oxidasa de NADPH incluyen, sin limitación, artritis (por ejemplo, RA), esclerosis múltiple, lupus, uveítis autoinmune diabetes, tipo I, asma bronquial, artritis séptica inducida por estafilococos o estreptococos, y enfermedades cardiovasculares que involucran afecciones de vasculitis que coexiste con o se originan por una deficiencia en la actividad oxidasa NADPH. Para el propósito de esta invención, el término “artritis acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH” (abreviado a “AANOD”) se refiere a cualquier afección de artritis que coexiste con o se origina por una deficiencia de la actividad oxidasa NADPH. Tal una deficiencia puede ser la falta completa de actividad oxidasa NADPH o una reducción parcial en la actividad oxidasa NADPH. Por ejemplo, un mamífero puede tener AANOD cuando el mamífero tiene artritis así como también las células que exhiben o tienen actividad oxidasa NADPH a un grado menor que aquel normalmente exhibido por mamíferos saludable de la misma especie. De la misma forma, un mamífero puede tener esclerosis múltiple acompañada por una deficiencia de oxidaba NADPH cuando ese mamífero tiene esclerosis múltiple así como también células que exhiben actividad oxidasa NADPH a un grado menor de aquel que exhibe normalmente mamíferos saludables de la misma especie.

Cabe notar que los métodos y materiales para diagnosticar y tratar el AANOD descrito aquí se pueden utilizar para diagnosticar y tratar otras afecciones autoinmunes que están acompañadas por la deficiencia de oxidasa NADPH. Por ejemplo, se pueden utilizar los métodos y materiales descritos aquí para diagnosticar y tratar afecciones de esclerosis múltiple que se acompañan por deficiencia de oxidasa NADPH. A este respecto, la encefalitis alérgica (autoinmune) experimental (EAE) es un modelo útil para esclerosis múltiple.

Diagnosticar pacientes que tiene una afección autoinmune acompañada por una deficiencia de oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD) puede ayudar a los médicos a determinar los tratamientos apropiados para aquellos pacientes. Por ejemplo, un médico que diagnostica a un paciente que tiene AANOD puede tratar ese paciente con medicamentos que mejoran la artritis del paciente y la deficiencia de la oxidasa NADPH. En algunos casos, se puede utilizar medicación única para mejorar un nivel de actividad oxidasa NADPH del paciente de tal manera que se alivian o reducen los síntomas de artritis del paciente. Así, tratar un paciente que tienen AANOD al modular las actividades oxidasa

NADPH pueden mejorar la salud del paciente y la calidad de vida, por ejemplo, al reducir los síntomas o la severidad de los síntomas asociados con la artritis o retraso del inicio de la artritis.

Adicionalmente, la identificación de los agonistas y antagonistas de la actividad oxidasa NADPH puede ayudar a los médicos y pacientes. Por ejemplo, los métodos y materiales descritos aquí se pueden utilizar para identificar agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH de tal manera que los pacientes con una afección autoinmune acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD) se pueden tratar exitosamente.

La invención se basa en el descubrimiento que la artritis puede estar asociada con u originada por un nivel reducido de la actividad oxidasa NADPH. Por ejemplo, el desarrollo de los síntomas de artritis severa en modelos de artritis en animales puede ser, por lo menos parcialmente, dependiente de la presencia de la baja actividad oxidasa NADPH. La invención también se basa en el descubrimiento que el nivel reducido de la actividad oxidasa NADPH responsable de la susceptibilidad a la artritis se puede originar por variaciones de secuencia (por ejemplo, sitios de fosforilación mutados) en un componente polipéptido (por ejemplo, polipéptido P47PHOX) de una enzima oxidasa NADPH de mamífero. Adicionalmente, la invención se basa en el descubrimiento de que los mamíferos propensos a desarrollar artritis se pueden proteger al suministrar a aquellos mamíferos niveles normales de actividad de oxidasa NADPH. Por ejemplo, un modelo de animal propenso a desarrollar síntomas de artritis severa se puede rescatar al proporcionar a ese animal una ruta de oxidasa NADPH completamente funcional.

En general, la invención describe un método para evaluar una susceptibilidad del mamífero al desarrollar una afección autoinmune (por ejemplo, artritis o esclerosis múltiple), el método incluye: (a) proporcionar, de un mamífero, una muestra de fluido sinovial o sangre que contiene una célula; (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH de la célula después de poner en contacto la célula con un activador de oxidasa NADPH; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control de la actividad oxidasa NADPH, en donde el nivel de control es la cantidad promedio de la actividad oxidasa NADPH de células de control de una población de mamíferos sin la afección autoinmune (por ejemplo, mamíferos no artríticos), y en donde los mamíferos sin la afección autoinmune son de la misma especie del mamífero; (d) identificar el mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune cuando el nivel es menor que el nivel de control. El activador de oxidasa NADPH puede ser norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, hexadeceno, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3. La actividad oxidasa NADPH se puede determinar al medir las especies de oxígeno reactivo superóxido. La población puede contener por lo menos 10 mamíferos. La etapa (c) puede incluir determinar si o no el nivel está entre 5 y 75 por ciento menos que el nivel de control, en donde la etapa (d) incluye identificar el mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune cuando el nivel está entre 5 y 75 por ciento menos que el nivel de control. La Etapa (c) puede incluir determinar si o no el nivel está entre 25 y 55 por ciento menos que el nivel de control, en donde la etapa (d) incluye identificar el mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune cuando el nivel está entre 25 y 55 por ciento menos que el nivel de control.

La invención también describe un método para evaluar una susceptibilidad del mamífero a desarrollar una afección autoinmune (por ejemplo, artritis o esclerosis múltiple), el método contiene: (a) proporcionar, de un mamífero, una muestra de fluidos sinovial o sangre; (b) determinar el nivel de sangre o componente de fluido sinovial que refleja la actividad oxidasa NADPH; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control, en donde el nivel de control es la cantidad promedio del componente en las muestras de control de una población de mamíferos sin la afección autoinmune (por ejemplo, mamíferos no artríticos), y en donde los mamíferos sin la afección autoinmune son de la misma especie como el mamífero; y (d) identificar el mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune cuando el nivel es menor que el nivel de control. El componente que refleja la actividad oxidasa NADPH puede ser dialdehído malónico.

Una modalidad de la invención representa una método para evaluar una susceptibilidad del mamífero al desarrollar una afección autoinmune seleccionada entre artritis o esclerosis múltiple, el método contiene determinar si o no un mamífero contiene una variante genética de gen que codifica la oxidasa NADPH en donde la presencia de la variante genética indica que el mamífero es susceptible a desarrollar la afección autoinmune. La variante genética puede codificar un polipéptido mutante. El polipéptido mutante puede ser una polipéptido GP91PHOX, polipéptido P22PHOX, polipéptido P40PHOX, polipéptido P47PHOX, o polipéptido P67PHOX. Por ejemplo, el polipéptido por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser un polipéptido P47PHOX. El mamífero puede ser un humano, y el polipéptido P47PHOX mutante puede contener la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 con por lo menos dos sustituciones de aminoácidos. El polipéptido P47PHOX mutante puede contener una secuencia de aminoácidos que tiene un residuo de aminoácidos diferente a valina en la posición que se alinea con la posición 106 de la SEQ ID NO: 4 o un residuo de aminoácido diferente de treonina en la posición que se alinea con la posición 153 de la SEQ ID NO: 4. la variante genética puede contener una mutación en una secuencia reguladora del gen.

La invención describe un método para diagnosticar una afección autoinmune acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD o esclerosis múltiple acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH) en un mamífero que tiene una afección autoinmune, el método contiene: (a) proporcionar, del mamífero, una muestra que contiene una célula; (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH de la célula después de entrar en contacto a la célula con el activador de oxidasa NADPH; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control de actividad oxidasa NADPH en donde el nivel de control es la cantidad promedio de actividad oxidasa NADPH de la células de control de una población de mamíferos sin la afección autoinmune (por ejemplo, mamíferos no artríticos),

y en donde los mamíferos sin la afección autoinmune son de la misma especie que del mamífero; y (d) identificar el mamífero por tener una afección autoinmune asociada por deficiencia de oxidasa NADPH cuando el nivel es menor que el nivel de control. El activador de oxidasa NADPH puede ser norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, 5 tridecano, tetradecano, hexadecano, hexadeceno, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3. El nivel de actividad oxidasa NADPH se puede determinar al medir las especies superóxido u oxígeno reactivo. La población puede contener por lo menos 10 mamíferos sin las afecciones autoinmunes. La Etapa (c) puede incluir determinar si o no el nivel está entre 5 y 75 por ciento menos que el nivel de control, en donde la etapa (d) incluye identificar al mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune asociada por la deficiencia de oxidasa NADPH cuando el nivel 10 está entre 5 y 75 por ciento menos que el nivel de control. La etapa (c) puede incluir determinar si o no el nivel está entre el 25 y 55 por ciento menos que el nivel de control, en donde la etapa (d) incluye identificar el mamífero por ser susceptible a desarrollar la afección autoinmune asociada por la deficiencia de oxidasa NADPH cuando el nivel está entre 25 y 55 por ciento menos que el nivel de control.

15 La invención describe un método para diagnosticar una afección autoinmune asociada por la deficiencia de la oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD o esclerosis múltiple acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH) en un mamífero que tiene una afección autoinmune, el método contiene: (a) suministrar, del mamífero, una muestra del fluido sinovial o sanguíneo; (b) determinar el nivel de componente de fluido sinovial o sanguíneo que refleja la actividad oxidasa NADPH; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control, en donde el nivel de 20 control es la cantidad promedio del componente en muestras de control de una población de mamíferos sin la afección autoinmune (por ejemplo, mamíferos no artríticos), y en donde los mamíferos sin la afección autoinmune son de la misma especie que el mamífero; y (d) identificar el mamífero por tener la afección autoinmune asociada por la deficiencia de oxidasa NADPH cuando el nivel es menor que el nivel de control.

25 La invención describe un método para diagnosticar una afección autoinmune acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD o esclerosis múltiple acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH) en un mamífero que tiene una afección autoinmune, el método incluye: (a) proporcionar una muestra de fluido sanguíneo o sinovial del mamífero; (b) determinar el nivel de un componente de fluido sinovial o sanguíneo que refleja la actividad oxidasa NADPH; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control de la actividad oxidasa NADPH, 30 cuando el nivel de control es la cantidad promedio de actividad oxidasa NADPH de las células de control de una población de mamíferos sin la afección autoinmune, y en donde los mamíferos sin la afección autoinmune son de la misma especie que el mamífero; (d) identificar al mamífero por tener la afección autoinmune acompañada por la deficiencia de oxidasa NADPH cuando el nivel es menor que el nivel de control. El componente que refleja la actividad oxidasa NADPH puede ser dialdehído malónico.

35 Una modalidad de la invención representa un método para diagnosticar una afección autoinmune seleccionada entre artritis y esclerosis múltiple en un mamífero el método incluye determinar si o no el mamífero contiene una variante genérica del gen que codifica la oxidasa NADPH, en donde la presencia de la variante genérica indica que el mamífero tiene la afección autoinmune acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH. La variante geneática puede codificar un polipéptido mutante. El polipéptido mutante puede ser un polipéptido GP91PHOX, polipéptido 40 P22PHOX, polipéptido P40PHOX polipéptido P47PHOX, o polipéptido P67PHOX. Por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser una polipéptido P47PHOX. El mamífero puede ser un humano, y el polipéptido mutante P47PHOX puede contener la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 con por lo menos dos sustituciones de aminoácidos. El polipéptido P47PHOX mutante puede contener una secuencia de aminoácido que tiene un residuo de aminoácido 45 diferente de valina en la posición que se alinea con la posición 106 de la SEQ ID NO: 4 o un residuo aminoácido diferente de treonina en la posición que se alinea con la posición 153 de la SEQ ID NO: 4. la variante genérica puede contener una mutación en una secuencia reguladora del gen.

La invención describe un método para tratar un mamífero que tiene una afección autoinmune acompañada por 50 deficiencia de oxidasa NADPH (por ejemplo, AANOD o esclerosis múltiple acompañada por deficiencia de oxidasa NADPH), el método incluye administrar, al animal un agente que mejora la actividad oxidasa NADPH. El agente puede ser norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, hexadeceno, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3. Alternativamente, el agente puede ser un derivado más polar de los 55 compuestos mencionados anteriormente. Por ejemplo, los agentes pueden ser un derivado alqueno de los compuestos mencionados anteriormente (por ejemplo, undeceno, hexadeceno), o un derivado ácido de los compuestos mencionados anteriormente. En una modalidad, se utiliza hexadeceno. En otra modalidad, se utiliza undecano. El agente se puede administrar intra-dérmicamente, intra-peritonealmente, o intranasalmente. En otra modalidad, la invención representa el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para tratar una afección autoinmune seleccionada 60 entre artritis y esclerosis múltiple, en donde la gente mejora la actividad de oxidasa NADPH en un mamífero y es fitol, undecano, o hexadeceno.

La invención describe un método para formular un medicamento para el tratamiento de una afección autoinmune, el método incluye: (a) poner en contacto una muestra que comprende células o una fracción celular que tiene actividad 65 NADPH con un agente de prueba, (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la muestra, (c) determinar si o no el nivel es mayor que un nivel de control de la actividad oxidasa, en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una muestra de control que le falta el agente de prueba, (d) identificar el agente de prueba como un agente útil para el tratamiento de la afección autoinmune cuando el nivel de la actividad oxidasa

NADPH es mayor que el nivel de control, y (e) formular un medicamento del agente para el tratamiento de la afección autoinmune. La afección autoinmune puede ser artritis o esclerosis múltiple.

La invención describe un método para identificar un agente que active la actividad oxidasa NADPH en una célula, en donde la célula es de un animal no humano susceptible de inducción de artritis, el método que comprende determinar si el nivel de actividad oxidasa NADPH se incrementa en la célula después que la célula se trata con una agente de prueba, en donde un incremento en el nivel indica que el agente de prueba activa la actividad oxidasa NADPH. La célula puede ser una célula de una rata DA. La célula puede ser un linfocito. El animal no humano puede ser susceptible a artritis inducida por pristano, o artritis inducida por colágeno, o artritis inducida por adyuvante, o artritis inducida por aceite, o artritis inducida por hexadecano, o artritis inducida por escualeno o artritis inducida por avridina. El nivel de actividad oxidasa NADPH se puede determinar al medir las especies de oxígeno reactivo o superóxido, por ejemplo, mediante un ensayo citocromo o ensayo WST-1 o ensayos basado (por ejemplo, FASC) utilizando un clitómetro de flujo, por ejemplo, dihidrorodamina 123 (DHR-123).

La invención describe un método para identificar una agente útil en el tratamiento de una afección autoinmune, el método incluye (a) poner en contacto una muestra que comprende células o una fracción celular que tiene una actividad NADPH con un agente de prueba, (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la muestra, (c) determinar si o no el nivel es mayor que un nivel de control de la actividad oxidasa NADPH, en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una muestra de control que le falta al agente de prueba, y (d) identificar el agente de prueba como un agente útil para el tratamiento de la afección autoinmune cuando el nivel de actividad oxidasa NADPH es mayor que el nivel de control. La afección autoinmune puede ser artritis o esclerosis múltiple.

La invención describe un método para identificar un agente útil en el tratamiento de una afección autoinmune, el método incluye (a) poner en contacto una muestra que comprende células o una fracción celular que tiene una actividad NADPH con un agente de prueba, (b) poner en contacto la muestra con un activador de oxidasa NADPH, (c) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la muestra, (d) determinar si o no el nivel es mayor que un nivel de control de la actividad oxidasa NADPH, en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una muestra de control tratada con el activador en la ausencia del agente de prueba y (e) identificar el agente de prueba como un agente útil para el tratamiento de la afección autoinmune cuando el nivel de actividad oxidasa NADPH es mayor que el nivel de control. La afección autoinmune puede ser artritis o esclerosis múltiple.

En otra modalidad, la invención representa un método para identificar un agente que mejora la actividad oxidasa NADPH en una célula, en donde la célula es de un animal no humano susceptible a la inducción de artritis, el método incluye: (a) poner en contacto la célula con un activador de oxidasa NADPH y un agente de prueba para formar una célula de prueba; (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la célula de prueba; (c) determinar si o no el nivel es mayor que un nivel de control de actividad oxidasa NADPH, en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una célula de control tratada con un activador en la ausencia del agente de prueba; y (d) identificar el agente por mejorar la actividad oxidasa NADPH cuando el nivel es mayor que el nivel de control. La célula puede ser una célula de una rata DA. La célula puede ser un linfocito. El animal no humano puede ser susceptible a artritis inducida por pristano o artritis inducida por colágeno, o artritis inducida por adyuvante, o artritis inducida por aceite, o artritis inducida por hexadecano o artritis inducida por escualeno, o artritis inducida por avridina. El activador de NADPH puede ser norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, hexadeceno, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3. El nivel de actividad oxidasa NADPH se puede determinar al medir las especies de oxígeno reactivo o superóxido, por ejemplo, mediante un ensayo citocromo o ensayo WST-1 o ensayos basados (por ejemplo, FASC) utilizando un clitómetro de flujo, por ejemplo, dihidrorodamina 123 (DHR-123).

La invención describe un método para identificar un agente que inhibe la actividad oxidasa NADPH en una célula, en donde la célula es de un animal no humano susceptible a inducción de artritis, el método comprende: (a) poner en contacto la célula con un activador oxidasa NADPH y un agente de prueba para formar una célula de prueba; (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la célula de prueba; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control de actividad oxidasa NADPH en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una célula de control tratada con el activador en la ausencia del agente de prueba; (d) identificar el agente por inhibir la actividad oxidasa NADPH cuando el nivel es menor que el nivel de control. La célula puede ser una célula de una rata DA. La célula puede ser un linfocito. El animal no humano puede ser susceptible a artritis inducida por pristano o artritis inducida por colágeno, o artritis inducida por aceite, o artritis inducida por hexadecano o artritis inducida por escualeno, o artritis inducida por avridina. El activador de oxidasa NADPH puede ser norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, hexadeceno, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3. El nivel de actividad oxidasa NADPH se puede determinar al medir las especies de oxígeno reactivo o superóxido.

En otra modalidad, la invención representa un método para identificar un agente que reduce la activación de las células T, el método incluye: (a) determinar si o no un agente de prueba incrementa la actividad de oxidasa NADPH; y (b) clasificar el agente de prueba como un agente que reduce la activación de las células T cuando el agente de prueba incrementa la actividad oxidasa NADPH.

La invención describe una rata congénica a una segunda rata, en donde por lo menos un lugar difiere genéricamente entre la rata y la segunda rata, en donde la segunda rata es susceptible de inducción de artritis, en donde la rata contiene células T de la segunda rata, y en donde la rata tiene artritis. La rata puede ser una rata DA. E3c12-/- . La segunda rata puede ser una rata DA. Por lo menos un lugar puede contener ácido nucleico que codifica un polipéptido P47PHOX.

5 En algunas modalidades, no más de un lugar puede diferir genéticamente entre la rata y la segunda rata. En aquellos casos, el lugar puede contener ácido nucleico que codifica un polipéptido P47PHOX.

La invención describe un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente, en donde el mamífero no humano exhibe síntomas de una enfermedad auto inmune. La enfermedad autoinmune puede ser artritis, esclerosis múltiple, lupus, uveítis autoinmune, diabetes tipo 1, asma bronquial, artritis séptica inducida por estafilococos o estreptococos, o enfermedad cardiovascular que involucra vasculitis. Por ejemplo, el animal no humano puede exhibir síntomas de artritis. La artritis puede ser artritis inducida por adyuvante, artritis inducida por colágeno o artritis inducida por pristano, o artritis inducida por hexadecano o artritis inducida por avridina, o artritis inducida por escualeno o artritis inducida por aceite. La ruta de oxidasa NADPH deficiente de puede indicar por una actividad oxidasa NADPH reducida. La actividad oxidasa NADPH puede ser un resultado de un polipéptido mutante en donde el polipéptido mutante funciona en la ruta oxidasa NADPH. Por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser un polipéptido GP91PHOX, polipéptido P22PHOX, polipéptido P40PHOX, polipéptido P47PHOX, o polipéptido, P67PHOX. Por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser un polipéptido P47PHOX. El polipéptido P47PHOX puede contener las secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 con por lo menos dos sustituciones de aminoácidos. El polipéptido P47PHOX puede contener una secuencia de aminoácido que tiene un residuo de aminoácido diferente a valina en la posición que se alinea con la posición 106 de la SEQ ID NO: 4 o un residuo de aminoácido diferente a treonina en la posición que se alinea con la posición 153 de SEQ ID NO: 4. en otras modalidades, la actividad oxidasa NADPH reducida puede ser un resultado de una eliminación del gen o lugar que codifica el Ncfl (p47phox). La eliminación puede ser heterocigoto u homocigoto en el mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un ratón.

La invención describe un método para detectar un agente para determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis. El método incluye: (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente; (b) administrar al mamífero no humano el agente; (c) inducir artritis en el mamífero no humano; (d) determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis en el mamífero no humano. La ruta oxidasa NADPH deficiente puede ser como se describió previamente. Determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis puede incluir etapas tales como: (a) determinar un día de inicio del valor artritis para el mamífero no humano; (b) comparar el día de inicio del valor de artritis para el mamífero no humano con un día de control de inicio del valor de artritis. El día de control de inicio del valor de artritis se puede determinar al determinar un día de inicio del valor de artritis para un mamífero no humano de control al que no se ha administrado el agente. El día de inicio de la artritis en el mamífero no humano se puede considerar retrasado si este está después del día del control del valor de inicio. La artritis inducida puede ser artritis inducida por adyuvante, artritis inducida por colágeno, o artritis inducida por pristano, o artritis inducida por hexadecano o artritis inducida por avridina, o artritis inducida por escualeno. y/o artritis inducida por aceite.

La invención describe un método para detectar un agente para determinar si el agente trata la artritis. El método incluye (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente, en donde el mamífero no humano exhibe síntomas de una artritis (por ejemplo, artritis inducida por adyuvante, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por pristano, artritis inducida por hexadecano, artritis inducida por avridina, artritis inducida por escualeno, o artritis inducida por aceite; (b) administrar al mamífero no humano el agente; y (c) determinar si el agente trata la artritis en el mamífero no humano.

Tal una etapa de determinación puede involucrar (a) calcular una clasificación de artritis en el mamífero no humano; y (b) comparar la clasificación de la artritis con una clasificación de artritis de control. La clasificación de la artritis de control se puede determinar al calcular una clasificación de artritis para un mamífero no humano de control al que no se ha administrado el agente. El agente se puede determinar para tratar la artritis si la clasificación de artritis en el animal no humano es menor que la clasificación de artritis de control.

La invención describe un método para detectar un agente para determinar si el agente evita la artritis. El método incluye: (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente; (b) administrar al mamífero no humano el agente; (c) administrar un compuesto conocido por inducir la artritis al mamífero no humano; y (d) determinar si el agente evita la artritis inducida por el compuesto en el mamífero no humano. Determinar si el agente evita la artritis puede incluir evaluar dicho mamífero no humano para síntomas de artritis. Tal una evaluación puede ocurrir durante un periodo de tiempo, por ejemplo, por hasta 20 días, hasta 30 días, hasta 50 días, o hasta 70 días. Determinar si el agente evita la artritis puede incluir comparar cualquier síntoma de la artritis y su día de inicio con los síntomas y día de inicio de un mamífero no humano de control al que dicho agente no se ha administrado. El compuesto conocido por inducir la artritis puede ser un adyuvante, colágeno, pristano, hexadecano, avridina, escualeno, y/o aceite. El colágeno puede ser colágeno tipo II; el aceite puede ser adyuvante incompleto de Freund y el adyuvante puede ser derivado de micobacterias.

La invención describe un método para identificar un agente que inhibe la actividad oxidasa NADPH en un linfocito, en donde el linfocito es de una rata DA. El método incluye: (a) poner en contacto el linfocito con PMA y un agente de prueba para formar una célula de prueba; (b) determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en la célula de prueba al medir el superóxido; (c) determinar si o no el nivel es menor que un nivel de control de actividad oxidasa NADPH, en donde el nivel de control es la cantidad de actividad oxidasa NADPH en una célula de control tratada con PMA en

la ausencia del agente de prueba; y (d) identificar el agente por inhibir la actividad oxidasa NADPH cuando el nivel es menor que el nivel de control.

La invención describe una rata no DA que comprende células T heterólogas de un animal no humano susceptibles a inducción de artritis, en donde la rata no DA tiene artritis. La rata puede ser una rata E3. El animal no humano puede ser una rata DA.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados aquí tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos o materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en la práctica o prueba de la presente invención, adelante se describen métodos y materiales adecuados.

En caso de conflicto, la presente especificación, que incluye definiciones, prevalecerá. Adicionalmente, los materiales como métodos y ejemplos solo son de ilustración y no se pretende se sean limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que compara la clasificación de la artritis clínica media determinada en el día 10, 14, 19, 24, y 28 después de inyección de pristano de ratas DA, ratas DA. E3chr12+/-, y ratas DA. E3chr12-/-.

La Figura 2 es un mapa físico de la región Pia4 construida utilizando clones PAC y clones EST.

La Figura 3 es una alineación de las secuencias de cAND de E3 y DA p47phox amplificadas de el ARNA de ratas E3 y DA.

La Figura 4 es un conjunto de gráficas de barra que demuestran que los niveles de plasma de cartílago de proteína de matriz oligomérica (COMP; Figura 4A) y glicoproteína de ácido α 1 (AGP; Figura 4B) son significativamente menores en ratas congénita DA. E3chr12 que en camadas de ratas de control DA ($p < 0.005$).

La Figura 5 es un conjunto de curvas de absorbancia que ilustran la producción de especies reactivas al oxígeno en una rata DA (Figura 5A), una rata E3 (Figura 5B), una rata DA. E3c12+/- (Figura 5C), y una rata DA. E3c12-/- (Figura 5D).

La Figura 6 es una gráfica que ilustra la severidad incrementada de la artritis en ratas tratada con un inhibidor NADPH, cloruro de difenilenoyodo (DPI).

La Figura 7 es una gráfica de barras que ilustra que las ratas tratadas con DPI tienen mayores calificaciones de artritis acumulada que las ratas de control.

La Figura 8 es una gráfica de barras que ilustran que la transferencia de células T activadas con Concanavalin A (ConA) de una rata DA produce artritis severa en camadas de ratas de control DA (DA), en rata DA. E3chr12 +/- (HET), y en ratas DA. E3chr12-/- (E3).

La Figura 9 es un conjunto de gráficas que muestran la activación de la absorción rápida de las células peritoneales de rata E3 (Figura 9A) y células HL60 (Figura 9B) después de tratamiento con alcanos *in Vitro*. La absorción rápida oxidativa se mide con el ensayo WST-1.

La Figura 10 es un conjunto de gráficas que demuestran los efectos de los alcanos que inducen artritis 12-31 días después de administración.

La Figura 10A demuestra la clasificación media; La Figura 10B demuestra la clasificación aditiva; y La Figura 10C demuestra la clasificación máxima de acuerdo con el sistema de clasificación extendido descrito aquí después de la inyección de alcanos intra-dérmicamente en la base de la cola.

La Figura 11 es un conjunto de gráficas que demuestran la severidad del PIA en ratas DA tratadas con undecano o undecanol en puntos de tiempo variantes. La Figura 11A demuestra la clasificación media; La Figura 11B demuestra la clasificación aditiva y La Figura 11C demuestra la clasificación máxima.

La Figura 12 es un conjunto de gráficas que demuestran la severidad de la artritis inducida por hexadecano después de tratamiento con hexadeceno en el día -5 o en el día +5. La Figura 12A demuestra la clasificación media; La Figura 12B demuestra la clasificación aditiva; y La Figura 12C demuestra la clasificación máxima.

La Figura 13 es una gráfica de barras que demuestra la severidad del artritis en ratas tratadas con aceite etiquetados radiactivamente.

La Figura 14 es una gráfica de barras que ilustra la distribución de tejido de los aceites 14C etiquetados en 10, 20, y 30 días post-inyección. La actividad se mide en un contador β durante un minuto. Note que LN = nodos linfáticos.

La Figura 15 es una gráfica de barras que ilustra la distribución de [1-14C]-hexadecano para los nodos linfáticos según se mide en el contador β (Beckman) durante un minuto.

La Figura 16 es un conjunto de gráficos de barras que demuestran el efecto del fitol en el desarrollo del EAE en ratas DA tratadas con fitol en el día -10, -5 o el día +5. La Figura 16A demuestra la clasificación aditiva; La Figura 16B demuestra la clasificación máxima. Se utiliza aceite de oliva como control.

La Figura 17 es un conjunto de gráficas que demuestran el efecto del tratamiento del fitol en el desarrollo de PIA con diferentes rutas de administración de fitol. La Figura 17A demuestra la clasificación media; La Figura 17B demuestra la clasificación aditiva; y La Figura 17C demuestra la clasificación máxima.

La Figura 18 es un conjunto de gráficas que ilustran el inicio del CIA en ratones deficientes *Ncfl* (p47phox), ambos homocigotos y heterocigotos, según se compara con ratones B 10.Q. La Figura 18A demuestra la clasificación media; La Figura 18B demuestra la clasificación máxima; La Figura 18C demuestra la clasificación aditiva.

La Figura 19 es una gráfica de barras que muestra el día medio de inicio del CIA en ratones deficientes *Ncfl*, ambos homocigotos o heterocigotos, según se compara con ratones B 10.Q.

La Figura 20 es una gráfica de barras que muestran los niveles COMP en suero en ratones deficientes *Ncfl*, ambos homocigotos y heterocigotos, según se compara con ratones B10. Q luego de inducción de CIA por inyección de CII en rata.

La Figura 21 es una gráfica de barras que muestra los niveles de anticuerpos anti-colágeno en ratones deficientes *Ncfl* ambos homocigotos y heterocigotos, según se compara con ratones B10. Q luego de inducción de CIA por inyección de ratos CII.

La Figura 22 es una gráfica que demuestra el efecto del tratamiento de fitol de CIA utilizando diferentes rutas de administración.

La Figura 23 es un conjunto de gráficas que demuestran el efecto del tratamiento del PIA activo utilizando diferentes agentes activos y rutas de administración. Se administran. 200 μ L de fitol (Figura 23A) o undecano (Figura 23B) en el día 21 y día 26.

Descripción detallada

La invención proporciona métodos y materiales relacionados con el diagnóstico y tratamiento de afecciones auto-inmunes (por ejemplo, artritis). Específicamente, la invención proporciona métodos y materiales involucrados en diagnosticar mamíferos susceptibles a la artritis y mamíferos que tienen AANOD. Adicionalmente, la invención proporciona métodos y materiales involucrados en tratar mamíferos susceptibles a la artritis y mamíferos que tienen AANOD. Adicionalmente, la invención proporciona métodos y material involucrados en identificar agonistas y antagonistas de la actividad oxidasa NADPH.

1. Diagnóstico de Mamíferos Susceptibles a la Artritis

La invención proporciona métodos para evaluar una susceptibilidad de mamífero a desarrollar artritis. El mamífero puede ser un humano, mono, cabra, caballo, vaca, cerdo, perro, gato, ratón, o rata. En resumen, una susceptibilidad de mamífero a desarrollar artritis se puede determinar al examinar el nivel de actividad oxidasa NADPH presente dentro de las células del mamífero. Este nivel de actividad oxidasa NADPH se puede comparar luego con un nivel de control, y el mamífero se puede clasificar por ser susceptible a desarrollar artritis si el nivel de oxidasa NADPH en las células del mamífero es menor que el nivel de control como se describe adicionalmente adelante.

El nivel de actividad oxidasa NADPH en una célula de mamífero se puede determinar utilizando un método conocido. Por ejemplo, la actividad oxidasa NADPH se puede evaluar al medir la cantidad de especies de oxígeno reactivas generadas. Como se utiliza aquí, el término "especies de oxígeno reactivas" incluyen, sin limitación especies parcialmente reducidas de oxígeno tal como Ion superóxido (O_2^*), peróxido hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^*) e ión hidróxido. La cantidad de especies de oxígeno reactivo generadas se pueden medir utilizando métodos estándar tal como aquellos que involucran medir la reducción de citocromo C, luminiscencia de lucigenina, luminiscencia de luminol, y fluorescencia DCFDA. Alternativamente, el nivel de actividad oxidasa NADPH en una célula de mamífero se puede determinar al medir el nivel de los componentes conocidos para reflejar la actividad oxidasa NADPH. Tales componentes incluyen, sin limitación hacer circular dialdehído malónico.

Después de determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH presente dentro de las células de los mamíferos, este nivel de actividad oxidasa NADPH se puede comparar con un nivel de control de actividad oxidasa NADPH para esa especie particular. El nivel de control de la actividad oxidasa NADPH para una especie particular es el nivel promedio de actividad oxidasa NADPH medido en las células de una población de miembros saludable de esa especie particular. En el caso de los humanos, el nivel de control de la actividad oxidasa NADPH puede ser el nivel promedio de la actividad oxidasa NADPH en células de 5, 10, 20, 30, 40, 50, o más humanos saludables. Si el nivel de actividad

oxidasa NADPH en una célula de mamífero es menor que el nivel de control, entonces el mamífero se puede clasificar por ser susceptible a la artritis. Por ejemplo, un mamífero que tiene una actividad oxidasa NADPH que no es mayor del 85 por ciento (por ejemplo, no mayor del 75,65, 55,45, 35,25, 15,5, o menos) del nivel de control se pueden clasificar por ser susceptibles a la artritis.

Alternativamente, un mamífero (por ejemplo, humano) que tiene actividad oxidasa NADPH deteriorada se pueden clasificar por ser susceptible a la artritis. Por ejemplo, un humano que tiene actividad oxidasa NADPH deteriorada tal que una muestra de aproximadamente 1×10^6 granulocitos de ese humano exhibe menos de 0.3 a 0.4 unidades de absorbancia (550nm) de reducción de citocromo C después de aproximadamente 7 minutos de tratamiento con 0.01 μM fMLP se puede clasificar por ser susceptible a la artritis. En una modalidad, un humano que tiene células con no más de aproximadamente 85 por ciento (por ejemplo, no más de 75,65, 55,45, 35,25, 15,5, o menos) de este nivel de actividad se clasifica por ser susceptible a la artritis.

La células se pueden tratar con activadores diferentes de fMLP tal como agentes que afectan la señalización celular al modular la fosforilación (por ejemplo, PMA) agentes que desestabilizan las membranas celulares (por ejemplo pristano, escualeno, fitol, y hexadecano), y agentes que unen receptores de superficie celular (por ejemplo, galectina 1 y galectina 3).

Cualquier tipo de muestra se puede utilizar para determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH en una célula de mamífero. Por ejemplo, la muestra puede ser sangre, fluido sinovial, o células que contienen fluido linfático (por ejemplo, PBMC) que tienen una actividad oxidasa NADPH. Las células que tienen actividad oxidasa NADPH incluyen, sin limitación, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, leucocitos polimorfonucleares, y células mononucleares. Los métodos estándar se pueden utilizar para obtener tales muestras de los mamíferos. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de sangre por punción venosa. La muestra se puede someter a cualquier procedimiento preparatorio estándar necesario antes de evaluar la actividad oxidasa NADPH. Por ejemplo, Las células que contienen muestras de sangre se pueden someter a centrifugación y/o etapas de lavado para aislar las células de las cuales el nivel de actividad oxidasa NADPH se puede medir.

En otra modalidad, una susceptibilidad de mamífero a desarrollar artritis se puede determinar al examinar por lo menos una porción de la secuencia de aminoácido de un polipéptido dentro de la ruta oxidasa NADPH de mamífero. Tales polipéptidos incluyen, sin limitación, polipéptidos GP91PHOX polipéptidos P22PHOX, polipéptidos P40PHOX, polipéptidos P47PHOX, y polipéptidos P67PHOX. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de polipéptidos P47PHOX de mamífero se puede determinar. Se puede utilizar cualquier método para determinar la secuencia de aminoácido de un polipéptido. Por ejemplo, las técnicas de secuenciamiento de aminoácido estándar se pueden utilizar para determinar la secuencia de aminoácido de una preparación de polipéptido P47PHOX purificada. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el polipéptido se puede secuenciar utilizando técnicas de secuenciamiento de ácidos nucleicos estándar. Una vez se determina la secuencia de ácido nucleico, se puede deducir la secuencia de aminoácido del polipéptido codificado.

Después de determinar por lo menos una porción (por ejemplo aproximadamente 10,20, 30,40, 50,60, 70,80, 90, o 100 por ciento) de la secuencia de aminoácido de un polipéptido dentro de la ruta oxidasa NADPH de mamífero, la secuencia de aminoácido se puede comparar con la secuencia de aminoácido de un polipéptido de referencia comparable que funciona en la ruta oxidasa NADPH de tal manera que se observa por lo menos aproximadamente el 70 por ciento (por ejemplo por lo menos aproximadamente 75,80, 85,90, 95, o 99 por ciento) de actividad oxidasa NADPH máxima. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido de un polipéptido P47PHOX de mamífero se puede comparar con la secuencia de aminoácido de un polipéptido P47PHOX que permite que una célula exhiba por lo menos aproximadamente 70 por ciento de actividad oxidasa NADPH máxima. De la misma manera, la secuencia de aminoácido de un polipéptido GP91PHOX de mamífero se puede comparar con la secuencia de aminoácido de un polipéptido GP91PHOX que permite que una célula exhiba por lo menos aproximadamente 70 por ciento de actividad oxidasa NADPH máxima.

El término “actividad oxidasa NADPH máxima” como se utiliza aquí se refiere al nivel máximo promedio de actividad oxidasa NADPH medida en células de los miembros saludable de una especie particular. Por ejemplo, en ratas, la actividad oxidasa NADPH máxima cuando se mide el superóxido libera de aproximadamente 5×10^6 neutrófilos peritoneal utilizando reducción de citocromo C que puede ser de 0.15-0.25 unidades de absorbancia (550 nm) en aproximadamente 1000 segundos luego de estimulación con PMA. Las células se pueden tratar con activadores diferentes de PMA tal como fMLP, los agentes que desestabilizan las membranas celulares (por ejemplo, pristano, escualeno, fitol, y hexadecano), y agentes que unen los receptores de superficie celular (por ejemplo, galectina 1 y galectina 3).

En razón a que las células de las ratas E3 exhiben por lo menos aproximadamente 70 de su actividad, las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos que funcionan en la ruta oxidasa NADPH de la rata E3 se pueden utilizar como polipéptidos de referencia. Por ejemplo, una secuencia de aminoácido de rata de un polipéptido P47PHOX se puede comparar con la secuencia de aminoácido del polipéptido P47PHOX de ratas E3, que se establece en la SEQ ID NO: 4. En humanos, la actividad oxidasa NADPH máxima cuando se mide la liberación del superóxido de aproximadamente 1×10^6 granulocitos utilizando reducción de citocromo C puede ser 0.3 a 0.4 unidades de absorbancia (550 nm) aproximadamente 7 minutos luego de estimulación con 0.01 μM de fMLP. Así, los polipéptidos que funcionan en la ruta oxidasa NADPH de células humanas que exhiben por lo menos 70 por ciento de esa actividad se pueden utilizar

como polipéptidos de referencia. Cuando se evalúa un polipéptido P47PHOX de humano, el polipéptido P47PHOX de humano que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 6 se puede utilizar como un polipéptido de referencia.

- 5 Si el mamífero que se trata contiene un polipéptido mutante cuando se compara con un polipéptido de referencia comparable, entonces el mamífero se puede clasificar por ser susceptible a desarrollar artritis. El polipéptido mutante puede ser un polipéptido que contiene adiciones de aminoácidos, sustracciones, sustituciones, o combinaciones de estos cuando se comparan con la secuencia de un polipéptido de referencia comparable. Por ejemplo, un polipéptido mutante puede ser una polipéptido que tiene cualquier número de diferencias de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 10 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, o más adiciones, sustracciones, o sustituciones de aminoácidos) cuando se compara con un polipéptido de referencia comparable. Así, en una modalidad, un humano se puede clasificar por ser susceptible a desarrollar artritis si ese humano contiene un polipéptido P47PHOX que tiene una secuencia de aminoácido con una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más) cuando se compara con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 15 6. alternativamente, se puede clasificar un humano por ser susceptible a desarrollar artritis si ese humano contiene un polipéptido P47PHOX que tienen una secuencia de aminoácido con un residuo aminoácido diferente de valina en la posición que alinea con la posición 106 de la SEQ ID NO: 4.

- Adicionalmente, un polipéptido mutante puede ser un polipéptido que le falta uno o más sitios de fosforilación. 20 Típicamente, los sitios de fosforilación son residuos de serina, treonina, o tirosina. Así, a un polipéptido que le falta uno o más residuos de serina, treonina, o tirosina cuando se compara con un polipéptido de referencia comparable puede ser un polipéptido mutante. En una modalidad, se puede clasificar un humano por se susceptible a desarrollar artritis si ese humano contiene un polipéptido P47PHOX que tienen una secuencia de aminoácido que le falta uno o más residuos serina, treonina o tirosina (por ejemplo mas de 2,3, 4,5, 6,7, 8,9, o 10) cuando se compara con las 25 secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 6., alternativamente, se puede clasificar un humano por ser susceptible a desarrollar artritis si ese humano contiene un polipéptido P47PHOX que tiene una secuencia de aminoácido con un residuo aminoácido diferente a treonina en la posición que alinea con la posición 153 de SEQ ID NO: 4.

- Adicionalmente para utilizar la presencia de un polipéptido mutante para determinar si o no un mamífero particular es susceptible a la artritis, las secuencias reguladoras (por ejemplo promotores, mejoradores, y silenciadores) que controlan la expresión de un polipéptido que funciona en la ruta oxidasa NADPH se pueden examinar. Por ejemplo, las secuencias promotoras que controlan la expresión del polipéptido P47PHOX se pueden comparar con aquellas 30 secuencias promotoras que controlan la expresión del polipéptido P47PHOX normal en humanos saludables. En este caso, un humano que tiene una secuencia promotora reguladora mutada se puede clasificar por ser susceptible a 35 desarrollar artritis.

2. Diagnóstico de Mamíferos que tienen AANOD

- 40 La invención proporciona métodos para determinar si un mamífero tiene un tipo de artritis particular. Específicamente, se puede diagnosticar un mamífero por tener AANOD si ese mamífero tiene (1) síntomas clínicos de artritis y (2) las células que tienen un nivel de actividad oxidasa NADPH que es menor que un valor de control o está deteriorado. Adicionalmente, un mamífero puede ser diagnosticado por tener AANOD si ese mamífero tiene (1) síntomas clínicos de artritis y (2) un polipéptido que funciona en la ruta oxidasa NADPH y que contiene una mutación cuando 45 se compara con un polipéptido de referencia comparable como se describe aquí.

- Los síntomas clínicos de la artritis incluyen, sin limitación, inflamación de los tendones, ligamentos, articulaciones, o huesos. Los síntomas de la artritis también incluyen dolor, hinchamiento, y rigidez en las articulaciones que pueden conducir a debilidad, pérdida de la movilidad, y deformidad en el mamífero. Ejemplos de artritis incluyen, 50 sin limitación, artritis bacteriana, osteoartritis, artritis reumatoide (RA), artritis inducida por colágeno (CIA), artritis inducida por hexadecano(HIA), artritis inducida por pristano (PIA), artritis inducida por avridina, artritis inducida por adyuvante, artritis inducida por escualeno (SIA), y artritis inducida por aceite (OIA).

- El nivel de actividad oxidasa NADPH dentro de una célula de mamífero se puede evaluar cómo se describe aquí. 55 De la misma manera, los métodos y materiales descritos aquí se pueden utilizar para determinar si o no un mamífero contiene un polipéptido mutante que funciona en la ruta oxidasa NADPH.

3. Tratamiento de Artritis

- 60 La invención proporciona métodos y materiales para tratar artritis (por ejemplo, AANOD) en un mamífero. Los métodos para tratar la artritis tal como AANOD incluye administrar un agente que incrementa el nivel de actividad oxidasa NADPH en el mamífero. Por ejemplo, un agente que incrementa una producción de células de especies de oxígeno reactivo de puede administrar a un mamífero con artritis. Tales agente incluyen, sin limitación, norfloxaci- na, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, octano, 65 decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, heptadecano, octadecano; agentes que desestabilizan las membranas celulares (por ejemplo, pristano, scualeno, fitol, y hexadecano), y agentes que unen los receptores de superficie celular (por ejemplo, galectina 1 y galectina 3). Alternativamente, el agente puede ser un derivado más polar de los compuestos mencionados anteriormente. Por ejemplo, el agente puede ser un undeceno, hexadeceno), o

un derivado ácido de los compuestos mencionados anteriormente. En una modalidad, se utiliza hexadeceno. En otra modalidad se utiliza undecano.

Los agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH se pueden administrar en cualquier forma estándar utilizando cualquier método estándar. Por ejemplo, los agentes que incrementa la actividad oxidasa NADPH pueden estar en la forma de comprimidos o capsulas (por ejemplo, capsulas de liberación en el tiempo) que se toman oralmente. Alternativamente, los agentes pueden estar en una forma líquida y se pueden tomar oralmente o por inyección. Los agentes también pueden estar en la forma de supositorios. Adicionalmente, los agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH pueden estar en la forma de cremas, geles, y espumas que se pueden aplicar a la piel. Adicionalmente, los agentes pueden estar en la forma de un inhalante que se aplica nasalmente. Los agentes se pueden administrar intradérmicamente, intra-peritonealmente o intra-nasalmente.

Los agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH se pueden administrar en cualquier dosis que sea suficiente para incrementar la actividad oxidasa NADPH en células que tienen baja actividad. Tales dosis se pueden tomar durante un periodo de años para evitar y/o retrasar la progresión de la artritis o para reversar la progresión de la artritis. Las dosis se pueden seleccionar con base en la efectividad y la toxicidad del agente particular utilizando técnicas de farmacología estándar.

4. Identificación de Agente que Modifica la Actividad Oxidasa NADPH

La invención proporciona método y materiales para identificar agentes que modulan la actividad Oxidasa NADPH. Los agentes que modulan la actividad oxidasa NADPH pueden incrementar o reducir la actividad oxidasa NADPH. Ejemplos de agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH incluyen, sin limitación, norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fMLP, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, heptadecano, octadecano; agentes que desestabilizan las membranas celulares (por ejemplo, pristano, escualeno, fitol, y hexadecano), y agentes que unen los receptores de superficie celular (por ejemplo, galectina 1 y galectina 3). Ejemplos de agentes que reducen la actividad oxidasa NADPH incluyen, sin limitación, difenileno de yodo, fenoles, apocinina, quinona, ligandos haem, piroxicam, (2,3-dimetil-6 (2-dimetilaminoetil)-6H-indolo-(2,3-b)quinoxalina) B220, lidocaína, gliotoxina, hidrocortisona, (ácido 6-[2-(3,4-dietoxifenil)tiazol-4-il]-piridino-2-carboxílico) OPC-6535 y cromolin.

Para identificar agentes que incrementan o reducen la actividad oxidasa NADPH, se puede mezclar un agente de prueba con una muestra que contiene células o fracciones celulares que tienen actividad oxidasa NADPH. Tales células se pueden ser humanos (por ejemplo, pacientes humanos saludables o con artritis) o animales no humanos (por ejemplo, animales saludables no humanos o animales no humanos susceptible a la artritis tal como aquellos susceptibles a la inducción de artritis). Un animal es susceptible a la inducción de artritis si ese animal desarrolla una afección de artritis en respuesta al tratamiento con un agente inductor (por ejemplo, colágeno o pristano). Tales animales incluyen aquellos susceptibles a CIA, PIA, HIA, SIA, y OIA. El animal no humano puede ser cualquier tipo de animal que incluye, sin limitación, monos (por ejemplo, chimpancés) caballos, cabras, vacas, cerdos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

Un ejemplo de un animal no humano que es susceptible a la artritis es una rata que es susceptible a PIA tal como la rata DA. Una rata se puede identificar como un miembro de la cepa DA (o cualquier cepa de interés) utilizando métodos estándar. Por ejemplo, las técnicas de secuenciación de ácido nucleico estándar se pueden utilizar para comparar secuencias de ácido nucleico mitocondrial o genómicas que incluyen, sin limitación, (1) secuencias de microsatélite, (2) secuencias de ácido nucleico que codifican complejos de histocompatibilidad principal, o (3) secuencias de ácido nucleico que codifican ARN ribosómico 18S. la comparación de la secuencia de ácido nucleico de dos animales se puede lograr utilizando herramientas de análisis genético tal como métodos basados en polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y métodos basados en ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD). Dos animales pueden ser excluidos por ser de la misma cepa si las secuencias de ácidos nucleico de ambos animales tienen características similares cuando se analizan por RFLP o RAPD.

Después de ser tratados con el agente de prueba, se puede determinar el nivel de actividad oxidasa NADPH. La muestra puede ser cualquier tipo de muestra que contiene una célula o una fracción celular que tienen actividad oxidasa NADPH. La muestra puede ser sangre, linfocitos, o líquido sinovial. La célula puede ser un linfocito, granulocito (por ejemplo, neutrófilos) o macrófago.

La actividad oxidasa NADPH determinada en la presencia de un agente de prueba se puede comparar con la actividad oxidasa NADPH determinada en la ausencia del agente de prueba. Los agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH son aquellos que conducen a un incremento en la actividad oxidasa NADPH mediante cualquier cantidad (por ejemplo, un incremento del 5,10,20,30,40,50,75,100,125,150,200, o más por ciento) cuando se compara con el nivel de actividad oxidasa NADPH observada en la ausencia del agente de prueba. Agentes que reducen la actividad oxidasa NADPH son aquellas que conducen a una reducción en la actividad oxidasa NADPH mediante cualquier cantidad (por ejemplo, una reducción de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, o más por ciento) cuando se compara con el nivel de actividad oxidasa NADPH observado en la ausencia del agente de prueba.

En otra modalidad, los agentes que incrementan o reducen la actividad oxidasa NADPH se pueden identificar en una mezcla de ensayo que incluye oxidasa NADPH, un activador, y un agente de prueba. En estas modalidades, la

actividad oxidasa NADPH, determinada en la presencia de un activador y un agente de prueba, se puede comparar con la actividad oxidasa NADPH determinada en la presencia del activador sin el agente de prueba. Como se describe aquí, los agentes que incrementan la actividad oxidasa NADPH son aquellos que, cuando están presente en la mezcla de ensayo oxidasa NADPH, conducen a un incremento en la actividad oxidasa NADPH mediante cualquier cantidad (por ejemplo, un incremento de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, o más por ciento) cuando se compara con un nivel de actividad oxidasa NADPH observado en la ausencia del agente de prueba, cuando los agentes que reducen la actividad oxidasa NADPH son aquellos que, cuando están presente en la mezcla de ensayo oxidasa NADPH, conducen a una reducción en la actividad oxidasa NADPH mediante cualquier cantidad (por ejemplo, una reducción del 5,10,20,30,40,50,75, o más por ciento) cuando se compara con el nivel de actividad oxidasa NADPH observado en la ausencia del agente de prueba.

5. Ratas no DA que Contienen Células T Heterólogas

La invención proporciona métodos y materiales para general un animal (por ejemplo, un roedor tal como una rata o ratón) que tiene células T heterólogas en combinación con una nueva forma de artritis inducible (por ejemplo, artritis inducida por células; TIA). El TIA se puede generar en un animal al introducir el animal receptor, las células T de un animal donante que tiene artritis. Los animales receptores y donantes pueden ser de diferentes cepas o pueden ser miembros del mismo grupo innato de animales que difieren solo con respecto a (1) el QTL que contribuye a susceptibilidad artrítica tal como QTL Pia4 o (2) la secuencia del gen p47phox. Las células T se pueden aislar de un animal utilizando cualquier procedimiento estándar que incluye homogenización del bazo. La transferencia de células T se puede desarrollar utilizando cualquier procedimiento convencional. Un animal con TIA se puede utilizar como se describe aquí para identificar agentes que modifique la actividad oxidasa NADPH.

6. Mamíferos no Humanos que Tienen Rutas Oxidasa NADPH Deficientes

Otro aspecto de la invención representan métodos y materiales para proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente, en donde el mamífero no humano exhibe síntomas de una enfermedad autoinmune. El mamífero puede ser un mono, cabra, caballo, vaca, cerdo, perro, gato, ratón o rata. La enfermedad autoinmune puede ser artritis, esclerosis múltiple, lupus, uveítis autoinmune, diabetes tipo I, asma bronquear, artritis séptica inducida por estafilococos o estreptococos, o enfermedades cardiovasculares que involucran vasculitis. Por ejemplo, el mamífero no humano puede exhibir síntomas de artritis. La artritis se puede inducir por técnicas estándar conocidas en el arte y pueden ser, por ejemplo, artritis inducida por adyuvante CIA, PIA, HIA, artritis inducida por avridina, SIA, o OIA.

La ruta oxidasa NADPH en el mamífero no humano se puede indicar mediante una actividad oxidasa NADPH. La actividad oxidasa NADPH reducida puede ser un resultado de un polipéptido mutante en donde el polipéptido mutante funciona en la ruta oxidasa NADPH. Por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser un polipéptido GP91PHOX, polipéptido P22PHOX, polipéptido P40PHOX, polipéptido P47PHOX, o polipéptido P67PHOX. Por ejemplo, el polipéptido mutante puede ser un polipéptido P47PHOX. El polipéptido P47PHOX mutante puede contener la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 con por lo menos dos sustituciones de aminoácido. El polipéptido P47PHOX mutante puede contener una secuencia de aminoácido que tiene un residuo de aminoácido diferente a valina en la posición que se alinea con la posición 106 de SEQ ID NO: 4 o un residuo de aminoácido diferente a treonina en la posición que se alinea con la posición 153 de SEQ ID NO: 4. En otras modalidades, la actividad oxidasa NADPH reducida puede ser un resultado de una eliminación del gen o lugar que codifica el Ncf1 (p47phox). La eliminación puede ser heterocigoto o homocigoto en el mamífero no humano. En una modalidad, el mamífero no humano puede ser un ratón. Por ejemplo, el ratón puede tener el gen para Ncf1 (p47phox) transgénico utilizando técnicas estándar en el arte, o el ratón puede expresar uno de los polipéptidos P47PHOX mutantes como se describió precisamente (por ejemplo, un ratón transgénico).

7. Detección de Agentes que Retrasan, Tratan o Evitan la Artritis

En otra modalidad, la invención proporciona un método para detectar una agente para determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis. El método incluye: (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente; (b) administrar al mamífero no humano el agente; (c) inducir artritis en el mamífero no humano; y (d) determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis en el mamífero no humano.

El mamífero que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente se puede obtener como se describió previamente. Determinar si el agente retrasa el inicio de la artritis puede incluir etapas tales como: (a) determinar un día de inicio del valor de artritis para el mamífero no humano; y (b) comparar el día de inicio del valor de artritis para dicho mamífero no humano con un día de control de inicio de valor de artritis. El inicio de la artritis se puede monitorear utilizando un sistema de clasificación microscópico, en donde el punto 1 se da para cada dedo rojo o hinchado, un punto para cada parte media del pie, dedo o nudillo hinchado, y 5 puntos para un tobillo hinchado, dando una clasificación máxima de 15 por miembro y un total de 60. La clasificación puede ser una clasificación media, clasificación aditiva, o calcificación máxima. El mamífero se puede monitorear 1 a 4 veces por semana durante 1 a 2 meses después de inducción de artritis. El día de control de inicio del valor de artritis se puede determinar al determinar un día de inicio

del valor de artritis para un mamífero no humano de control al que no se ha administrado el agente. El DIA de inicio de la artritis en el mamífero no humano se puede considerar retrasado si este está después del día de control del valor de inicio. La artritis se puede inducir por medios convencionales y puede ser artritis inducida por adyuvante, CIA, PIA, HIA, SIA, inducida por avridina, o OIA.

La invención también proporciona métodos para detectar un agente para determinar si el agente trata la artritis. El método incluye (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente, en donde los mamíferos exhiben síntomas de una artritis (por ejemplo, artritis inducida por adyuvante, CIA, PIA, HIA, SIA, artritis inducida por avridina, u OIA); (b) administrar al mamífero no humano el agente; (c) determinar si el agente trata la artritis en el mamífero no humano. Tal una etapa de determinación puede involucra (a) calcular una clasificación de artritis en el mamífero no humano; y (b) comparar la clasificación de artritis con una clasificación de artritis de control. El mamífero que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente exhibe síntomas de artritis que se pueden obtener como se describió anteriormente. La clasificación de artritis de control se puede determinar al calcular una clasificación de artritis para un mamífero no humano de control al que no se ha administrado el agente. La clasificación de artritis se puede determinar utilizando el sistema de clasificación microscópico descrito previamente, y puede ser una clasificación media, clasificación de aditivo o clasificación máxima. El agente se puede determinar para tratar la artritis si la clasificación de artritis en el animal no humano es menor que la clasificación de artritis de control.

En otra modalidad, se suministra un método para detectar un agente para determinar si el agente evita la artritis. El método incluye: (a) proporcionar un mamífero no humano que tiene una ruta oxidasa NADPH deficiente; (b) administrar al mamífero no humano el agente; (c) administrar un compuesto conocido por inducir artritis al mamífero no humano; y (d) determinar si el agente evita la artritis inducida por el compuesto en el mamífero no humano. Determinar si el agente que evita la artritis puede incluir evaluar dicho mamífero no humano para síntomas de artritis. Tal una evaluación puede ocurrir durante un periodo de tiempo, por ejemplo, durante hasta 20 días, hasta 30 días, hasta 50 días, o hasta 70 días. Determinar si el agente que evita la artritis puede incluir comparar cualquier síntoma de artritis y su día de inicio con los síntomas y el día de inicio de un mamífero no humano de control al que no se ha administrado dicho agente. El sistema de clasificación microscópico como se describió anteriormente se puede utilizar en la evaluación y comparación. El compuesto conocido por inducir artritis puede ser un adyuvante, colágeno, pristano, hexadecano, escualeno, avridina, o aceite. El colágeno puede ser colágeno tipo II; el aceite puede ser adyuvante incompleto de Freund; y el adyuvante puede ser derivado de micobacterias.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de las invenciones descritas en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Animales

Cepas de rata (*Rattus norvegicus*) utilizadas en los siguientes experimentos incluyen la sepa de DA, que es altamente susceptible a PIA, y la cepa E3, que es resistente al PIA, se obtienen ratas E3 y DA de Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Alemania, y se mantienen en instalaciones animales que tienen ambientes climatizados controlados con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Las ratas se alojan en jaulas de poliestireno que contienen viruta de madera y los roedores se alimentan con concentrado estándar y agua *ad libitum*. Las ratas están libres de patógenos comunes, incluyendo el virus Sendai, virus Hantaan, coronavirus, reovirus, citomegalovirus, y *Mycoplasma pulmonis*. La crianza de los animales y la experimentación se desarrolla en las mismas instalaciones de los animales.

Ejemplo 2

Inducción y Evaluación de Artritis

Se induce artritis en ratas en edad de 8 a 12 semanas por inyecciones intradérmicas de 150 μ l de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; Aldrich, Milwaukee, WI) en las bases de las colas. Se monitorea el desarrollo artrítico en todos los miembros utilizando un sistema de clasificación microscópico. En resumen, se da un punto para cada dedo rojo o hinchado, un punto para cada parte media del pie, dedo o nudillo hinchado y 5 puntos para un tobillo hinchado. La clasificación máxima para un miembro es 15 puntos y la clasificación máxima para una rata es 60 puntos. Las ratas se examinan de una a cuatro veces por semanas durante un mes después de inyección pristano.

Para análisis histopatológico, a los 31 días después de las inyecciones de pristano, se sacrifican las ratas, y las patas traseras y las articulaciones del tobillo se preparan y analizan como sigue. Las patas se fijan en 4% de paraformaldehído, descalcificado en EDTA, embebido en parafina, y luego se seccionan y tiñen con hematoxilin y eritrosina como se describe en in Jonsson *et al.* (1986) J Immunol Methods 88: 109-14.

Ejemplo 3

Confirmación de Enlace para Severidad de Artritis en Cepas Congénicas

Un locus de rasgos cuantitativo (QTL), denotado Pia4, se encuentra que está asociado con el PIA y CIA. Para identificar y aislar los genes en Pia4 QTL que se asocia con la artritis, un fragmento de 10 cM del cromosoma 12 de una rata E3 resistente al PIA se integra en una rata DA susceptible a PIA que resulta en una rata congénica DA. E3chr12. Otros genes E3 en el fragmento 10 cM que no se asocian con RA se remueven en más de 10 retro cruces sucesivos con una rata DA. Las camadas de rata DA obtenidas de entrecruces F2 entre ratas DA. E3chr12 +/- se utilizan como controles. El Pia4 QTL es heredado en una forma aditiva al DA con ratas DA que tienen el alelo que promueve la severidad de la artritis en los entrecruces F2 originales entre ratas E3 y DA. Las diferencias genotípicas significativas observadas cuando una progenie de rata se compara con una rata de control se puede concluir que han surgido de diferencias genéticas en la región Pia4.

Se induce artritis en 20 ratas DA, 40 ratas DA. E3chr12+/-, y 14 ratas DA. E3chr12-/- por inyección con pristano, y el desarrollo de la artritis clínica se evalúa como se describió anteriormente, la Figura 1 es una comparación de clasificación de artritis clínica determinada en el día 10, 14, 19, 24, y 28 después de inyección de pristano de ratas DA, las ratas DA. E3chr12+/-, y las ratas DA. E3chr12-/. Se observan diferencias dramáticas en la severidad de la artritis entre camadas de ratas de control DA y ratas congénicas DA. E3chr12 ($p < 0.0001$). Las ratas DA. E3chr12-/- congénicas todavía son susceptibles a la artritis, pero la inflamación es muy leve. Las incidencias de la artritis observada en los días 31 después de inyección de pristano es 100% entre ratas DA, 58% entre ratas DA. E3+/-, y 36% entre ratas DA. E3-/. Cuando las secciones de articulación de tobillo de pata trasera de rata obtenidas 31 después de inyección de pristano se tiñen hematoxilina y eritrosina y luego se examinan microscópicamente en magnificación 100x, se observan infiltraciones celulares en las articulaciones. Aunque el fenotipo E3 resistente al PIA producido por el Pia4 QTL se encuentra que es casi protector dominante, la progenie de ratas DA que llevan dos alelos E3 del cromosoma 12 exhiben aún artritis menos severa ($p < 0.05$) que la progenie de ratas DA que llevan un alelo E3 del cromosoma 12.

El fragmento E3 derivado que contiene el Pia4 QTL también se encuentra que suprime el CIA, HIA, y OIA (ver Tabla 1). Otros genes parecen involucrados en razón a que las ratas E3 congénicas para Pia4 derivado de DA, (por ejemplo, ratas E3. DA chr12-/-) es todavía resistente a la artritis.

TABLA 1

Susceptibilidad de Cepa de rata congénica Pia4 al CIA, OIA, y HIA

El valor P indica la significancia de la diferencia observada entre ratas congénicas Pia4 y ratas DA, no se detecta diferencia significativa entre el DA. E3chr12 +/- y DA. E3chr12-/-.

	Número de ratas de estudio	Tipo de Artritis	Clasificación Máxima	Valor p
DA	10	OIA	15.1 ± 4.7	
DA.E3chr12 +/-	15	OIA	4.5 ± 1.6	<0.05
DA.E3chr12 -/-	15	OIA	1.2 ± 0.7	<0.05
DA	13	CIA	50.3 ± 3.4	
DA.E3chr12 +/-	16	CIA	29.8 ± 4.8	<0.01
DA.E3chr12 -/-	7	CIA	29.4 ± 6.0	<0.01
DA	9	HIA	14.6 ± 2.5	
DA.E3chr12 +/-	8	HIA	3.9 ± 2.4	<0.05

Ejemplo 4

Secuenciamiento y mapeo físico

La colección de cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC) de la rata BN (RPCI-31) descrita en un *et al.* (1998) Genomics 50:306-16 se obtiene del Proyecto del Genoma Humano Alemán del Centro de Investigaciones (RZPD) (ver RZPD (www.rzpd.de) como grupos de ADN y filtros ensayados (librería colección 712). También se obtiene clones PAC positivos del RZPD así como también clones que tienen insertos de ADN que corresponden al ADN en la vecin-

dad de los microsatélites ligados al Pia4 (ver Gosele *et al* (2000) Genomics 69:287-94, www.mdc-berlin.de/ratgenom, y www.molgen.mpg.de/~ratgenome). Los clones PAC se purifican utilizando el kit de construcción grande Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) y se utilizan para el secuenciamiento final con los cebadores T7 Y SP6 como se describe en un *et al.* (1998) Genomics 50:306-16.

Las secuencias P47 phox, GRF2ird de cADN se determinan como sigue. Las secuencias públicamente disponibles que corresponden a P47 phox de rata (número de acceso GenBank ay029167), GTF2i de ratón (número de acceso GenBank AF017085) y las secuencias GTF2ird de ratón (número de acceso GenBank NM_020331) se utilizan para diseño de cebador. El ARN del E3, DA Y DA.E3 chr12 se aíslan utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Primero se sintetiza la hebra de cADN del total de ARN utilizando el kit de síntesis de cADN de primera hebra (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). los fragmentos de cADN vicatenarios se generan mediante PCR convencional y luego se ligan en el vector de clonación pCR4-TOPO TA. Las construcciones de plásmido resultantes se transforman en *E. coli* competente (Invitrogen, Paisley, UK), y luego se purifican de los transformantes *E. coli* de acuerdo con la purificación de lisis alcalina convencional. Se desarrolla secuenciamiento utilizando secuenciadora MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Y se analizan los datos obtenidos utilizando el análisis de secuencia 2.1 y SeqMan 4.05.

Ejemplo 5

Análisis estadístico y formación de genotipo

Se prepara ADN a partir de biopsias de dedos del pie y se ensayan con marcadores microsatélite por reacción de cadena de polimerasa (PCR) analizado en MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Los datos cuantitativos se expresan como media $\pm$ de EM, y se desarrolla el análisis de significancia utilizando la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Se determina la significancia los datos de frecuencia por análisis Chi cuadrado.

Ejemplo 6

Resultados de mapeo físico y clonación posicional

Para identificar los genes dentro de Pia4 QTL que contribuyen al fenotipo resistente PIA en ratas E3, ratas congénicas de DA. E3chr12 se retrocruzan con ratas DA y un gran número de progenie de ratas congénicas que llevan los fragmentos Pia4 traslapantes de diferentes tamaños se utilizan en el siguiente experimento. Se inicia el mapeo físico con un fragmento congénico de 1 cM. La figura 2 en un mapeo físico de la región Pia4 construida y utilizando clones PAC y clones EST. Los microsatélites conocidos (dl2rat72, dl2got45, dl2got46 y dl2rat26) en la región Pia4 se utilizan para identificar el PAC que llevan los insertos que corresponden a esta región. Los resultados del proyecto EST de rata en la universidad de Iowa (ver www.ratEST.uiowa.edu) se utilizan para identificar clones EST conocidos por contener las secuencias en la región Pia4. Las secuencias finales de los clones PAC y las secuencias cebadoras de los clones EST se utilizan para generar el mapa físico de la región Pia4. Adicionalmente, la información de secuencia de la región Pia4 en rata (clones PAC RP31-78c13, RP31-485f9, RP31-198113, RP31-75g22, RP31-1lm22, RP31-391d23 RP31-57j23), y clones BAC parcialmente secuenciados que tienen insertos que corresponden a la región Pia4 (www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat/), y las secuencias de las regiones homologas en ratones (números de acceso Genbank NT029829, AF289665, AF139987 and AF267747; ver Kwitek *et al.* (2001) Genome Res 11: 1935-43; Hoogenraad *et al.* (1998) Genomics 53: 348-58; Valero *et al.* (2000) Genomics 69: 1-13) and human (Genbank accession number NT_007867; see Peoples *et al.* (2000) Am JHum Genet 66: 47-68; Osborne *et al.* (2001) Nat Genet 29: 321-5) se ensamblan para formar el mapa Pia4 físico.

El mapa físico de la región Pia4 en combinación con la susceptibilidad a la artritis de cepas congénicas aisladas identifica una región mínima de 300 kilobases requerida para el fenotipo resistente al PIA. La región de 300 kilobase contiene dos genes: el gen p47phox y GTF2i. El gen Thep47phox codifica el factor Citosólico de Neutrófilo 1 (NCF1), una subunidad de complejo NADPH que produce radicales oxígeno como un resultado de la infección (ver Volpp *et al.* (1989) Proc Natl Acad Sci U S A 86: 7195-9). El gen GTF2i codifica la proteína asociada Tirosina Kinasa Bruton (BTK) (BAP-135), un sustrato del BTK involucrado en la ruta de señalización del receptor de células B Ver Yang & Desiderio (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94: 604-9.

Ejemplo 7

El alelo p47phox E3 tiene un papel protector dominante en artritis

El polimorfismo de nucleótidos sencillo (SNPs) que distingue los alelos de DA y E3 en la región Pia4 se identifican al secuenciar el cADN utilizando Pyrosequencing (Pyrosequencing, Uppsala, Suecia) de acuerdo con protocolos suministrados por el fabricante. El SNPs se encuentra en los genes p47phox, GTF2i, GTF2irdl y Cyln2 (AJ000485). Una comparación del cADN del DA p47phox y el cADN del E3 p47phox cADN revela tres SNP (ver Figura 3). Todos los 3 polimorfismos son sustituciones base de las que dos son no sinónimos y resultan en sustituciones en las posiciones aminoácido 106 and 153. Estos polimorfismos de secuencia incluyen (1) sustitución de una adenina con un nucleótido

ES 2 312 780 T3

guanina en la posición 330 en una rata E3 cuando se compara con una DA (DA/E3; A330G) que resulta en reemplazo de un residuo metionina con un residuo valina en la posición 106 (Met106Val); (2) sustitución de una timina con un nucleótido citosina en la posición 472 en una rata E3 (DA/E3; T472C) que resulta en el reemplazo de un residuo metionina con un residuo treonina en la posición 153 (Met153Thr); y (3) sustitución de una adenina con una citosina en el nucleótido 1161, una sustitución sinónima que no conduce a una alteración de aminoácido. La secuencia del cADN p47phox de la rata DA es idéntica a la secuencia publicada del p47phox (AY029167) de rata Sprague-Dawley.

Una comparación de la secuencia cADN de DA GTF2i con la secuencia E3 GTF2i revela que la secuencia de E3 tiene una sustitución de nucleótido en la posición 2992. El nucleótido timina en la posición 2992 en la secuencia DA se sustituye con una nucleótido citosina en la secuencia E3 (DA/E3; T2992C). Esta sustitución ocurre en una región no traducida y así no afecta la secuencia de proteína GTF2i.

Comparaciones similares de los genes Cyln2 y GTF2irdl de ratas DA y E3 revela SNPs en el nucleótido 4206 (DA/E3: G4206A) en el gen Cyln2 y en el nucleótido 2823 (DA/E3: G2823C) en el gen GTF2irdl.

Ejemplo 8

Prevalencia del polimorfismo p47phox en ratas de cría y silvestres

La secuencia de los genes p47phox en otras cepas de rata de crías y en ratas silvestres se analizan para la presencia de tres polimorfismos en el alelo p47phox de E3 (Tabla 2). Los altos grados de los polimorfismos en las ratas de cría así compuesto también en las ratas silvestres se detectan. Esto sugiere que estos polimorfismos no resultan de la domesticación o de mutaciones generadas en ratas de cría en laboratorio. De hecho, los alelos de DA y E3 ocurren en igual frecuencia lo que indica que estos alelos se mantiene por selección natural.

TABLA 2

Polimorfismos en el gen P47phox identificado en ratas de cría DA/E3 y poblaciones de ratas silvestres

Cepa de rata	SNP 330bp	SNP 472bp	SNP 1161bp	Cepa de rata	SNP 330bp	SNP 472bp	SNP 1161b
DA	DA	DA	DA	SPRD-Cu3	DA	E3	DA
E3	E3	E3	E3	WAG-mu	E3	E3	DA
ACI	E3	E3	E3	WC	E3	E3	DA
BDE	E3	E3	DA	WF	DA	DA	DA
BDII	E3	E3	DA	WKY	DA	DA	DA
BDIX	E3	E3	DA	KL-1	E3	E3	DA/E3
BDV	DA	DA	DA	KL-2	E3	DA/E3	DA/E3
BH	DA	E3	DA	KL-3	DA	DA	DA
BN	DA	E3	DA	KL-4	DA	DA	DA
BS	DA	E3	DA	KL-5		E3	
COP	E3	E3	E3	KL-6	DA/E3	DA/E3	DA
DA-mu	DA	DA	DA	KL-7	DA/E3	DA	DA
DXEA	E3	E3	E3	KL-8	DA/E3	DA	DA
DXEB	DA	DA	DA	KL-9	E3	DA	DA
DXEC	DA	DA	DA	KL-10	DA	DA	DA
DXER	DA	E3	DA	KL-11	E3	DA	E3
F344	DA	DA	DA	KL-12	DA	E3	
GK	DA	DA	DA	KL-13	DA/E3	DA/E3	DA

ES 2 312 780 T3

Cepa de rata	SNP 330bp	SNP 472bp	SNP 1161bp	Cepa de rata	SNP 330bp	SNP 472bp	SNP 1161b
LE	DA	DA	DA	KL-14	E3	DA	DA
LEW	DA	DA	DA	KL-15	E3	DA	DA
Lew (BM)	E3	E3	E3	KL-16	E3	DA	DA/E3
Lewis.1F	DA	DA	DA	KL-17	E3	DA	DA/E3
LOU7C	E3	E3	E3	KL-18	E3	DA	DA
LXB10	DA	DA	DA	JH-1	DA/E3	DA	DA/E3
LXB17L	DA	DA	DA	JH-2	DA	DA/E3	DA
LXB17N	DA	DA	DA	JH-3	DA	E3	DA
LXB19	DA	E3	DA	JH-4	DA	E3	DA
LXB21	DA	DA	DA	Ax-1	E3	DA	E3
LXB22	DA	DA	DA				
LXB24	DA	E3	DA				
LXB26	DA	E3	DA				
LXB27	DA	E3	DA				
LXB3	DA	E3	DA				
LXB30	DA	E3	DA				
LXB8	DA	DA	DA				
MNS	DA	E3	DA				
MWF	E3	E3	DA				
NAR	E3	E3	DA				
NEDH	DA	DA	DA				
NZNU	E3	E3	E3				
OM	DA	DA	DA				
PVG	E3	E3	E3				
RNU-rnu	E3	E3	E3				
SHR	E3	E3	E3				
SPRD	DA	DA/E3	DA				

Un alotipo común presente en ratas BN incluye el polimorfismo DA en el nucleótido 330 y el polimorfismo E3 en la posición de nucleótido 472. Los cruces previamente publicados entre ratas DA y BN exhiben afecciones de enfermedad similares a esclerosis múltiple (ver Dahlman *et al.* (1999) J Immunol 162: 2581-8) o artritis (ver Griffiths *et al.* (2000) Arthritis Rheum 43: 1278-89) revela un lugar con ubicación idéntica como Pia4 lo que sugiere que la protección de la enfermedad se asocia con treonina en el aminoácido 153. En razón a que la treonina es un sitio de fosforilación potencial, y en razón a que la función del complejo NADPH humano se regula altamente a través de la fosforilación del p47phox, es probable que la actividad del P47phox y por lo tanto la actividad de la oxidasa NADPH se afecta por el estado de fosforilación de este residuo. (ver Faust *et al.* (1995) J Clin Invest 96: 1499- 505; El Benna *et al.* (1996) J Biol Chem 271: 6374-8; Lal *et al.* (1999) Biochem J 338: 359-66).

Ejemplo 9

Ratas DA y DA.E3chr12-/- Congénicas exhiben niveles de expresión p47phox similares

La expresión del gen p47phox en los tejidos de nodos linfáticos y de bazo de ratas DA y DA. E3chr12 se analiza por hibridación Northern blot. Tres ratas DA y DA. E3chr12-/- se someten a inyección de pristano. Ocho días después de las inyecciones de pristano, 10 µg de ARN total del bazo y del nodo linfático inginal se aíslan. El ARN se separa en un gel azarosa/formaldehído, se transfiere en una membrana de nailon, y se fija por irradiación ultravioleta.

Cultivo de macrófagos y neutrófilos peritoneales

La línea de células de mieloma humano HL60 se cultivan en medio completo de dulbecco con Hepes, 10% de suero de becerro fetal y penicilina - estreptomycin. Las células HL60 se diferencia con los neutrófilos - macrófagos

ES 2 312 780 T3

deis días después de adición de 1.25% de DMSO. Las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos y luego se lavan con PBS dos veces. Luego las células se resuspenden en PBS a una concentración de aproximadamente 107 células/mL.

Análisis de absorción rápida de oxígeno a través del ensayo WST-1

10 μ L de cada uno de los aceites a ser probados se agrega con 9 μ L de WST1 a los pozos de una placa de microtítulo de 96 pozos. Se agrega 106 células/mL (100 μ L de 107 células/mL) se agregan a cada pozo y la carga de color se mide en un espectrofotómetro a 450 nm a 37°C durante 60 minutos (una medición/min).

Ensayo de Citocromo C

15 10 μ L de cada uno de los aceites a ser probados se agrega a los pozos de una placa de microtítulo de 96 pozos. 50 μ L de citocromo C (4 mg/mL) y 5X106 células/pozo (50 μ L de 107 células/mL) se agregan a cada pozo y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 550 nm a 37°C durante 60 minutos (una medición/minuto).

Ensayo de absorción rápida basada en FACS

20 Se preincuban células (2-5 x 105 pozo) durante 10 minutos a 37°C con 1 μ M dihidrorodamina (DHR) 123 en una placa de 96 pozos en volumen total de 200 μ L. 10 μ L de cada uno de los compuestos (por ejemplo, aceites) a ser probados se agregan a los pozos y se incuban 20 minutos adicionalmente a 37°C. la producción de oxidantes reactivos de ensayo como formación de tinte fluorescente de rodamina 123 (RH)de dihidrorodamina 123 (DHR) utilizando citometría de flujo.

Resultados

30 Se prueban moléculas alcano saturadas con ensayo de absorción rápida oxidativa para determinar activadores del complejo NADPH. Los ensayos se prueban en células peritoneales de rata E3 después de recuperación de tioglicolato de los neutrófilos (Figura 9A) y se células HL60 (Figura 9B). La prueba WST-1 indica cambios en la concentración extracelular de las especies de oxígeno reactivo (ROS). Ambos tipos celulares demuestran las mismas tendencias generales. Por ejemplo, en todos los ensayos, el undecano es un activador potente.

35 Los efectos que inducen las artritis de los aceites se examina al inyecta los aceites intradérmicamente en ratas DA. La clasificación muestra que los aceites mas de aproximadamente 14 carbonos de longitud inducen la artritis, mientras que cadenas de carbono más cortas no inducen la artritis (Figuras 10A, 10B, y 10C). Note que $p < 0.05$ para alcanos más cortos que C15 comparado con C19. Todas las estadísticas se evalúan con la prueba t de Student. N=4 para todos los grupos.

Ejemplo 15

Tratamiento de alivio y prevención de la artritis con aceites de activación NADPH

1. Tratamiento y/o prevención de artritis inducida por pristano con undecano in-vivo

45 Los grupos de ratas Da se inyectan intradérmicamente en la base de la cola con 200 μ L de los aceites como se indica adelante:

50 Undecano día -10, Pristano día 0;

Aceite de Oliva DIA-10, Pristano día 0;

Undecano día - 5, Pristano día 0;

55 Undecanol día-5, Pristano día 0;

Aceite de Oliva día -5, Pristano día 0;

Undecano día - 5, Pristano día 0; y

60 Aceite de Olive día 5, Pristano día 0.

65 Las ratas se clasifican cada tercer día partiendo en el día once de acuerdo con el sistema de clasificación extendido en donde cada dedo rojo o hinchado o parte media del pie tiene un punto de clasificación, y un tobillo rojo o hinchado tiene 5 puntos de clasificación, dando un total de 15 puntos/miembro y 60 puntos/rata. Se utiliza aceite de oliva y un decanol como controles.

2. Tratamiento *in-vivo* de artritis inducida por hexadecano con hexadeceno

Se inyectan grupos de ratas DA i. d. en la base de la cola como sigue:

- Hexadecano 200 μ L día 0;
- Hexadeceno 200 μ L día 0;
- Hexadeceno 200 μ L día - 5, Hexadecano 200 μ L día 0;
- Aceite de oliva 200 μ L día -5, Hexadecano 200 μ L día 0;
- Hexadeceno 200 μ L día +5, Hexadecano 200 μ L día 0; y
- Aceite de oliva 200 μ L +5, Hexadecano 200 μ L día 0.

Las ratas se clasifican como se indico anteriormente. Se utiliza aceite de oliva como control.

Resultados

Se examina undecano por su efecto preventivo potencial sobre el desarrollo o la severidad del PIA. Se tratan las ratas con undecano en el día -10, día -5, o día +5, y undecanol en el día -5 (como un control). Todas las ratas se inyectan con pristano en el día 0 (Figura 11A). Hubo una diferencia significativa entre la clasificación aditiva (Figura 11B) y la clasificación máxima (Figure 11 C) para ratas tratadas con undecano en el día -5 y las ratas que se tratan con aceite de oliva en el día -5. También hubo una diferencia significativa para la clasificación aditiva (Figura 11B) y la clasificación máxima (Figure 11C) entre el tratamiento con undecano en el día -5 y el tratamiento con undecanol en el día -5. Note también que las ratas que se tratan con undecano en el día +5 tiene una clasificación ligeramente mayor que las ratas que se tratan con undecano en el día -10 o en el día -5 antes de inyección con pristano.

Se evalúan todas las estadísticas con la prueba t de Student $p < 0.05$ para la diferencia en ambas clasificaciones aditivas y clasificación máxima para undecano en el día -5 y aceite de oliva en el día -5. $p = 0.05$ para la diferencia en la clasificación aditiva $p < 0.05$ para la diferencia en la clasificación máxima entre undecano en el día -5 y undecanol en el día -5. $N = 6$ para todos los grupos, excepto el grupo 4 en donde $N = 12$.

También se desarrolla un experimento similar para evaluar el efecto protector del hexadeceno en la inducción de la artritis mediante hexadecano. Se tratan ratas con el hexadeceno en el día - 5, día +5, o no se tratan con hexadeceno. Todas las ratas se inyectan con hexadecano en el día 0, excepto el grupo 3. Se utiliza aceite de oliva como control. La clasificación de artritis demuestra una diferencia significativa entre las capacidades que inducen a artritis de las dos sustancias (Figuras 12A, 12B y 12C). El Hexadecano induce la artritis mientras que el hexadeceno no. La diferencia en clasificación entre las ratas que se tratan con hexadeceno en el día -5 y en el día +5 y las ratas de control también es significativa. Ninguna de las ratas tratadas con hexadeceno desarrollo artritis.

Los grupos 3 y 4 se inyectan solo con hexadecano o hexadeceno. Se evalúan todas las estadísticas con la prueba t de Student. $p < 0.05$ para la diferencia en ambas clasificaciones aditivas y clasificación máxima para el tratamiento del día -5 y día +5 contra ningún tratamiento (grupo 4). $p < 0.05$ para la diferencia en la clasificación aditiva y clasificación máxima entre hexadecano y hexadeceno. También hay una diferencia entre grupos que se inyectan con hexadeceno y aceite de oliva en el día +5 ($p < 0.01$ en la clasificación aditiva y $p < 0.05$ en la clasificación máxima). $N = 6$ para todos los grupos excepto el grupo 3 y 4 en donde $N = 4$.

Discusión

Cuando se inyectan aceites en la base de las colas de las ratas DA para determinar su capacidad de inducir artritis, los alcanos mayores de aproximadamente 14 carbonos inducen artritis, mientras que los más cortos no. Es interesante notar que una comparación de la actividad de los aceites en los estudios de absorción rápida de oxígeno y los estudios de inducción de artritis indican tres mecanismos posibles para la participación de los aceites en la inducción y/o el tratamiento de la artritis. Por ejemplo, en los estudios de absorción de oxígeno, el undecano activa el complejo NADPH, pero no induce a artritis en los estudios de artritis de inyección de cola, mientras que el hexadecano no solo activa el complejo sino que también induce a artritis. Una comparación de los dos experimentos demuestra que el hexa-, hepta-, y octa-decanos activan el complejo NADPH de acuerdo con el ensayo WST-1 y también induce a artritis. El pentadecano (15C), de otra parte, no activa el complejo NADPH, pero induce a artritis, lo que sugiere un tercer mecanismo para la participación en la inducción de la enfermedad.

También se ha visto una relación similar con el hexadecano y el hexadeceno, y pristano y fitol, en donde el hexadecano y el pristano inducen artritis, mientras en hexadeceno y el fitol no (Lorenzen (1999) Scand. J. Immunol. 49: 45-50). Todas las cuatro sustancias activan el complejo NADPH. La diferencia entre hexadecano y hexadeceno es un enlace de carbonos sencillo - carbono doble en el hexadeceno, mientras el pristano y el fitol difieren por un grupo ácido. Mientras que no se desea estar unido por la teoría, es posible que una polaridad incrementada facilite el metabolismo del hexadeceno y el fitol y por lo tanto evita que induzcan a artritis. Las moléculas con menor polaridad

no se pueden metabolizar tan fácilmente, y pueden permanecer mayor tiempo en los tejidos, induciendo una respuesta inmune.

Investigamos las capacidades preventivas del hexadeceno y undecano. Ninguna de las ratas tratadas con hexadeceno muestra algún síntoma de artritis si ellas se inyectan con hexadeceno en el día -5 o día +5. Adicionalmente, estos experimentos verifican que el hexadecano induce artritis, mientras que el hexadeceno no. El pre-tratamiento con undecano puede ser más protector si lo hace en un mayor punto de tiempo antes de la inducción de la artritis con pristano. Por ejemplo, el tratamiento con undecano en el día +5 no muestra un efecto preventivo como en el día -10 o en el día -5.

Ejemplo 16

Distribución de Aceites Alcano In vivo

[1-14C]-Hexadecano y ácido [1-14C]-oleico se compran de Amersham. Los aceites se inyectan intradérmicamente en la base de la cola en 18 ratas DA (200 μ L). En el día 10, los órganos (nodos linfáticos, bazo, hígado y riñón) de las tres ratas de cada grupo se recolectan. Los órganos se pesan y homogenizan en un volumen total de 2 mL PBS y se congelan. El mismo procedimiento es seguido en el día 20 y en el día 30. 1 mL de las muestra homogenizadas se agregan luego a 10 mL de Ready Safe (Beckman) y se cuentan en un contador beta. La distribución de hexadecano etiquetado radioactivo para los nodos linfáticos también se inspecciona en puntos de tiempo anteriores (día 3, día 6, día 10, y día 13).

Resultados

La distribución del hexadecano *in vivo* se examina al inyectar hexadecano etiquetado radiactivamente y punto de punto en la base de la cola de ratas DA. El ácido oleico etiquetado radiactivamente se administra en la misma forma. La clasificación de las ratas muestra que solo las ratas inyectadas con hexadecano tienen artritis (Figura 13). La artritis es aguda y tiene un involucramiento simétrico de las patas delantera y trasera. Los análisis de diferentes órganos recolectados (LN, bazo, riñón e hígado) en el contador β muestran que los aceites se acumulan exclusivamente en los nodos linfáticos en todos los puntos de tiempo medidos (Figura 14). El Hexadecano parece ser distribuido a los nodos linfáticos en un mayor grado que el ácido oleico. La distribución de los aceites a los nodos linfáticos parece reducir con el tiempo sin incremento en los otros órganos analizados.

La distribución del hexadecano a los nodos linfáticos en puntos de tiempo anteriores también se mide como se describe. Se observa un incremento en la acumulación del hexadecano en los nodos linfáticos hasta el día 10.

Se ha investigado previamente la distribución del hexadecano etiquetado radiactivamente, que muestra el 14C hexadecano etiquetado que se disemina predominantemente a los nodos linfáticos (Kleinau *et al.*, (1995). Int. J. Immunopharmac., 17 (5): 393-401.).

Los experimento indican que el aceite de hexadecano ejerce un efecto pro-artrítico dentro de los nodos linfáticos. La inyección de hexadecano etiquetado radiactivamente y ácido oleico radió etiquetado sugiera que el ácido oleico no induce a la artritis debido a que este no se distribuye a los nodos linfáticos a tan alto grado como el hexadecano. Adicionalmente, el hexadecano se acumula lentamente en los nodos linfáticos con una máxima en el día 10, que se correlaciona con el inicio normal de la enfermedad. Después del día 10, la concentración del aceite de hexadecano se reduce lentamente (Figura 15).

Ejemplo 17

Tratamiento de Encéfalomielitis Alérgica Experimental (EAE) in vivo

Grupos de rata DA se inyectan en la base de la cola con 200 μ L de fitol en el día -10, día -5, y día +5, se utiliza aceite de oliva como un control. En el día 0, se tratan todas las ratas (inmunizan) con 200 μ L de SCH (homogenato de médula espinal DA, para inducir EAE) i. d. en la base de la cola. Las ratas se clasifican luego de acuerdo con la siguiente escala durante 40 días:

0=Normal

1=Debilidad en la cola

2=Parálisis de la cola

3=Parálisis de cola y cojera leve

4=Parálisis de cola y cojera severa

ES 2 312 780 T3

5=Parálisis de cola y parálisis de un miembro

6=Parálisis de cola y parálisis de un par de miembros

5 7=Tetra-paresia

8=Pre-mórbido o muerte.

10 El EAE empieza aparecer al rededor de día 6. Los resultados muestran una diferencia significativa en la clasificación aditivo (Figura 16A) y clasificación máxima (Figura 16B) entre las ratas tratadas con fitol y las ratas de control en el día -10 y en el día +5 ($p<0.05$).

15 Se evalúan todas las estadísticas con la prueba T de Students $p<0.05$ para la diferencia en la clasificación máxima entre el tratamiento con fitol y el tratamiento con aceite de oliva en el día -10 y en el día +5. Note que $N=6$ para todos los grupos.

20 El EAE y PIA, el SCH para inducir EAE y el pristano para inducir PIA se inyectan intradérmicamente en la base de la cola. El inicio de la enfermedad ocurre de manera general en unas pocas semanas. Los activadores potenciales del complejo NADPH pueden alterar la proliferación de las células T autoactivas. Y reducen la incidencia, tasa de inicio, y severidad de las enfermedades.

Ejemplo 18

25 *Efecto de Ruta de Administración de Fitol en el Tratamiento del PIA*

Se tratan grupos de ratas DA con fitol de acuerdo con uno de los siguiente regímenes de tratamiento en el día -5 y en el día +5. Se inyectan todas las ratas con pristano (200 μ L) en el día 0 intradérmicamente en la base de la cola. Se administra fitol a los grupos de ratas como sigue:

30

25 μ L de fitol intranasalmente (i. n.);

200 μ L de fitol intraperitonealmente (i. p.);

35

200 μ L de fitol intradérmicamente en la base de la cola (i. d.); y

1 μ L de fitol per os (p. o.).

40 Las ratas se clasifican desde el día 9 utilizando el sistema de clasificación extendido (como se discutió previamente). El experimento demuestra un alivio y un efecto preventivo de administración i. d. las rutas de administración intraperitoneal (i. p.) e intranasal (i. n.) también demuestran efecto de alivio y prevención (ver Figuras 17A, 17B y 17C).

45 Note que el grupo intranasal se sesga por una rata que exhibe artritis severa, mientras que el otro grupo de ratas en el grupo son protegidas.

Ejemplo 19

50 *Artritis Inducida por Colágeno en Ratones Ncfl Deficientes*

Animales

55 Se compran ratones (B6. Cg-m +/+ Lepr (db), anteriormente conocidos como aC57BL/6J-m +/+ Lepr^{db}) deficientes para Ncfl debido a una mutación de punto en el sitio de división de exón 8 (Huang *et al.*, (2000) J. Leukoc. Biol. 67: 210-215.) Del laboratorio Jackson (Maine, USA). Los ratones se retrocruzan con B 10. Q (originalmente del Profesor Jan Klein, Tiibingen, Alemania) durante dos generaciones para producir el alotipo Q en MHC y perder el defecto del receptor leptino (lepr). B10. Q Ncfl +/- se entrecruza para experimentos de artritis inducida por colágeno (CIA) con el fin de obtener camadas de animales de control. Todos los experimentos de artritis se aprueban por el comité ética local (Malmö/Lund, Suecia) licencia M7-01.

60

Inducción y Evaluación de Artritis

65 Se induce artritis en todos los ratones en la edad de 9-15 semanas mediante inyección intradérmica en la base de la cola de de ratas CII 150 μ g (colágeno II) emulsificadas en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco, Detroit, MI) en el día 0 en el día 35, a las ratones se le da una inyección de refuerzo en la misma ubicación de 50 μ g a ratas CII en adyuvante incompleto de Freund y (IFA). El desarrollo de la artritis se monitorea en todos los cuatro miembros utilizando un sistema de clasificación microscópico. En resumen, se da un punto para cada dedo rojo o hinchado. Un

punto para cada parte media del pie hinchado, dedo, o novillo y 5 puntos para un tobillo hinchado, produciendo una clasificación máxima por miembro de 15 y 60 en total. Se examinan los ratones de 1 a 4 veces por semanas durante 2 meses después de la inmunización. En el día 40, se obtiene suero a través de sangrado de la cola y se mantiene a -20°C hasta que se ensaya.

Determinación de Niveles de Suero de COMP

La concentración de proteína matriz oligomérica de cartílago en suero (COMP) se determina utilizando un ensayo inmunosorbente de inhibición ligado a enzimas (ELISA). El COMP de ratas se utiliza para cubrir las placas de microtítulo y para preparar la curva estándar para placa. El COMP de plasma se detecta al utilizar un antisuero policlonal que surge contra el COMP (suministrado generosamente por el profesor Dick Heinegard) como se captura el anticuerpo.

Respuesta de Anticuerpo

Anticuerpos contra cartílago de rata en plasma se analizan con ELISA en placas de 96 pozo (Costar, Cambridge, MA), se cubren durante la noche a 4°C con 50, μg /pozo de PBS que contiene 10, $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno II de rata. Todos los lavados se desarrollan utilizando solución salina tris-amortiguada (NaCl 1.3M, Tris 0.1M, pH 7.4) que contiene 0.1% Tween20 (Tris/Tween). El plasma se diluye en PBS/0.1% Tween y se analiza por duplicado. Las cantidades de anticuerpos IgG unidos se estima después de incubación con un IgG antiraton de burro acoplado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, Westgrove, PA) y ABTS como sustrato, seguido por detección por un SpectraMax (Molecular Devices) la cantidad relativa de anticuerpos en el plasma se determina por comparación con un control positivo de un anticógeno II estándar.

Resultados

Con el fin de determinar el papel de los defectos o deficiencias del Ncfl funcional y/o el complejo oxidasa NADPH en la artritis, se investiga el desarrollo de CIA (artritis inducida por colágeno) en la deficiencia de Ncfl de ratones B10.Q. Los ratones B10.Q tipo silvestre desarrollan normalmente una artritis leve/media-severa, después del inicio de la inmunización al aumentar la presión (Svensson *et al.* (1998) Clin. Exp. Immunol. 111: 521-526). Los resultados indican un inicio temprano (Figure 19) y se incrementa la severidad de la artritis ($P < 0.001$) (Figuras 18A, 18B, 18C) en los ratones con deficiencia de Ncfl como se compara para ratones B10.Q. Los ratones heterocigotos por el defecto Ncfl muestran una artritis leve con inicio tardío que los ratones deficientes homocigotos ($P < 0.005$).

La cuantificación de los niveles de suero de COMP (Proteína de Matriz Oligomérica de Cartílago) se observa como una medición de la erosión del cartílago de las articulaciones periféricas. EL suero COMP se eleva altamente ($P < 0.0001$) en el Ncfl -/- ratones como se compara para Ncfl +/- y controles tipo silvestre (Figura 20). Adicionalmente, en ratones con deficiencia de Ncfl hay una respuesta de anticuerpo fuerte contra el colágeno II en el día 40 después de la primera inmunización (Figura 21).

Ejemplo 20

Distribución en los nodos linfáticos de 14C-hexadecano después de la inyección de Hexadeceno en el día -5

Se desarrolla un experimento para determinar los aceites que compiten por el espacio disponible en los nodos linfáticos y si tal una competición es la razón para los efectos preventivos de pretratamiento con hexadeceno y undecano. En el día -5, las ratas DA se inyectan con una de las siguientes cantidades de hexadeceno: 0 μL , 50 μL , 100 μL , o 200 μL . En el día 0, todas las ratas se inyectan intradérmicamente con 14C-hexadecano en la base del tallo. En el día 10, las ratas se sacrifican y los nodos linfáticos se recolectan y se colocan en PBS, se homogenizan, y se enfrían. Luego se transfiere 1 mL del homogenato para Ready Safe (Beckman) y se analiza en un contador β (Beckman).

La cantidad de hexadecano que induce artritis en nodos linfáticos de drenaje no se afecta por grandes cantidades de hexadeceno protector. Estos resultados indican que no hay competición por el espacio en los nodos linfáticos de drenaje que es de importancia para el efecto protector del aceite.

Ejemplo 21

CIA en ratas tratadas con fitol

Las ratas DA se tratan de acuerdo con una de las siguientes alternativas:

200 μL fitol intradérmicamente en la base del tallo en el día -10

200 μL fitol intradérmicamente en la base del tallo en el día -5

ES 2 312 780 T3

200 μ L fitol intraperitoneal en el día -5 y el día +5

control no tratado

5 El CIA se induce en todos los animales en el día 0 al inyectar 150 PL del colágeno II disuelto en 75 PL 0.1 M de ácido acético y se emulsifica en 75 PL de IFA. Las ratas se clasifican a partir del día 10 utilizando el sistema de clasificación extendido (ver anterior).

10 El tratamiento intraperitoneal e intradérmico con fitol previene el desarrollo de la artritis en el modelo de ratas CIA (Figura 22).

Ejemplo 22

15 *Tratamiento de PIA activo con fitol o undecano*

Los grupos de Ratas DA se inyectan con pristano en el día 0. El pristano (150 PL) se inyecta intradérmicamente en la base del tallo. Las ratas se clasifican a partir del día 9 utilizando el sistema de clasificación extendido (ver anterior). Luego, las ratas se tratan en el día 21 y en el día 26 con una de las siguientes alternativas:

20

200 μ L fitol intraperitoneal

200 μ L fitol intradérmicamente en la base del tallo

25

200 μ L undecano intraperitoneal

200 μ L undecano intradérmicamente en la base del tallo

control no tratado

30

Todos los tratamientos con fitol y undecano son efectivos contra la artritis activa en el modelo de rata PIA (Figuras 23A, 23B).

Otras modalidades

35

Se debe entender que mientras la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de esta, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar una susceptibilidad de un mamífero a desarrollar una afección autoinmune o para diagnosticar una afección autoinmune, dicha afección autoinmune se ha seleccionado de artritis y esclerosis múltiple, dicho método comprende determinar si o no dicho mamífero comprende una variante genética del gen que codifica la oxidasa NADPH, en donde la presencia de dicha variante genética indica que dicho mamífero tiene o es susceptible a desarrollar dicha afección autoinmune.
2. El método de la reivindicación 1 en donde dicho método es para determinar una susceptibilidad de un mamífero a desarrollar una afección autoinmune.
3. El método de la reivindicación 1 en donde dicho método es para diagnosticar una afección autoinmune acompañada por La deficiencia de oxidasa NADPH en un mamífero que tiene una afección autoinmune.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha variante genética codifica un polipéptido mutante.
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido mutante es un polipéptido a GP91 PHOX, Polipéptido P22PHOX, Polipéptido P4OPHOX, Polipéptido P47PHOX, o Polipéptido P67PHOX.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho polipéptido mutante es un Polipéptido P47PHOX.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho mamífero es un humano, y en donde dicho polipéptido mutante P47PHOX comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6 con por lo menos dos sustituciones de aminoácido.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha variante genética comprende una mutación en una secuencia reguladora de dicho gen.
9. El uso de fitol, undecano, o hexadeceno en la fabricación de un medicamento para tratar una afección autoinmune en un mamífero, dicha afección autoinmune se ha seleccionado de artritis y esclerosis múltiple.
10. Un método para identificar un agente que mejora la actividad oxidasa NADPH en una célula, en donde dicha célula es de un animal no humano susceptible a la inducción de artritis, dicho método comprende:
 - (a) poner en contacto dicha célula con un activador oxidasa NADPH y un agente de ensayo para formar un ensayo celular,
 - (b) determinar el nivel de la actividad oxidasa NADPH en dicho ensayo celular,
 - (c) determinar si o no dicho nivel es mayor que un nivel de control de la actividad oxidasa NADPH, en donde dicho nivel de control es la cantidad de la actividad oxidasa NADPH en un control celular tratado con dicho activador en la ausencia de dicho agente de ensayo, e
 - (d) identificar dicho agente como mejorador de la actividad oxidasa NADPH cuando dicho nivel es mayor que dicho nivel de control.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicha célula es una célula de una rata DA.
12. El método de la reivindicación 10, en donde dicha célula es un linfocito.
13. El método de la reivindicación 10, en donde dicho animal no humano es susceptible a artritis inducida por pristano, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por adyuvante, artritis inducida por aceite, artritis inducida por hexadecano, o artritis inducida por avridina.
14. El método de la reivindicación 10, en donde dicho activador oxidasa NADPH es norfloxacin, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido araquidónico, acetato miristato forbol, lisofosfatidilcolina, fM LP, pristano, fitol, octano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, galectina 1, o galectina 3.
15. El método de la reivindicación 10, en donde dicho nivel de la actividad oxidasa NADPH se determina al medir el superóxido.
16. El método de la reivindicación 10, en donde dicho nivel de la actividad oxidasa NADPH se determina al medir las especies de oxígeno reactivas.
17. El método de la reivindicación 10, en donde dicho nivel de la actividad oxidasa NADPH se determina con un ensayo de citocromo C o ensayo WST-1.

ES 2 312 780 T3

18. Un método *in vitro* para identificar un agente que reduce la activación de célula T, dicho método comprende:

(a) determinar si o no un agente de ensayo incrementa la actividad oxidasa NADPH; y

(b) clasificar dicho agente de ensayo como un agente que reduce la activación de célula T cuando dicho agente de ensayo incrementa la actividad oxidasa NADPH.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

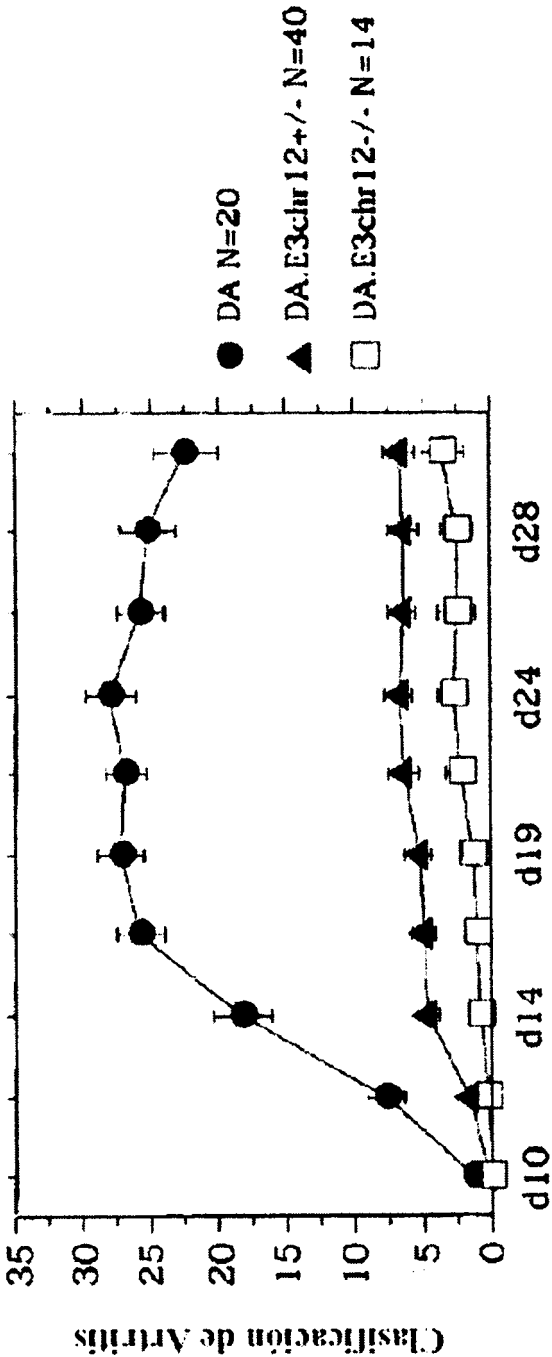
55

60

65

Figura 1

Clasificación clínica de ratas congénicas PIA4



Incidencia d31: DA (100%), DA.E3+/- (58%) y DA.E3-/- (36%)

Figura 2

Mapa físico de la región Pia4

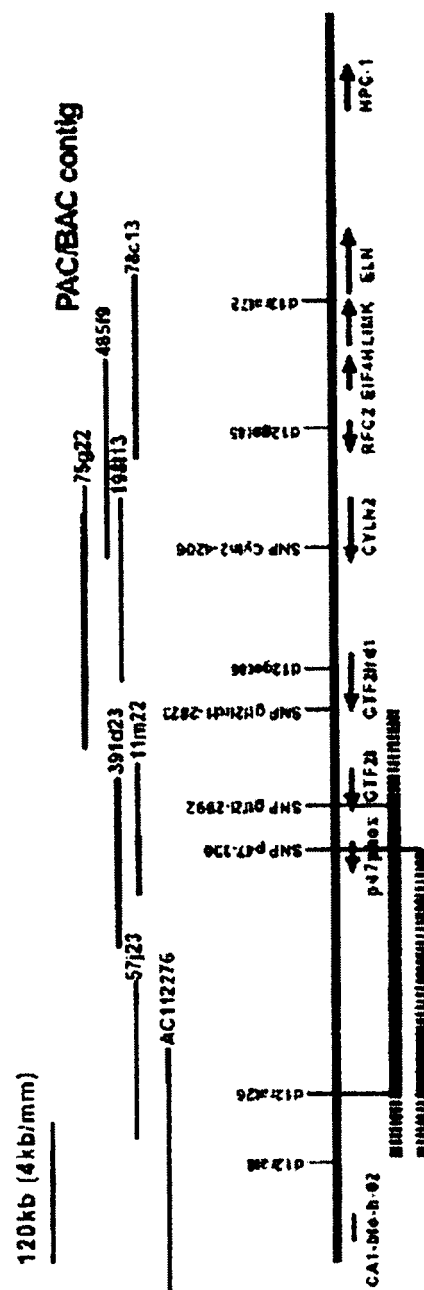


Figura 3

Secuencia de cADN p47phox

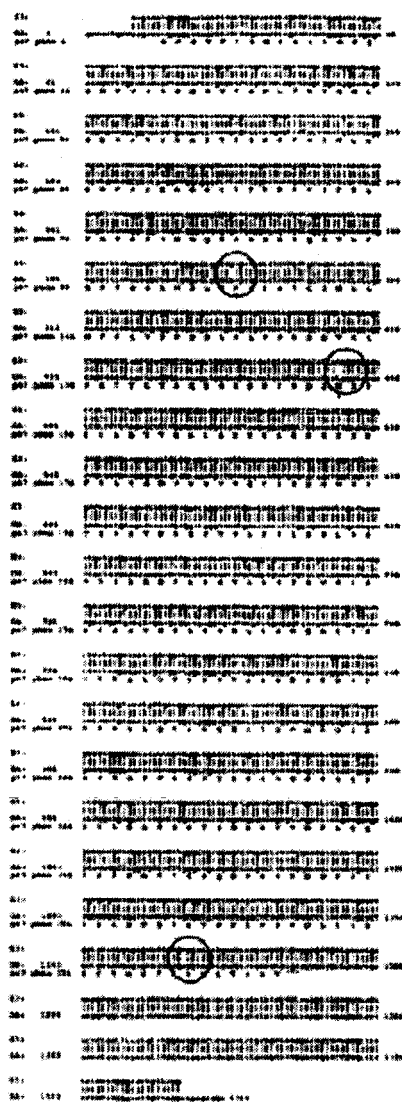


Figura 4A

COMP en ratas DA.-E3c12

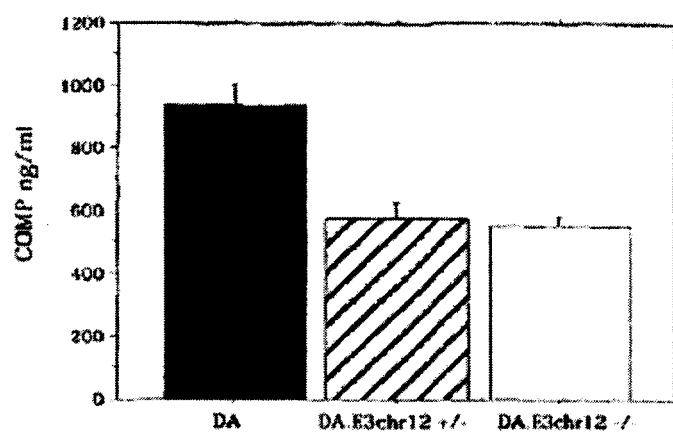


Figura 4B

AGP en ratas DA.-E3c12

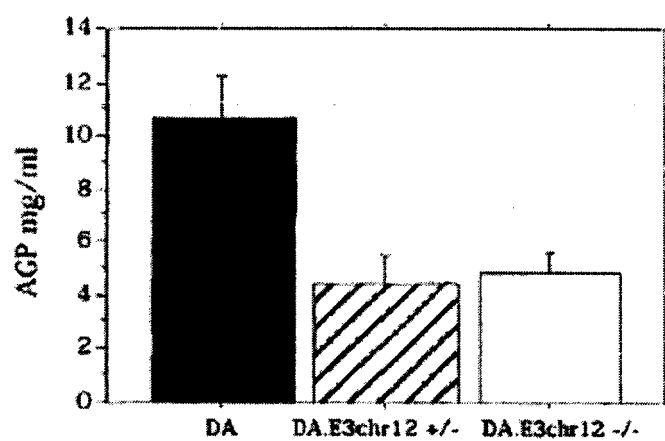


Figura 5A

DA

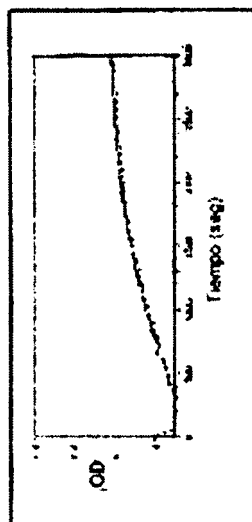


Figura 5B

E3

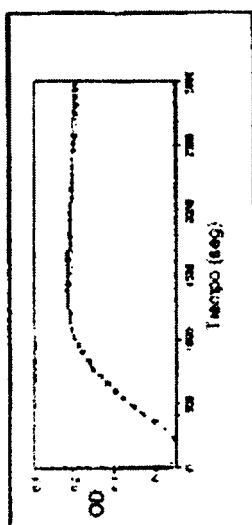


Figura 5C

DA.E3c12 +/-

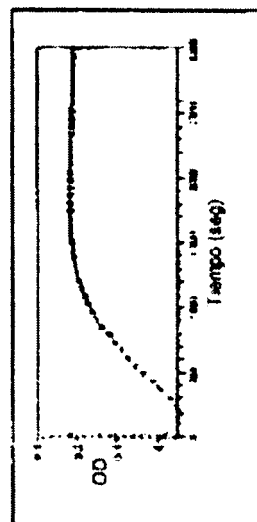


Figura 5D

DA.E3c12 -/-

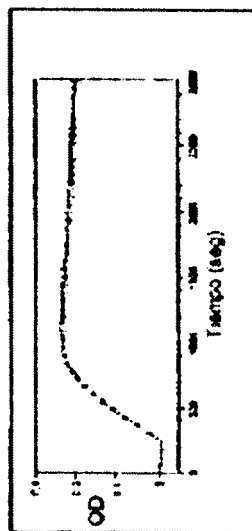


Figura 6

Ratas inyectadas con Pristane con DPI inhibidor NADPH inyectado i.p

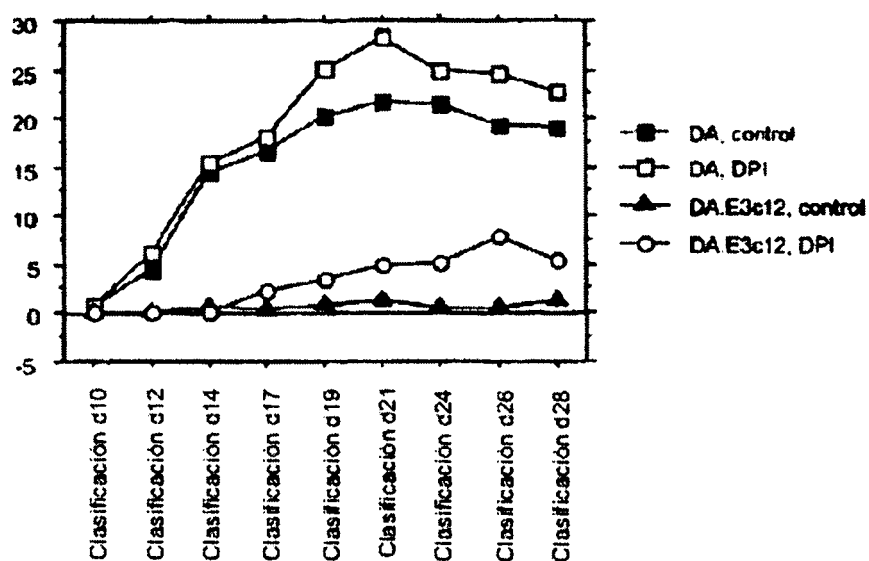


Figura 7

Clasificación de artritis

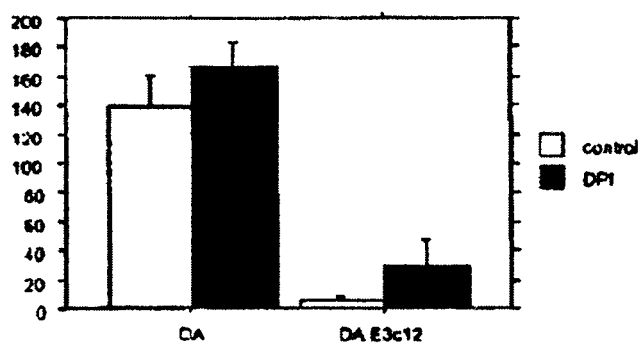


Figura 8

Transferencia de Células T activas pristane/ConA

Clasificación clínica día 15 después de transferencia de células

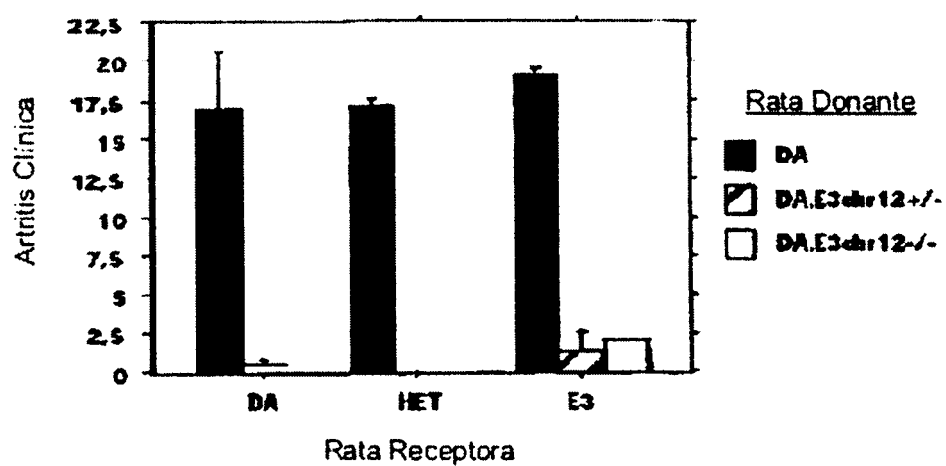


Figura 9A

Activación de la absorción rápida oxidada por alcanos in vitro (Células de rata E3)

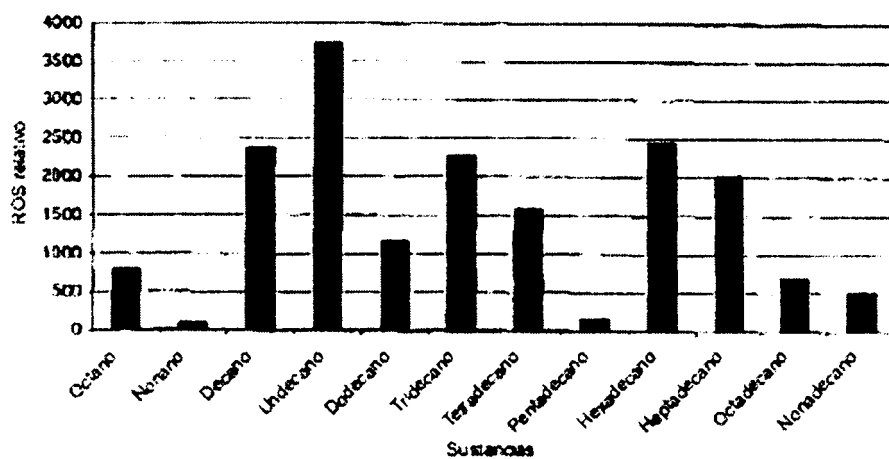


Figura 9B

Activación de la absorción rápida oxidada por alcanos in vitro (Células H160)

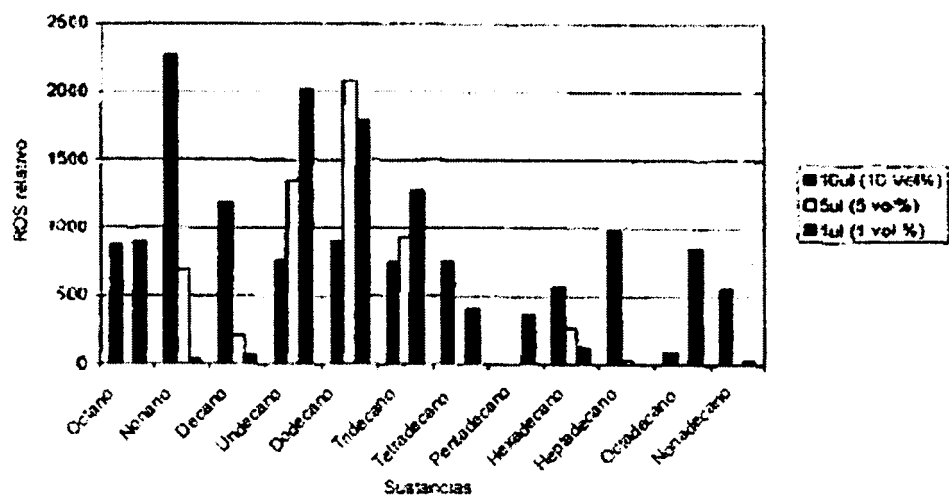


Figura 10A

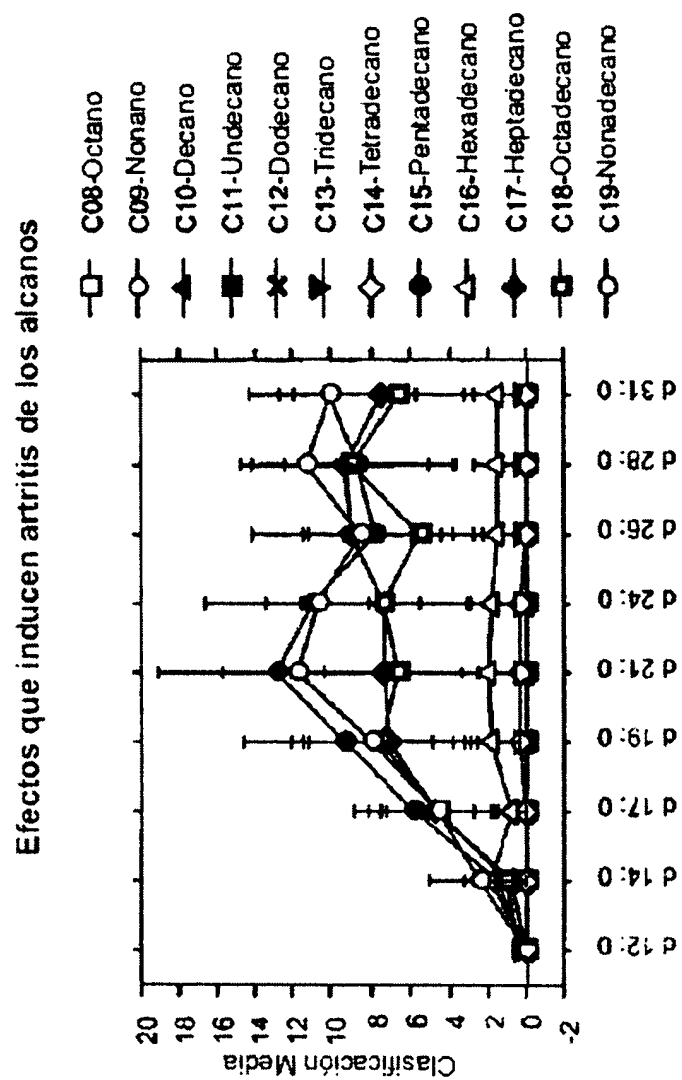


Figura 10C

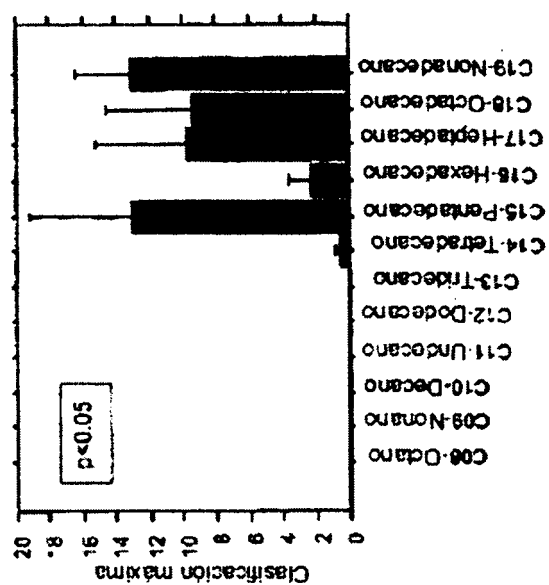


Figura 10B

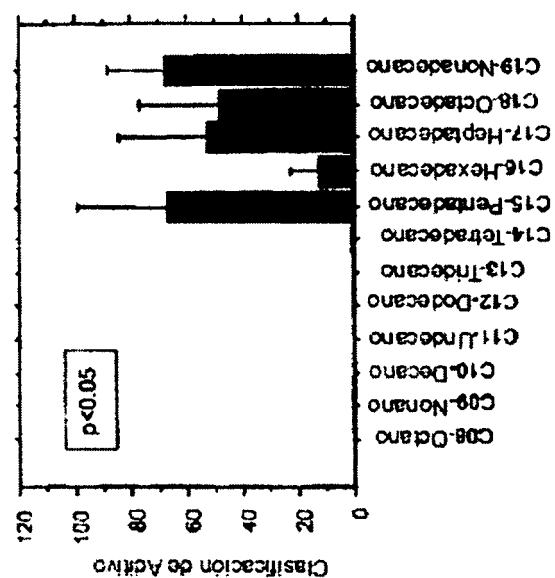


Figura 11A

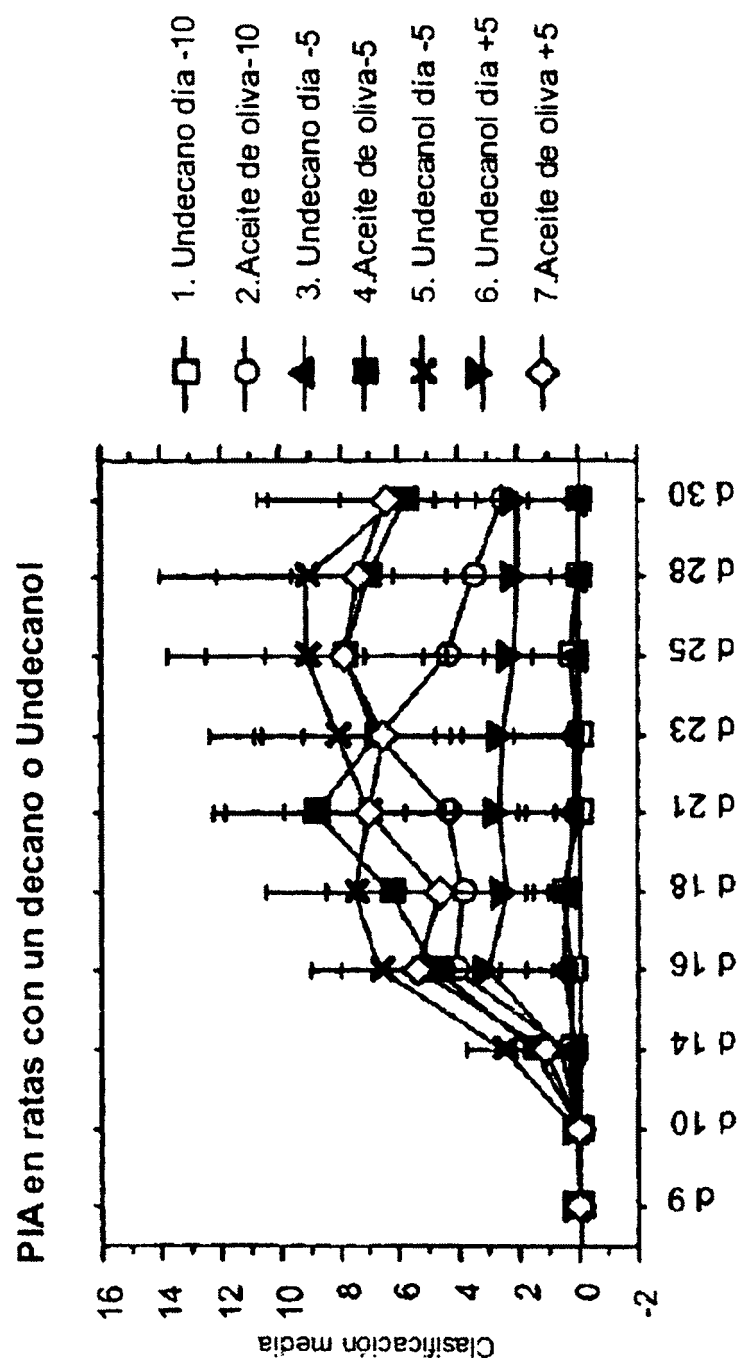


Figura 11B

PIA en ratas con un decano
o Undecanol

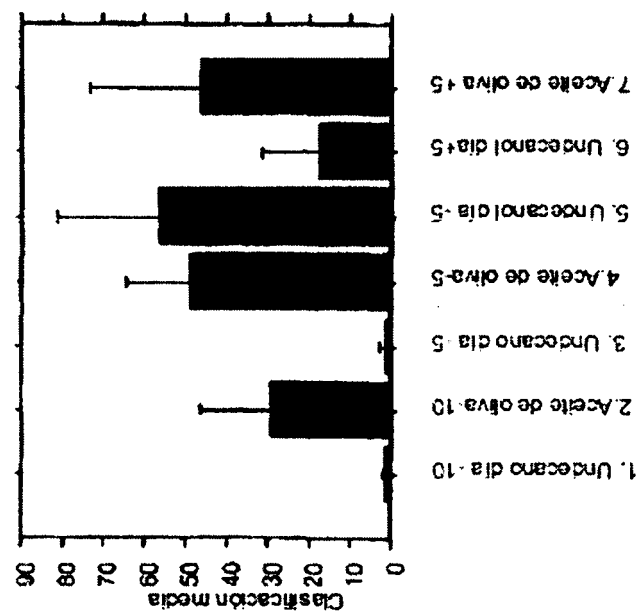


Figura 11C

PIA en ratas con un decano
o Undecanol

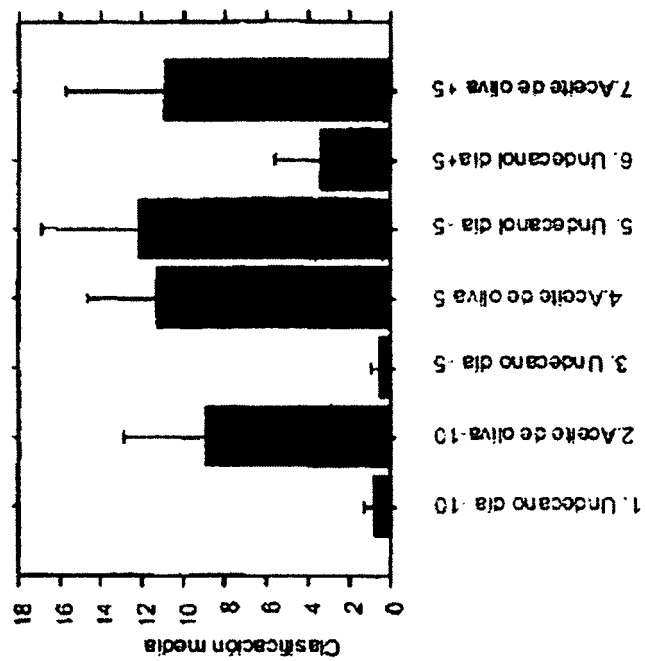


Figura 12A

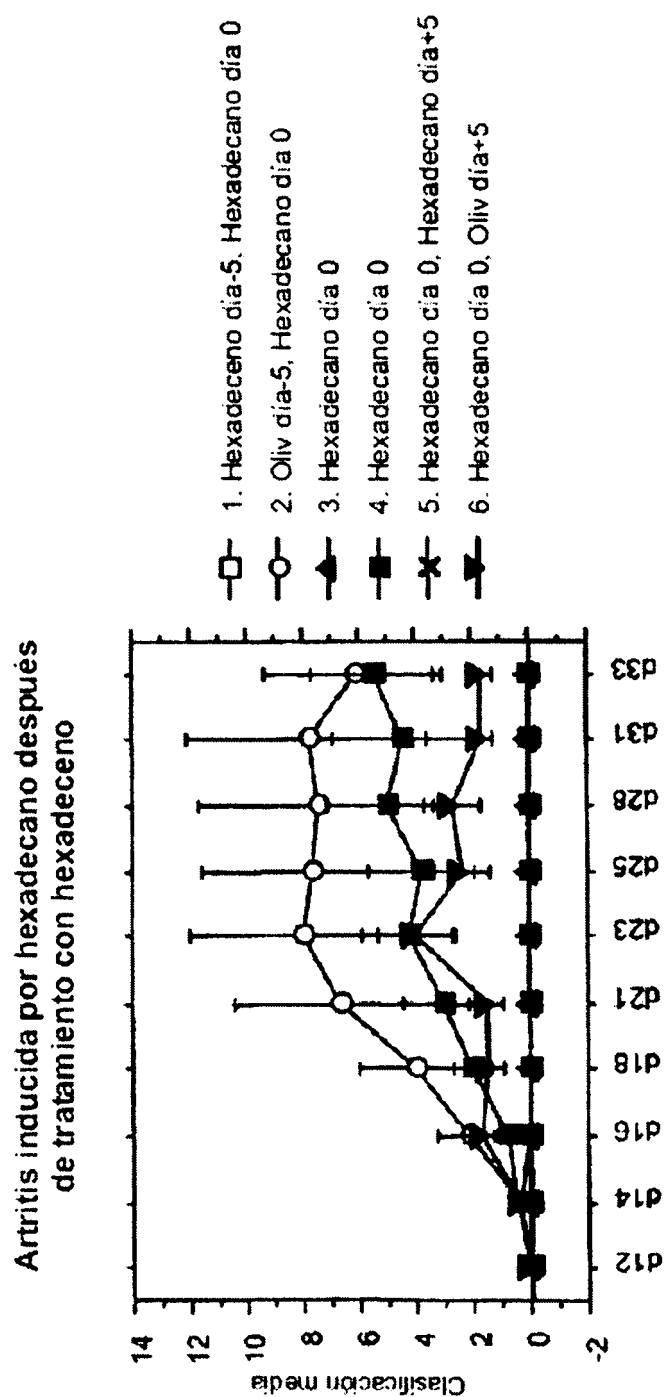


Figura 12B

Artritis inducida por hexadecano después de tratamiento con hexadeceno

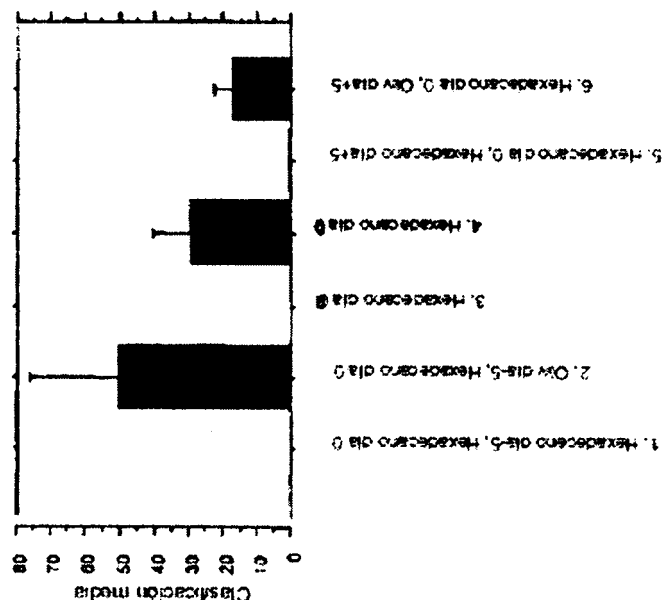


Figura 12C

Artritis inducida por hexadecano después de tratamiento con hexadeceno

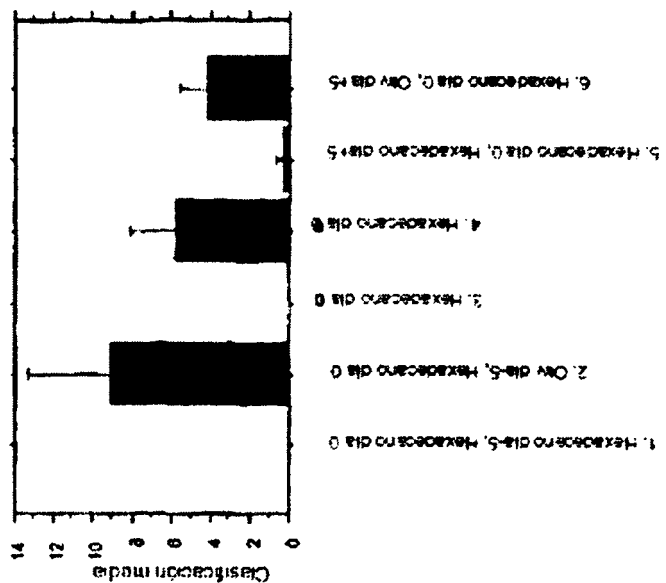


Figura 13

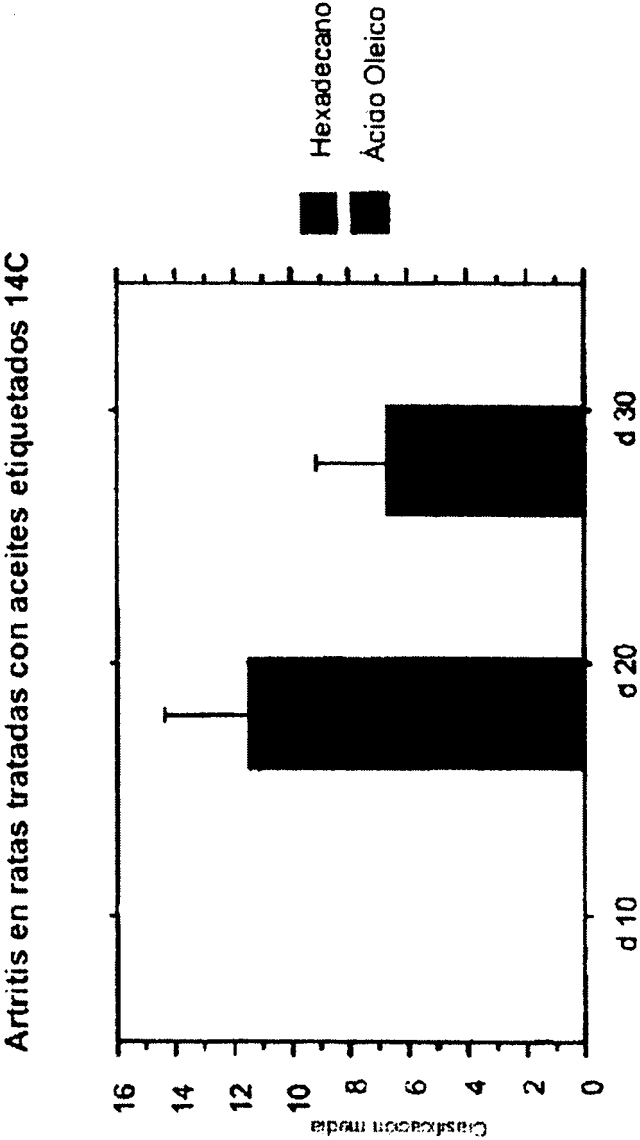


Figura 14

Distribución de tejido de aceites etiquetados 14C

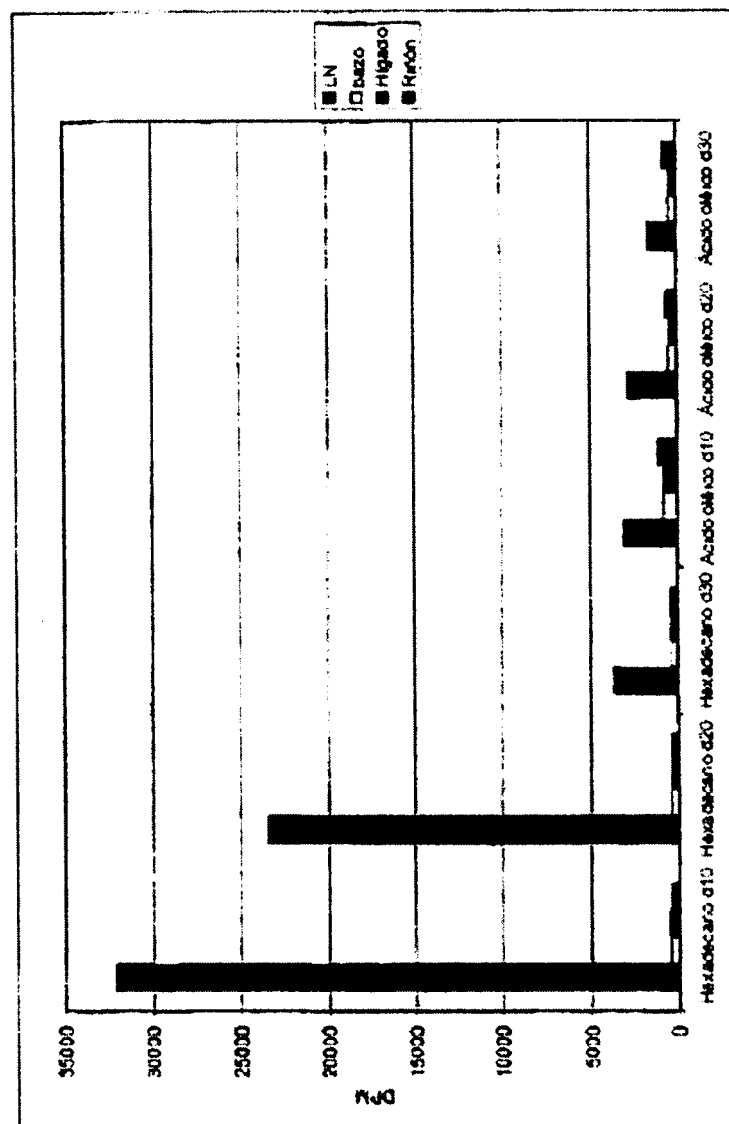


Figura 15

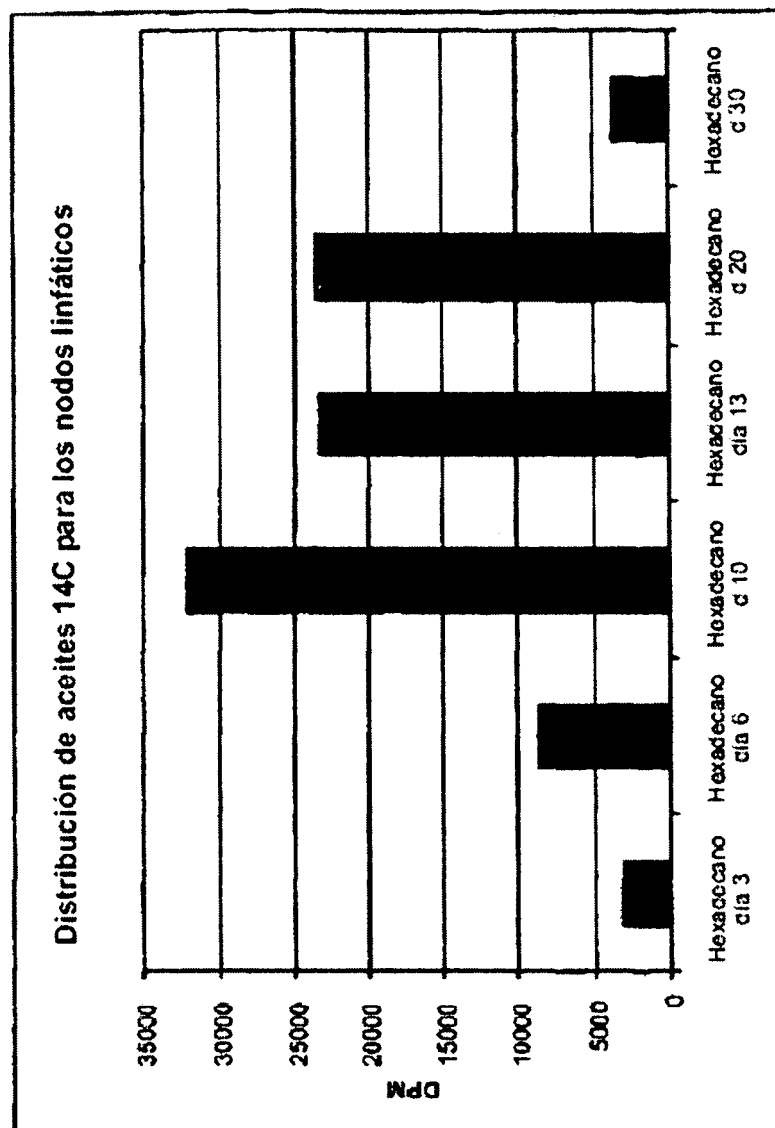


Figura 16B

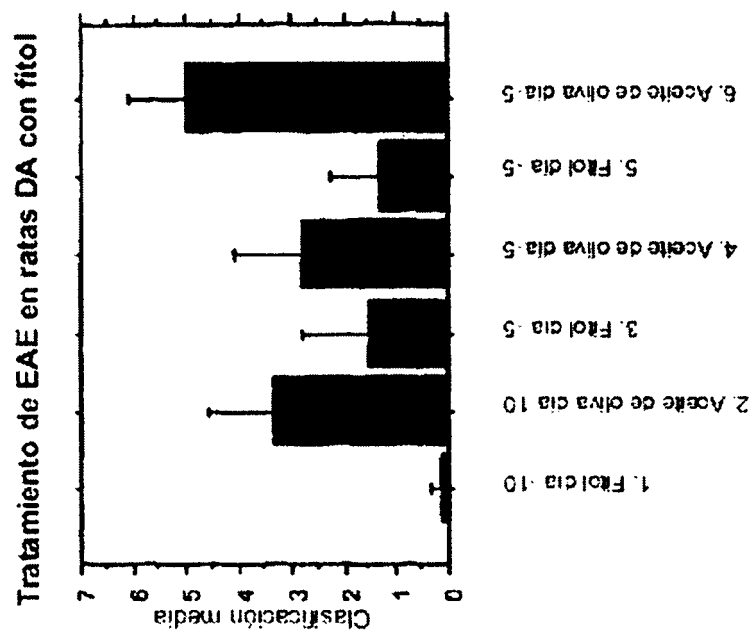


Figura 16A

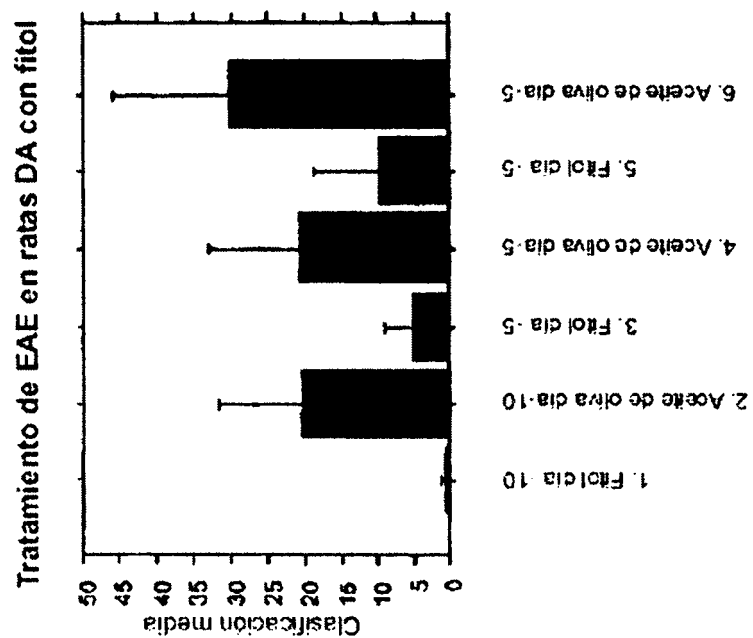


Figura 17A

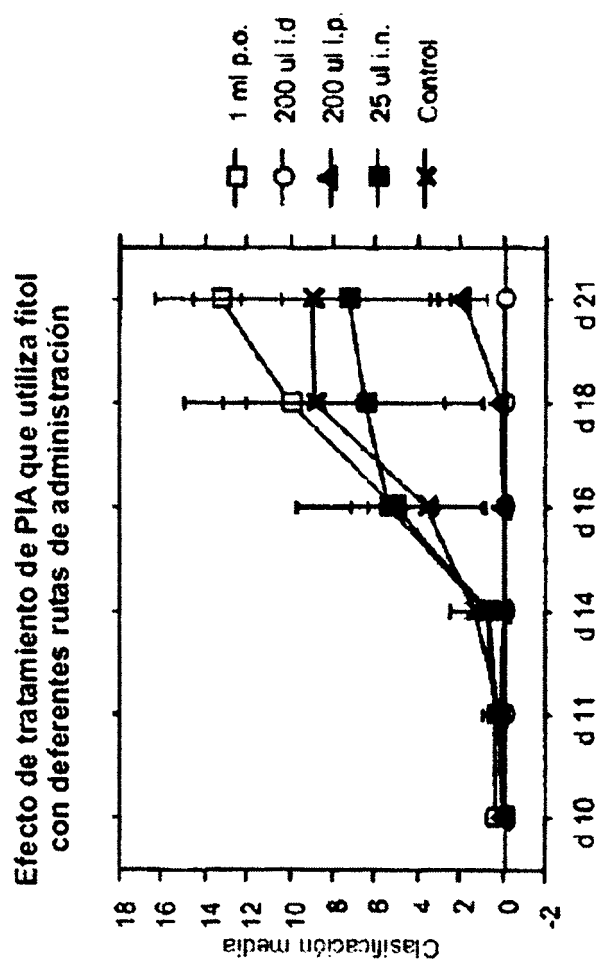


Figura 17B

Efecto de tratamiento de PIA que utiliza fitol
con deferentes rutas de administración

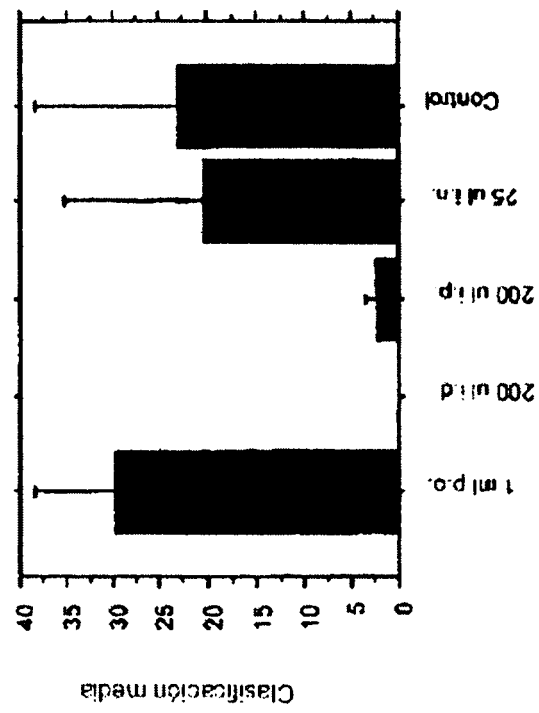


Figura 17C

Efecto de tratamiento de PIA que utiliza fitol
con deferentes rutas de administración

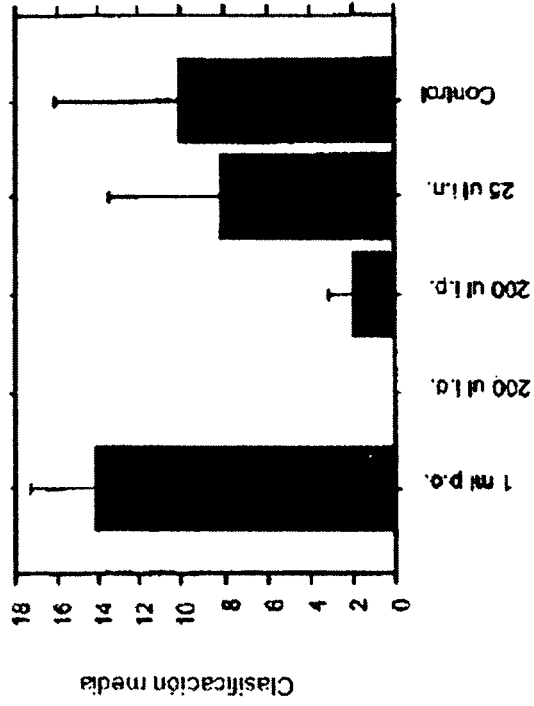


Figura 18A

Artritis Clínica

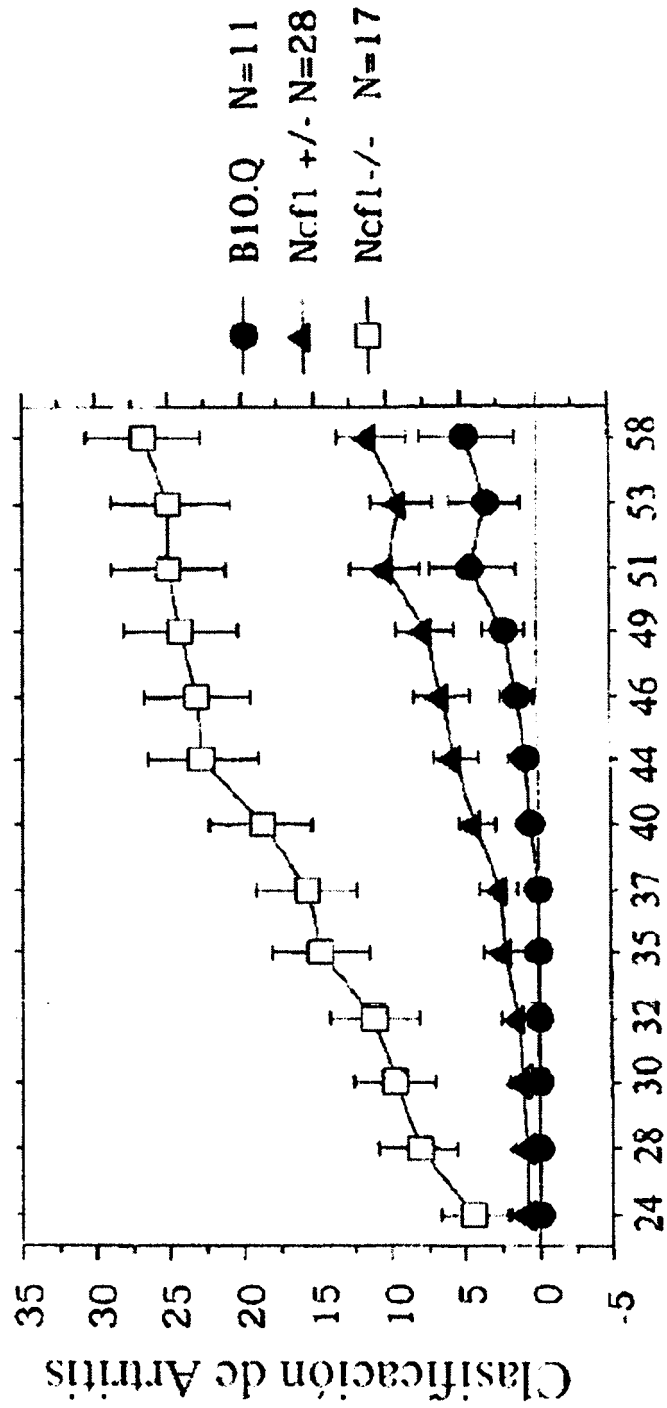


Figura 18B

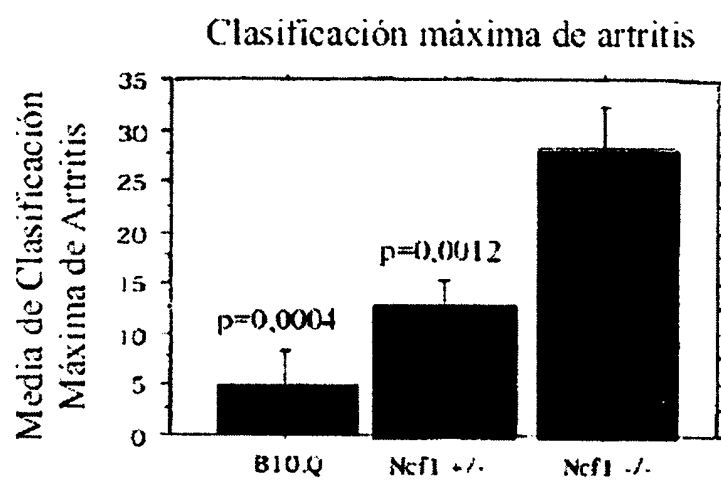


Figura 18C

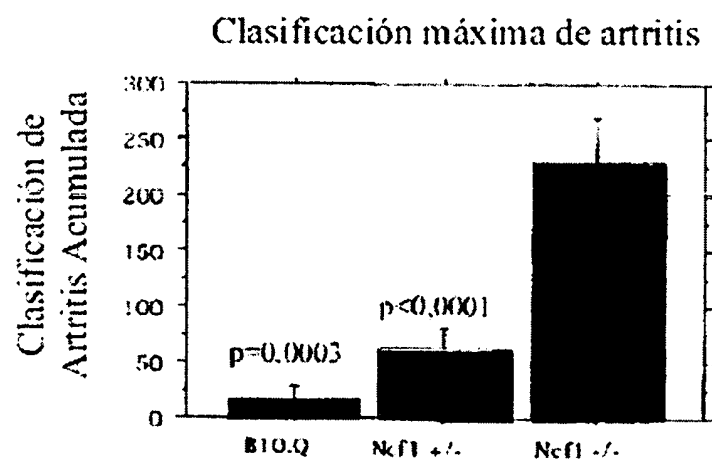


Figura 19

Inicio de la enfermedad

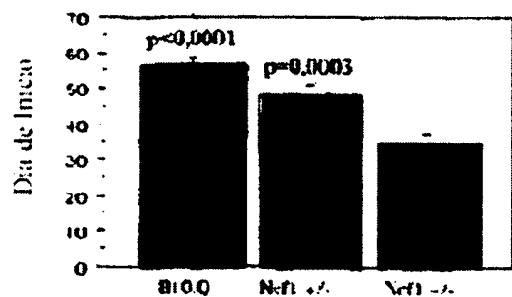


Figura 20

COMP de Suero

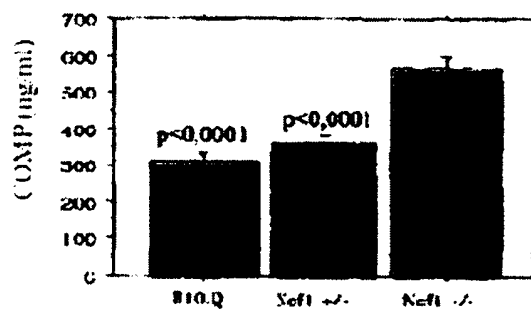


Figura 21

Anticuerpos anticógeno

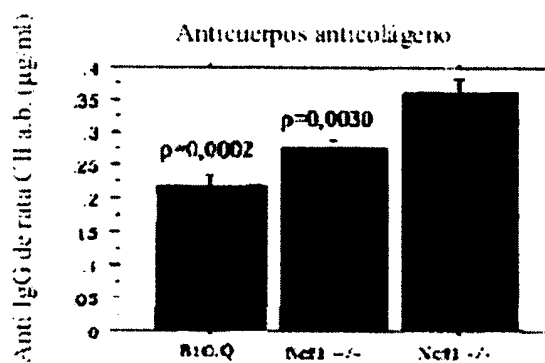


Figura 22

CIA en ratas tratadas con fitol

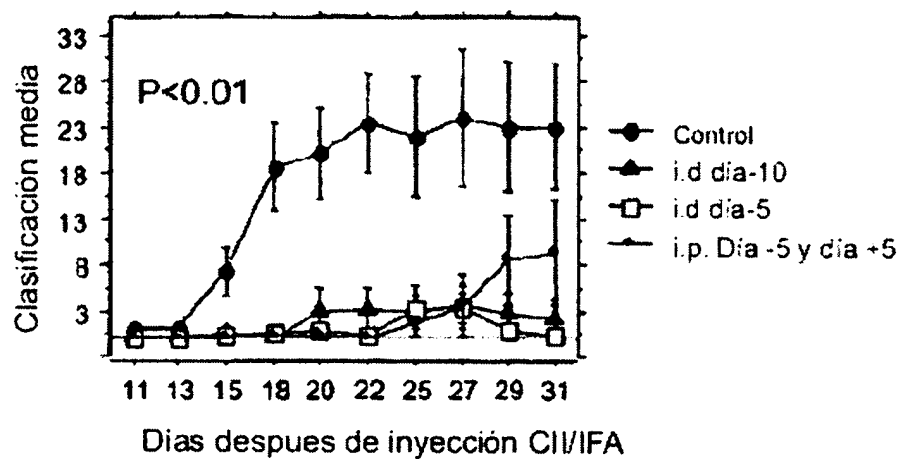


Figura 23A

Tratamiento de PIA activo con phytol

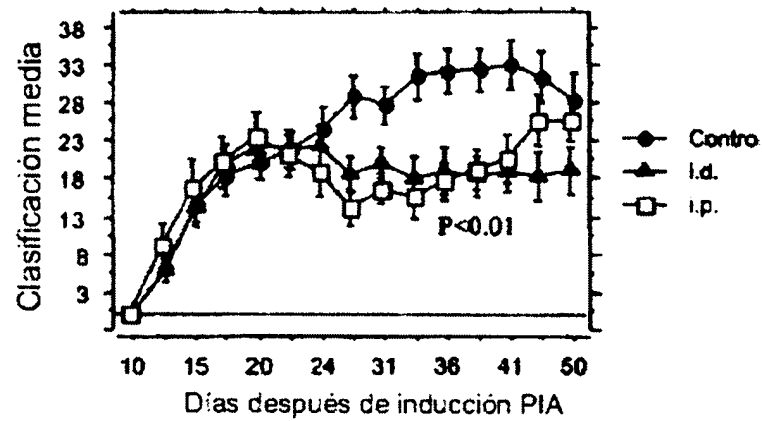
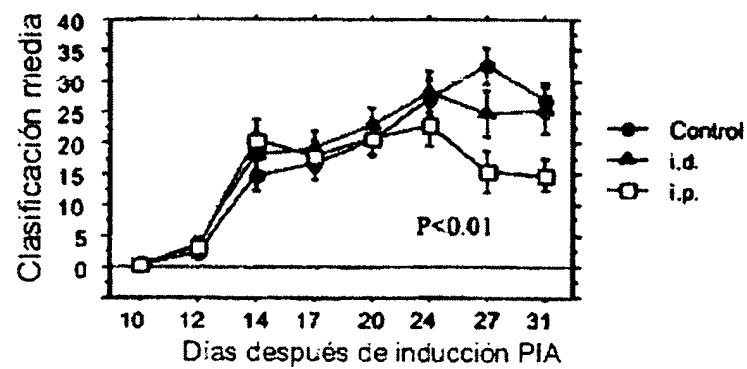


Figura 23B

Tratamiento de PIA activo con undecanol



ES 2 312 780 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Arexis AB

5 <120> Condiciones Autoinmunes y defectos de NADPH Oxidasa

<130> 11145-024WO1

10 <150> US 60/380,904

<151> 2002-05-13

<150> US 60/429,609

15 <151> 2002-11-27

<160> 8

20 <170> FastSEQ de Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1349

25 <212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 1

30

```

gccactgccc agccatgggg gacaccttca ttcgccacat cgccttcctg ggcttcgaga      60
aacgcttcgt cccagccaa cactatgtgt acatgttcct ggtaagtgg caggacctgt      120
cggagaagggt ggtctacaga aaattcacog agatctacga gttccataaa atgttaaagg      180
agatgttccc cattgaggcc ggtgagatcc acacagaaaa cagagtcac cctcacctcc      240
cagctcccag gtggtatgat gggcagcgtg cagcggagag cgcagggga acgctcacgg      300
agtacttcaa cagcctcatg ggactgcccc tgaagatctc ccgctgcccc cacctcttga      360
acttcttcaa agtgcgggcc gatgacctga agctgccccaa tgacagccag gtgaagaagc      420
cagagacata cctgacggcc aaagatggca agaataatgt agctgacatc atgggtccca      480
tcactcttca gacctatcgg gccatcgctg actacgagaa gggttccaaa acagagatga      540
ccgtggcgac gggagatgtg gtggtatgtg tagagaaaag cgagagtggc tgggtggttt      600
gccagatgaa gacaaaacga ggttgggtcc ctgcatccta tttggagccc cttgacagcc      660
ctgatgaggc agaggacccc gatcccaact acgcaggtga accgtatgta accatcaaag      720
cgtaacgtgc tgttgaagag gatgaggtgt ccctgtctga gggtgaaagg atcgaggtea      780
ttdataagct cctagatggc tgggtgggtgg tcaggaaagg ggacatcacg ggctaacttc      840
catecatgta tctgcagaag gctggggagg agataaccca ggcccagcga cagattagaa      900
gccgcggggc accacctcgc aggtcgacca tccgcaatgc acagagcatc caccagcggt      960
ctcggaagcg cctcagccag gacacctatc gccgcaacag cgtccgattc ctgcagcagc      1020
gcagacgccc ggcgcgacct gggccgcaga gccctgactc aaaggacaat ccatcgactc      1080
cgcgcgccaa accacagcct gcggtgcctc cgagaccag ctcggacctc atcctgcacc      1140
gctgcacaga gagcaccag aggaaactga cgtccgcgtg gtgagggggc gctgcactga      1200
aaggcggtcc tatccctacc cttgtatata tttgtatata gcctcagggtc agagggtect      1260
accctgcttt aatgtttgga atggactcag actctgcagc aaaggacagg actgggtttc      1320
tctccacggg tattgctagg atgagagga

```

55

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

60 <213> *Rattus norvegicus*

65

ES 2 312 780 T3

<400> 2

5	Met	Gly	Asp	Thr	Phe	Ile	Arg	His	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Phe	Glu	Lys
	1				5					10					15	
	Arg	Phe	Val	Pro	Ser	Gln	His	Tyr	Val	Tyr	Met	Phe	Leu	Val	Lys	Trp
				20					25					30		
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Glu	Ile	Tyr
			35					40					45			
10	Glu	Phe	His	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Met	Phe	Pro	Ile	Glu	Ala	Gly	Glu
		50					55					60				
	Ile	His	Thr	Glu	Asn	Arg	Val	Ile	Pro	His	Leu	Pro	Ala	Pro	Arg	Trp
	65					70					75					80
	Tyr	Asp	Gly	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ser	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu
15				85						90					95	
	Tyr	Phe	Asn	Ser	Leu	Met	Gly	Leu	Pro	Met	Lys	Ile	Ser	Arg	Cys	Pro
				100					105					110		
	His	Leu	Leu	Asn	Phe	Phe	Lys	Val	Arg	Pro	Asp	Asp	Leu	Lys	Leu	Pro
			115					120					125			
20	Asn	Asp	Ser	Gln	Val	Lys	Lys	Pro	Glu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Ala	Lys	Asp
		130					135					140				
	Gly	Lys	Asn	Asn	Val	Ala	Asp	Ile	Met	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Gln	Thr
	145					150					155					160
25	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	Gly	Ser	Lys	Thr	Glu	Met	Thr
				165						170					175	
	Val	Ala	Thr	Gly	Asp	Val	Val	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Ser	Glu	Ser	Gly
				180					185					190		
	Trp	Trp	Phe	Cys	Gln	Met	Lys	Thr	Lys	Arg	Gly	Trp	Val	Pro	Ala	Ser
30			195					200					205			
	Tyr	Leu	Glu	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Pro	Asp	Pro
		210					215					220				
	Asn	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Tyr	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Tyr	Ala	Ala	Val
	225					230					235					240
35	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Ser	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ala	Ile	Glu	Val	Ile
				245						250					255	
	His	Lys	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Trp	Val	Val	Arg	Lys	Gly	Asp	Ile	Thr
				260					265					270		
	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Met	Tyr	Leu	Gln	Lys	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr
40			275					280					285			
	Gln	Ala	Gln	Arg	Gln	Ile	Arg	Ser	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Ser
		290					295					300				
	Thr	Ile	Arg	Asn	Ala	Gln	Ser	Ile	His	Gln	Arg	Ser	Arg	Lys	Arg	Leu
	305					310					315					320
45	Ser	Gln	Asp	Thr	Tyr	Arg	Arg	Asn	Ser	Val	Arg	Phe	Leu	Gln	Gln	Arg
				325						330					335	
	Arg	Arg	Pro	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Lys	Asp	Asn
				340					345					350		
50	Pro	Ser	Thr	Pro	Arg	Ala	Lys	Pro	Gln	Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro
			355					360					365			
	Ser	Ser	Asp	Leu	Ile	Leu	His	Arg	Cys	Thr	Glu	Ser	Thr	Lys	Arg	Lys
		370					375					380				
55	Leu	Thr	Ser	Ala	Val											
	385															

<210> 3

<211> 1331

60 <212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

65

ES 2 312 780 T3

<400> 3

```

5      cagccatggg ggacaccttc attcgccaca tcgcccctct gggcttcgag aaacgcttcg      60
      tccccagcca acactatgtg tacatgttcc tgggtaagtg gcaggacctg tcggagaagg      120
      tgggtctacag aaaattcacc gagatctacg agttccataa aatgtttaag gagatgttcc      180
      ccattgaggc cgggtgagatc cacacagaaa acagagtcac cctcacctc ccagctccca      240
      ggtggtatga tgggcagcgt gcagcggaga gccgccaggg aacgctcacc gagtacttca      300
      acagcctcat gggactgccc gtgaagatct cccgctgccc acacctcttg aacttcttca      360
10     aagtgcggcc cgatgacctg aagctgcccc atgacagcca ggtgaagaag ccagagacat      420
      acctgacggc caaagatggc aagaataatg tagctgacat caagggtccc atcatccttc      480
      agacctatcg ggccatcgct gactacgaga agggttccaa aacagagatg accgtggcga      540
      cgggagatgt ggtggatgtc gtacagaaaa gcgagagtgg ctgggtgggtt tgccagatga      600
      agacaaaacg aggttgggtc cctgcatcct atttgagacc ccttgacagc cctgatgagg      660
15     cagaggaccc cgatcccaac tacgcagggtg aaccgtatgt aaccatcaa gcgtacgctg      720
      ctggtgaaga ggatgaggtg tccctgtctg aggggtgaagc catcgaggtc attcataagc      780
      tcctagatgg ctggtgggtg gtcaggaaag gggacatcac cggctacttc ccattcatgt      840
      atctgcagaa ggctggggag gagataaccc agggccagcg acagattaga agccgcgggg      900
      caccacctcg caggtcgacc atcgcgaatg cacagagcat ccaccagcgt tctcggaagc      960
20     gccctagcca ggacacctat cgcgcgaaca gcgtccgatt cctgcagcag cgcagacgcc      1020
      cggcgcgacc tgggcgcgag agccctgact caaaggacaa tccatcgact ccgcgcgcca      1080
      aaccacagcc tgcggtgcct ccgagaccca gctcggacct catcctgcac cgctgcacag      1140
      agagcaccaa gcggaaactg acgtccgccg tgtgaggggc ggetgcactg aaaggcggtc      1200
      ctatccctac ccttgatatat atttgatatat agcctcagggt cagaggctcc taccctgctt      1260
25     taatgtttgg aatggactca gactctgcag caaaggacag gactgggttt ctctccacgg      1320
      gtattgctag g                                     1331

```

<210> 4

30 <211> 389

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 4

```

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

```

65

ES 2 312 780 T3

195 200 205
 Tyr Leu Glu Pro Leu Asp Ser Pro Asp Glu Ala Glu Asp Pro Asp Pro
 210 215 220
 Asn Tyr Ala Gly Glu Pro Tyr Val Thr Ile Lys Ala Tyr Ala Ala Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Asp Glu Val Ser Leu Ser Glu Gly Glu Ala Ile Glu Val Ile
 245 250 255
 His Lys Leu Leu Asp Gly Trp Trp Val Val Arg Lys Gly Asp Ile Thr
 260 265 270
 Gly Tyr Phe Pro Ser Met Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Glu Ile Thr
 275 280 285
 Gln Ala Gln Arg Gln Ile Arg Ser Arg Gly Ala Pro Pro Arg Arg Ser
 290 295 300
 Thr Ile Arg Asn Ala Gln Ser Ile His Gln Arg Ser Arg Lys Arg Leu
 305 310 315 320
 Ser Gln Asp Thr Tyr Arg Arg Asn Ser Val Arg Phe Leu Gln Gln Arg
 325 330 335
 Arg Arg Pro Ala Arg Pro Gly Pro Gln Ser Pro Asp Ser Lys Asp Asn
 340 345 350
 Pro Ser Thr Pro Arg Ala Lys Pro Gln Pro Ala Val Pro Pro Arg Pro
 355 360 365
 Ser Ser Asp Leu Ile Leu His Arg Cys Thr Glu Ser Thr Lys Arg Lys
 370 375 380
 Leu Thr Ser Ala Val
 385

<210> 5

<211> 1349

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

35
 gagcactgga ggccacccag tcatggggga caccttcacg cgtcacatcg ccctgctggg 60
 ctttgagaag cgcttcgtac ccagccagca ctatgtgtac atgttccttg tgaaatggca 120
 ggacctgtcg gagaaggtgg tctaccggcg cttcaccgag atctacgagt tccataaaac 180
 40 cttaaaagaa atgttccta ttgaggcagg ggcgatacat ccagagaaca ggatcatccc 240
 ccacctccca gctcccaagt ggtttgacgg gcagcggggc gccgagaacc gccagggcac 300
 acttaccgag tactgcagca cgctcatgag cctgccccacc aagatctccc gctgtcccca 360
 cctcctcgac ttcttcaagg tgcgcccctga tgacctcaag ctccccacgg acaaccagac 420
 aaaaaagcca gagacatact tgatgcccga agatggcnaag agtaccgca cagacatcac 480
 45 cggccccatc atcctgcaga cgtaccgcgc cattgccgac tacgagaaga cctcgggctc 540
 cgagatggct ctgtccacgg gggacgtggt ggaggtcgtg gagaagagcg agagcgggtg 600
 gtggttctgt cagatgaaag caaagcgagg ctggatccca gcacccctcc tcgagccctc 660
 ggacagtcct gacgagacgg aagaccctga gcccaactat gcaggtgagc catcgtcgc 720
 catcaaggcc tacactgctg tggaggggga cgaggtgtcc ctgctcagg gtgaagctgt 780
 50 tgaggtcatt cacaagctcc tggacggctg gtgggtcatc aggaagaagc acgtcacagg 840
 ctactttccg tccatgtacc tgcaaaagtc ggggcaagac gtgtcccagg cccaacgcca 900
 gatcaagcgg ggggcccgcg cccgcaggct gtccatccgc aacgcgcaca gcacccatca 960
 gcggtcgagg aagcgcctca gccaggacgc ctatcgccgc aacagcgtcc gttttctgca 1020
 gcagcgacgc cgcaggcgcg ggcggggacc gcagagcccc gggagcccgc tcgaggagga 1080
 gcggcagacg cagcgtcta aaccgcagcc ggcggtgccc ccgcggccga gcgcccaccc 1140
 55 catcctgaac cgctgcagcg agagcaccaa gcggaagctg gcgtctgccc tctgaggctg 1200
 gagcgagtc cccagctagc gtctcgccc ttgcgcccc gtgcctgtac atacgtgttc 1260
 tatagagcct ggcgtctgga cgcgaggggc agccccgacc cctgtccagc ggggtccccg 1320
 ccacctcaa taaatgttgc ttggagtgg 1349

60 <210> 6

<211> 390

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 312 780 T3

<400> 6

	Met	Gly	Asp	Thr	Phe	Ile	Arg	His	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Phe	Glu	Lys	
5	1				5				10					15			
	Arg	Phe	Val	Pro	Ser	Gln	His	Tyr	Val	Tyr	Met	Phe	Leu	Val	Lys	Trp	
				20					25					30			
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Phe	Thr	Glu	Ile	Tyr	
			35					40					45				
10	Glu	Phe	His	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Met	Phe	Pro	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala	
		50					55					60					
	Ile	Asn	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ile	Pro	His	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Trp	
	65					70					75					80	
	Phe	Asp	Gly	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Asn	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu	
15					85					90					95		
	Tyr	Cys	Ser	Thr	Leu	Met	Ser	Leu	Pro	Thr	Lys	Ile	Ser	Arg	Cys	Pro	
				100					105					110			
	His	Leu	Leu	Asp	Phe	Phe	Lys	Val	Arg	Pro	Asp	Asp	Leu	Lys	Leu	Pro	
			115					120					125				
20	Thr	Asp	Asn	Gln	Thr	Lys	Lys	Pro	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Pro	Lys	Asp	
		130					135					140					
	Gly	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Gln	Thr	
		145				150					155				160		
25	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Ala	
					165					170					175		
	Leu	Ser	Thr	Gly	Asp	Val	Val	Glu	Val	Val	Glu	Lys	Ser	Glu	Ser	Gly	
				180				185						190			
	Trp	Trp	Phe	Cys	Gln	Met	Lys	Ala	Lys	Arg	Gly	Trp	Ile	Pro	Ala	Ser	
			195				200						205				
30	Phe	Leu	Glu	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Glu	Thr	Glu	Asp	Pro	Glu	Pro	
		210					215					220					
	Asn	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Tyr	Val	Ala	Ile	Lys	Ala	Tyr	Thr	Ala	Val	
		225				230					235				240		
35	Glu	Gly	Asp	Glu	Val	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Glu	Val	Ile	
					245					250					255		
	His	Lys	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Trp	Val	Ile	Arg	Lys	Asp	Asp	Val	Thr	
				260					265					270			
	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Met	Tyr	Leu	Gln	Lys	Ser	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	
			275					280					285				
40	Gln	Ala	Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Ser	Ser	
		290					295					300					
	Ile	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ile	His	Gln	Arg	Ser	Arg	Lys	Arg	Leu	Ser	
		305				310					315				320		
45	Gln	Asp	Ala	Tyr	Arg	Arg	Asn	Ser	Val	Arg	Phe	Leu	Gln	Gln	Arg	Arg	
					325					330					335		
	Arg	Gln	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Glu	Glu	
				340				345						350			
	Glu	Arg	Gln	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	
50				355				360					365				
	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Leu	Asn	Arg	Cys	Ser	Glu	Ser	Thr	Lys	Arg	
		370					375					380					
	Lys	Leu	Ala	Ser	Ala	Val											
55		385				390											

<210> 7

<211> 390

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 312 780 T3

<400> 7

5	Met	Gly	Asp	Thr	Phe	Ile	Arg	His	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Phe	Glu	Lys
	1				5					10					15	
	Arg	Phe	Val	Pro	Ser	Gln	His	Tyr	Val	Tyr	Met	Phe	Leu	Val	Lys	Trp
				20					25					30		
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Phe	Thr	Glu	Ile	Tyr
			35					40					45			
10	Glu	Phe	His	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Met	Phe	Pro	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala
		50					55					60				
	Ile	Asn	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ile	Pro	His	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Trp
	65					70					75					80
15	Phe	Asp	Gly	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Asn	Arg	Gln	Gly	Thr	Leu	Thr	Glu
					85					90					95	
	Tyr	Cys	Ser	Thr	Leu	Met	Ser	Leu	Pro	Thr	Lys	Ile	Ser	Arg	Cys	Pro
				100					105					110		
	His	Leu	Leu	Asp	Phe	Phe	Lys	Val	Arg	Pro	Asp	Asp	Leu	Lys	Leu	Pro
20			115						120				125			
	Thr	Asp	Asn	Gln	Thr	Lys	Lys	Pro	Glu	Thr	Tyr	Leu	Met	Pro	Lys	Asp
		130					135					140				
	Gly	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Gln	Ser
25		145				150					155					160
	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Asn	Tyr	Glu	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Ala
					165					170					175	
	Leu	Ser	Thr	Gly	Asp	Val	Val	Glu	Val	Val	Glu	Lys	Ser	Glu	Ser	Gly
				180					185					190		
30	Trp	Trp	Phe	Cys	Gln	Met	Lys	Ala	Lys	Arg	Gly	Trp	Ile	Pro	Ala	Ser
			195					200					205			
	Phe	Leu	Glu	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Glu	Thr	Glu	Asp	Pro	Glu	Pro
		210					215					220				
35	Asn	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Tyr	Val	Ala	Ile	Lys	Ala	Tyr	Thr	Ala	Val
		225				230					235					240
	Glu	Gly	Asp	Glu	Val	Ser	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Glu	Val	Ile
					245					250					255	
	His	Lys	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Trp	Val	Ile	Arg	Lys	Asp	Asp	Val	Thr
40				260					265					270		
	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Met	Tyr	Leu	Gln	Lys	Ser	Gly	Gln	Asp	Val	Ser
			275					280					285			
	Gln	Ala	Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Ser	Ser
		290					295					300				
45	Ile	Arg	Asn	Val	His	Ser	Ile	His	Gln	Arg	Ser	Arg	Lys	Arg	Leu	Ser
		305				310					315					320
	Gln	Asp	Ala	Tyr	Arg	Arg	Asn	Ser	Val	Arg	Phe	Leu	Gln	Gln	Arg	Arg
					325					330					335	
50	Arg	Gln	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Glu	Glu
				340					345					350		
	Glu	Arg	Gln	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Arg
			355					360					365			
	Pro	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Leu	Asn	Arg	Cys	Ser	Glu	Ser	Thr	Lys	Arg
55			370				375					380				
	Lys	Leu	Ala	Ser	Ala	Val										

385

390

<210> 8

<211> 17302

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 312 780 T3

<400> 8

	gagaatcgct	tgaacctgga	aggcagaggt	tgcagtgcgc	cgagattgtg	ccactgcact	60
	ccagcttggg	caacaagagc	gaaacttcgc	ttcaaacaaa	taaattaacg	cccagcatgt	120
5	cttggctttc	atctgccaga	cctcaaccct	cacccccagg	agatcaggtc	cggaccatga	180
	gctgaccctg	gactcaggca	aggggtgagt	gggtgcagccc	tggcctgctg	ggaggcacag	240
	gctgcagcag	gctgcctggg	gctgaggccc	gccactcatg	aactcatgac	cttgaatgag	300
	ctccaaaagc	tctgggcctc	ccagggtcta	gggggagtgg	gagagagagg	cctcagcctg	360
	tccttgggca	tgctgcccc	tcctcacctc	tttgtcccaa	atcccccttc	tggcaaagct	420
10	gacagtctta	atatcactct	ggagaaaact	gagtcagccc	taaggaaaca	ttcaatgaac	480
	catttgctta	cttgaggatt	ggaactcaag	tctcactcaa	agtctgtgcc	attttcgtcc	540
	cagctgtcac	tggccctcat	ccacacacac	ccaaggatga	gcactctaacg	cttgcatgca	600
	cactccccatg	cccgcgttca	ttcactcatt	cattcattca	ttcactcatt	cattgactca	660
	ttcattcatt	cactcactca	ttcattcatt	cagtgaatgt	tgcagtcccg	atcccaatat	720
15	ttatggcctc	tgtgtgccag	gcactagatg	gaggggctgg	ggctagagcc	cctcgataacc	780
	cggctcatgcc	ctagctttcc	tgggacacac	atttgtggtaa	ggggagacta	aaaaaattaa	840
	gtcaggccag	gcacggtggc	tcatgcctga	atcccagcac	tttgggaggg	cgaggcgagt	900
	gaattacctg	aggtcaggag	ttcaagacca	gcctggccaa	catggagaaa	cccagtcctc	960
	aattaaaaaa	aaaaaaatta	cccagggtgtg	gtggcacatg	cctgtaatcc	caggtactca	1020
20	ggagactaac	gcaagagaat	tgcttgaacc	caggaggcag	aggttgcggg	gagccgagat	1080
	cgcgccattg	cactccagcc	tgggaaacaa	gagcgagact	ccatctcaaa	aaaaaaaag	1140
	tgggaggcag	aggcaggagg	atcactagag	gccagtagtt	tgagaccatc	ctgggcaaca	1200
	tagcaggacc	ctgtctgtac	aaaaaaatta	aaaaaaattt	aaccgggcat	ggtggcacac	1260
	accgtagtc	ccagctactc	cagaggctga	ggcaggagga	tcgctggagc	ccaggagttg	1320
25	gaggctgcag	tgaactgtga	tcccaccact	gcctttaaag	ctggataaca	aggcaagacc	1380
	ctgtctcaaa	taacaatagc	aataataata	aagaaaaatt	aatgcaatt	tgcgatgcat	1440
	cagtataaag	tgtcttgcag	aaaaaggagg	caggaagagg	ctgagaaagg	tatgaggttt	1500
	gctatgcaat	gtgaagtatt	caaggaaagg	ttctcggaag	aggtgacatt	tgagcagaga	1560
	aatggaggag	agttatggag	ggaagatggt	gaatgggggg	aacatggtca	agaccaggaa	1620
30	tatggtcaag	gggggaaaga	tgggtcaagg	gacgcagcaa	atgcaaaggc	cctgaggcag	1680
	gagcagcttg	attcaccccc	aaaaccctgt	gggcccctgc	aggcgacggg	aaggacaagt	1740
	gtaaacccctt	ttccttgtcc	ctgcagggtg	gtgtgaacat	gagtcctgcc	atgtttacac	1800
	cctgcaagcc	tgaagagtcc	ccagaaactg	aaagaagaag	caaagccctt	tctgtaccct	1860
	ccctgcccc	tgtcccagcc	gcgacaaaag	cgacttcctc	tttccagtgc	attttaaggcg	1920
35	cagcctggaa	gtgccaggga	gcactggagg	ccaccagtc	atgggggaca	ccttcacccg	1980
	tcacatcgcc	ctgctgggct	ttgagaagcg	cttcgtaccc	agccagcact	atgtgagtag	2040
	ctggtggagg	gcacccccgt	ggggggaata	cgggaggggc	agcacggcca	cccttgcagt	2100
	cccaggggcca	accagctcca	gtgaggacta	acggggcagg	gtcttgggca	cctgggtccct	2160
	ggtctttgag	cctggatcta	cccctctgat	ccctgggaag	acagttccct	tggaccgcc	2220
40	ctggggcccca	ggcctttact	gtccccgcct	gtgtccccag	ccaggccctc	agccttagcc	2280
	aggagtccct	tttctgctcc	cctgccatgg	ccaggcagcc	cagcgtctct	tcagggtccga	2340
	ggcccaactcc	tccaggaagc	cttccctgac	tagcccagct	atcagagagt	ggccctccca	2400
	agagggaggc	ctggaaacta	aagctctctc	tctccccagc	tgcctgtagt	gtcagttaga	2460
	gtcttatcct	ctccagtagg	gtgacaccat	gacagggggc	aatagagtcc	tcccatctgt	2520
45	ccccaaggag	gctggacaaa	tgcctgtca	gacacacaa	tccactgggt	cccctaattcc	2580
	cataggaagg	ccagggaagg	actacattta	ggaaattgaa	gcttgtatgg	aacatttagt	2640
	cctatgtgcc	aagaccttcc	tcttttttgt	tatttttttg	tgttttgaga	cagagttctg	2700
	atctgttgcc	caggccagag	tgcagtggca	cgatctcagc	tcaactgaaac	ctccgccttc	2760
	cagggtcaac	tggttctcct	gcctcagcct	ccagagtagt	tgggattaca	ggtgcccacc	2820
50	accacgcctg	gctaattttt	gtatttttag	tagagacagg	gtttcaccat	gttggccaga	2880

55

60

65

ES 2 312 780 T3

	ctgggtctcaa	actcctgacc	tcaagtgate	cacccacctg	ggcctcccaa	agtgcctgga	2940
	ttacaggcat	gagccaccgt	gcctggcctg	tttttttgaa	atgaggtctg	gagtgacgtg	3000
	gtgcgatcat	agttcactgc	agcctcaagc	tcccaggccc	aagtgatccg	cctgcctcaa	3060
5	ccccttgagt	agctggggct	acaggcgcac	accaccatgc	ctggctagtt	tttaaaattt	3120
	ttgtggagat	gagggtttcac	tatgttgcc	aggctaactt	tgaactcctc	ggcttaagca	3180
	accctctggt	ctcagcctcc	cacagtgcct	ggattacaag	cgtgagctac	cgtgcctagt	3240
	cacttttctc	cttttctttg	taactttcag	ttttgaaatt	tcaaattttac	agaaaggcta	3300
	ctgggtgtca	aaacgggtacc	agtcactcca	atagtccttc	actcaccttc	atccacacct	3360
	ctctttctgg	ggatattttc	tgaattattt	gagagtgagt	tgaagacgtg	tttctttacc	3420
10	tctaanaact	acttgtttgg	catttcttaa	aatcaaggca	ttctcttaca	taatcacaac	3480
	acacgtgtca	aatcaggaa	attaacatgg	acaaaacacc	attatccacc	cacagacttt	3540
	actgagggtt	ccccgattat	cctgcttgtc	ctctgcagtg	aaaacttttt	tcagggtctag	3600
	gatccagtc	aggatcaatg	tcatagcctt	taaccttctt	taactctggat	cagtcttttt	3660
	tctttttctt	tttctttttt	tggacacgga	atctcactct	gtcgccagac	tggagtgag	3720
15	tgggtgcaatc	tcgggtcatt	gcaacctctg	cctcctgggt	tcaagagatt	ctcctgcctc	3780
	agcctcctga	gttagctggg	aatlacagggt	cgccgaccca	tgcctagctc	gcattttttg	3840
	gtagagacag	ggtttttgcca	tattgattct	ggatcagctc	tttttttttt	ttatgaaatg	3900
	gattcttact	ctgtcaccca	ggctggattg	caatggcaca	atctccactc	actgcactct	3960
	ccgcctccca	ggttcaagca	attctcgtgc	ctcagcctcc	cgagtagctg	ggattacagg	4020
20	catgcccac	catgcccggc	tactttttgt	attttttagta	gagacagggt	ttcaccatgt	4080
	tagccaggct	gatctcgaac	tccctgacgtc	aggtgatctg	cccgcctcga	cctcccaag	4140
	tgtcgggatt	acaggcggtga	gccacccgtgc	cagcgggattc	tggatcggtc	ttaatcagtc	4200
	tttgtctttt	gcaactttga	tgttttgtag	agagcagacc	agttaccttg	tagaatgtcc	4260
	cttagtttgg	gtttatcttc	attagattca	gtttgtgtat	ccagggcagt	ggatcttaga	4320
	tgcattcttg	tcttcttttt	aatttttttg	agagggagtc	tcgctctgtc	acccaggctg	4380
25	gagtgacgtg	gcacaacctc	agctcactgc	acgctccgcc	tcccgggttc	aagcaattct	4440
	cctgtcccag	cctcccaagt	agctggggtc	acagggtgcc	atcaccacta	ccgggtaatt	4500
	tttgtgtttt	tagtagagac	aggggtttcac	catattgggtc	aggtcgggtc	tgaacgcctg	4560
	acctcagggtg	atccacctgc	cttggcctcc	caaagtgtctg	ggattacaga	cgaggagccaa	4620
	catgcccagc	cttccctgcc	ctcccgtccc	ctcccctctc	ctcctgtccc	ctcccctccc	4680
30	ctcccctctc	ctctgtctcc	ctcccctccc	ctcccctccc	cacccaagct	ggagtgacgt	4740
	gggtgcaatca	tagctcacta	aagccttgac	ctccaagtct	caagcaattc	tcctgcctca	4800
	cctggggcca	cagggtgtgcg	gcaccacacc	cggacaattt	ttgtgttttt	agtagatatg	4860
	gggggtctgc	tatgttgccc	aggctgggtc	caaactcttg	gactcaagcg	atctccccac	4920
	ctcgggtacta	aaaagtgtctg	ggattccagg	tgtgagccac	cgtgcccagc	ctaggtccta	4980
35	cttttatctc	caattttacag	atgagtcac	ttgagagaag	ctgacctctc	tgcctcggtg	5040
	ctcaaggctg	ggggtgtgga	gcacttgggt	ccacgtttgt	gccctttctg	caatccagga	5100
	caaccgcaaa	gatgggtctc	accccaatcc	tctgggtctc	ctccagtggt	tagtggggtc	5160
	ctgggtgcac	acagcaaaagc	ctcttttggtg	gctaaatggg	gtcccccgtg	tctggctttc	5220
	ccccagggtg	acatgttccct	gggtgaaatgg	caggacctgt	cggagaagggt	ggtctaccgg	5280
	cgcttcacccg	agatctacga	gttccatgtg	agtgtgggga	cggaggagggt	acaggggacc	5340
40	accgttccag	ctccacccctt	tgggaaggac	cttagccag	gtgatgggga	aactgcagaa	5400
	cccagaatcc	ccttccagac	cacagttaaa	ggggatttat	ttatttatat	aaatttttgt	5460
	gacagggtct	tgtctgttca	ccactctgaa	cacctcatgt	tctctgatta	caggcatgag	5520
	ccccacgcgt	cggccttttt	gggtgggtttg	agaggtattt	aggtttgcag	tgcaggggcg	5580
45	caatcatagc	tcactgcagc	ctcgacctct	ggggctcaag	cgatcctcct	gcctcagcct	5640
	cctgagtagc	tgggactata	gggtgcgcac	accatgtgtg	gctaattttt	gtatttttta	5700
	taaagatggg	gatctcacta	tgttgcccag	gctgggtctg	aactccagac	ctcaagtgat	5760
	cctcctgcct	tggcctccca	aagctagggg	ggcattaaaa	gaaaaaacat	ttttccccc	5820
	gaaacattta	agtagtctta	ctgaaaaaca	taaaacacag	aaacaccaga	ttctcatatt	5880
	aaagtaaaac	agacaggatc	tcccagaaacc	ttcctagaat	ggaaccattc	ttgtcgcttt	5940
50	tgaaaaaaca	agccaagttc	tagatcccaa	ataaatgcac	ctgctgggtga	acattctcct	6000
	tgtgggtctc	gtccctatgt	tagttatttt	cctaaatttt	acatttgtac	ctttttaaga	6060
	atgagttatc	agttttttta	tatttgcctt	tcttttgaga	tgggggtctg	ctctgtcacc	6120
	caggctgggg	tgcagtggtg	caatcacggc	tcactgcagc	ctcaacctcc	agggctgaag	6180
	cgattctccc	atctcagcct	cccatgttga	gatcacagg	gtgcaccacc	acacctggct	6240

ES 2 312 780 T3

	ccttttctcg	atttgttttt	tgtagagatg	ggatttccgt	atgttgccca	ggctgggtctc	6300
	taactcctgg	actcaagtga	tcctcccggc	tcagcttccc	aaattgctag	gattacaggt	6360
	ttgagccct	gcacctggtc	aacctgagtt	ttaagaggat	ccctttggcg	actggattga	6420
5	ggacagacaa	gagtggacgg	gggacacaag	gaggccattt	tcgttatcca	ggcctggtag	6480
	tggctagggc	caggaggggtg	gggttgggtg	gaagcagtca	gatcccaaag	agatttgggg	6540
	attggaagca	aaaggatttg	ctgggtgactt	gcacatggga	gggagagagg	tcagtgcctc	6600
	tgctaataca	ggaatccaga	ttgccaccga	aatttctagg	cccagatat	ttaggtagt	6660
	tctcactctg	tcaccagga	tggagtgcag	tggcgccatc	tcggctcact	gtaacctccg	6720
10	cctcccaggt	ttaagcgatt	ctcccacctc	agcctcctga	gtagctggga	ttacaggcat	6780
	gtgccaccac	tcccggctaa	tttttgtatt	tttagtagag	acggggtttc	accacgttgg	6840
	ccaggctggg	cttgaactcc	tgacctcaag	tgatccaccc	acgacagcct	cccaaagtgc	6900
	tgggattaca	ggcgtgagcc	accatgctcg	gccttttagg	tggttttgag	aggatttttag	6960
	gtcacttcca	atctcgtgct	tttccaaagt	ttgtaaacta	caaataattcc	ttcacgtctt	7020
15	cttgtctttt	taatgttttag	aaaaccttaa	aagaaatggt	ccctattgag	gcagggggcga	7080
	tcaatccaga	gaacaggatc	atccccacc	tcccagggtga	gcacgggggt	gagccgcctg	7140
	tcaggggggt	attggcgggg	gtcacctgc	cctccagcc	cctctcgggc	ttgacctccg	7200
	gttctctggg	gccagctccc	aagtgggttg	acgggcagcg	ggcgcggag	aaaccgccagg	7260
	gcacacttac	cgagtactgc	agcacgctca	tgagcctgcc	caccaagatc	tcccgtgtc	7320
20	cccacctcct	cgacttcttc	aaagtgcgcc	ctgatgacct	caagctcccc	acggacaacc	7380
	agtgagtga	cttttcaccc	tgccagggtg	gagagggaag	gaggggtggg	actttctgtg	7440
	ttttgcagat	gaggaaacca	aggctcagag	agggaagacc	accttcccag	agccacacag	7500
	ccagaaagag	gaggcaaat	ccacctccgg	ccctgtgac	cccgcgaagc	ctccacctta	7560
	atctttcaca	cttagggcac	tgggggaagc	actgggggt	ggagggttcaa	agtccctggg	7620
25	cctcatctcg	acattatggc	cacctggcta	tgggacctgg	agccagtac	cactgtcttc	7680
	tgaatgcagg	ttctccattt	ctataatggg	cagtggagat	cagatgaagc	attgggtgtc	7740
	ttgcggagcc	ccccagaagg	atgtgggggt	gatgcctctg	ctaagtgtct	agcatgtctg	7800
	gggtctcctg	taccagggac	cctgtgtgga	aggcacctga	gaggctgagg	gagctccagg	7860
	caggctgggg	aagtcacctt	ctccactcct	ctctgggtcac	tgaagctcga	agtggggagc	7920
30	atgaggacag	gacgttacc	cttgtcaagg	caccagggct	gccaagacag	agacaagcag	7980
	cattgtcccg	gccagcactt	attgacgctt	gaaggtgtcc	cctggcccaa	ggaaggccag	8040
	ttatcatccag	cccgggaggc	gggggaagga	tggactctgc	agtgggggtcc	gctcctcatt	8100
	gcctgtcttc	tcagggtctc	agaaggagga	agaggccggg	cacagtggct	cacacctata	8160
	atcccagcac	tttggaaggt	cgagggtggg	agatcacctg	aagttgggag	tttgagacca	8220
35	gcctggccaa	catggtgaaa	ccccatctct	accaaaaata	taaaaattta	gtcaggcatg	8280
	gtgggtgtcg	cttgtaatcc	cagctacttg	ggaggccgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	8340
	ggggaggcag	agggtttcagt	gagctgagac	tgcgccactg	cactccagcc	tgggtgacag	8400
	agcgagactc	tgtctaagga	aaagaaagaa	gaagatggcc	tgggagcccg	tgggagcccg	8460
	caagagcatt	ttccaggctt	aggcatcct	ttgggtctgc	agaaggctat	gcagtgtcct	8520
40	cctcatgtcc	ctcccttggg	ctgcccgagc	agatccgccc	gccccatca	cttctgaag	8580
	cccttctca	gccagtccag	ttgtgtctt	ctctccgcag	tgcctcttcc	cttctccggg	8640
	tccctcttct	tcttgggagt	tcttctgcag	gtctaccag	tgcctcttct	tccctccatg	8700
	gaagtccaga	gggtctcacc	cagactgggt	ctctcctcag	gacaaaaaag	ccagagacat	8760
	acttgatgcc	caaagatggc	aagagtaccg	cgacaggtga	gaggacgggg	ggcagccggc	8820
45	ggggggggac	accctgagga	gacctagagt	gttcaggga	tggagcagg	gctgggagca	8880
	ggctgggagg	gtcacagct	accctgctga	agaattgggt	ctttggggcg	ggtgcggttg	8940
	ctcatgcttg	taatcccagc	agtttgggag	gccgaggcag	gtggatcact	tgaggctcagg	9000
	agtttgagac	cagcctggcc	aacatggaga	aacctgtct	ctactaaaaa	tccaaattag	9060
	ccaggcgtgg	tgacaggtgc	ctgtagtccc	agccacttgg	gaggctgagg	caggagaatt	9120
50	gcttgaaccc	ggaagacgga	gtttgcagt	agccgagatc	gtgccactgc	actccagcct	9180
	gggcagcaga	gccagactcc	atctcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaagaag	aattgggtct	9240
	ttggaagggt	cctggagact	gaaaggagcc	ctttgcagg	ggcagtgag	agaccagcgc	9300
	agacccttgc	tactggcagc	cgggggagtg	tttgcggtg	aatgaatgaa	cagggttttg	9360
55	agggcagtg	ggccttcaga	ggcgatgcag	gcctgtggca	gttttctaata	cttattgcac	9420
	agtcactgct	aataacaata	ataataataa	tacctaacat	taatggagtg	cttactctgt	9480
	gccagccact	attttgtttt	tggtgttttc	agtgacagg	tctcgtcttg	ttggccaggc	9540
	tagagtgaag	tggtgtgatc	atagctcact	acagcctcga	cctcctgggc	tgaagcgatc	9600

ES 2 312 780 T3

	ctcccccttc	agcctcccaa	gtagctggga	ttacagggtg	gtgccaccat	gtccagctaa	9660
	tttttaattt	tctggtagag	atgggggtct	actacattgc	ccaagctggg	cttaagctct	9720
	tggcctcaag	caaccctcct	gcctcagcct	cccaaagtgc	tgagattata	gacatgagcc	9780
5	actgtgcccc	gctttttctt	cttcttataa	ggacacgagg	cctgttgggt	tagggcccac	9840
	tctactgacc	tcattttaat	ttaattacct	cttgaaacgt	acttaagagt	acctttctct	9900
	taatacaccc	acactgtaag	gtactgggtg	gttaggactt	caacatatga	attttgagaa	9960
	ggcggatgtc	agccattact	aaacagcatc	agcacctcca	cggttggatg	aagggctggg	10020
	cagaaatgca	cactcaggtc	ccacagtgga	cctactgaac	aggataggca	ttttagcaaa	10080
10	atcccaggta	ttgggggtgca	ccttaaagtt	aggaaaaggt	caggcactgt	ggctcatgcc	10140
	tgtaatccca	gcactttggg	aggccgaggc	ggttgaatca	cctgagggtca	ggagtccgag	10200
	accagcctga	ccaatatcgt	gaaactccat	ctctactaaa	aatacaaaaa	ttagccaggt	10260
	gtggtggcgg	gtgcttgtag	tcccagctac	ttgggaggct	gaggcagggt	aattacttga	10320
	acctggggag	tggagggtgc	aatgagccaa	gattgcacca	ctgcactcca	gtgacagagc	10380
15	gagactccat	ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agttgggaaa	aggccagggt	cagtggctcc	10440
	acgcctgtaa	tcccaacact	ttaagaggct	gagggtggag	aatcctttga	gcccaggagt	10500
	tggagaccta	ctcgggcatt	gtcccaagac	cttgtcttta	ccagaaatta	gccgggtgtg	10560
	gtggcatacg	tctatgggtc	cagctattcg	ggaggctgag	gcaggggagat	tgcttgagcc	10620
	taggagtcca	gggctgtagt	gagctgtgat	cacgtcactg	tactctagcc	tgggcaacag	10680
20	agcaagactc	tgtctcccaa	aaagaaaata	aagtgtggaa	aggctcacta	acttcacag	10740
	atgagaacaa	ggacatgttt	gaagtgtgag	gccgaagcct	ggagaacgct	atgcgccag	10800
	gaaatgcagg	gcagcagaga	ctcaagatgc	cagcgctctg	tctggaggcc	cagatgggcc	10860
	tgcaatgccc	ctcacccctc	gccctccctc	ttgccccaga	catcacccgc	cccatcatcc	10920
	tgcagagcta	ccgcgccatt	gccaaactac	agaagaccct	gggctccgag	atggctctgt	10980
25	ccacggggga	cgtggtggag	gtcgtagaga	agagcgagag	cggtcagacc	tcccacctta	11040
	cggggctcct	tcccctgggt	ctcaggaacc	cacagccaca	aagccccctg	ccaagctcag	11100
	gcagcctggc	ccctggggag	actccggctc	tggttagggc	cctaaatgtc	ctccccacac	11160
	tgtgggtcgc	cttctctctt	agtgtgcacc	ctgtgggtgc	tgtgggcatc	tgtgcatggc	11220
	aggccggggc	ggggcatgtc	tgcggtgtct	gtctggatgg	gtatgggacc	gtctgttcat	11280
30	tatgaagtgg	gtcagagctg	gtgattctgt	gagcatgtgt	gcatgcatgc	atgtgacctc	11340
	attgtccagt	gtggtgaagg	tgacatttcc	aaatctgagc	attggacatc	agtgtgtctg	11400
	tgtccctgtg	tccctaccat	ccctgatggc	tgcagggagc	cgttgggccc	tgccccctcag	11460
	tcacattccc	gcacctctgg	cacagggttg	tggttctgtc	agatgaaagc	aaagcgaggc	11520
	tggatcccag	catccttcc	cgagccccct	gacagtcctg	acgagacgga	agaccctgag	11580
35	cccaactatg	cagggtgccc	ctgcctcccg	aggctgtagg	ggtgtggggag	aaaggggcag	11640
	gcagggtctc	gggatattga	gtgactgctt	tggagtctgg	gctgggtgtc	gacttggcag	11700
	aaaagtccag	gtcagactct	catcgactct	ggcttggggg	ccctggcagg	ttgtgatgcc	11760
	cttgggtctg	acaggggaaca	ggaggaggag	cagacgactg	gggagagtgg	gaggccagtg	11820
	gtgtctgtgg	atatgtggcc	aggttcagtg	ggaagctgaa	ggatgagcag	accttaggct	11880
40	cagggaaggag	ggctgcctgg	aagtgggggc	atcatcactg	accagaaagg	gaaaactggc	11940
	agtgccaggg	ctggatgggg	cctgcattga	gcttgaaaaa	aactataata	gaattgggta	12000
	ccatttccat	ttattatttt	tttattttatt	ttactttttt	gagatagagt	ctcactccct	12060
	tgctaagggt	gagtgcgggt	gtgctatctc	agctcactgc	aacctctgcc	tcccaggatc	12120
	aagtgattct	ccagcctcag	cctccccagg	tagctgggat	tacaagcatg	caccaccatg	12180
45	cctggataat	ttttgtattt	ttagttgaga	cgggggtttc	ccagggttgg	cagactggct	12240
	tcgaacttct	gacctcaggt	gatctgcctg	cctcggcctc	ccaaagtgtc	ggaattacag	12300
	atgtgagcca	ctgtccctgg	cctgggttacc	cacattttta	aatggagtga	tttcaccctt	12360
	ttatgtggat	ttacagcttg	tttttttttt	ttttgagaca	aagtctgggt	ctgtcaccca	12420
	ggctggagtg	cagtaatgca	atctcagctc	actgcaacct	tagcctcctg	ggttcaagca	12480
50	attctcctgc	ctcagccacc	tgagttagctg	ggatttacagg	catgcaccac	cacggccagg	12540
	taattttttg	tattttttagt	agagatgggg	tttcgccatg	ttggccaggc	tggtctcgaa	12600
	ctcctgacct	cagggtgatcc	gcccgccttg	gcctcccaaa	gtgctaggat	tacaggtggg	12660
	aaccacctcg	cccagcctgt	ggctatcgtt	taaacactgg	gaaggcctgc	agcccccagg	12720
	ccgacagtta	gctgcagctg	agcagttccc	agtgcagggt	agacggatgc	tccaccacc	12780
55	tactcatggc	tgatctcttg	tcatagtgaa	gtgtctggac	agaccttcat	cgttatggga	12840
	tctctgggtc	ccagagtggg	tggcaatgaa	tgggagtggg	caagctcacc	tgggtgtagg	12900
	gggcagaggg	ccgaagtcca	gagtgtacct	ccagagtggg	tgccagcagg	agcttgccga	12960

ES 2 312 780 T3

	gggatctggg	atggagcagg	aggggtggagg	gaggagaccc	agaagagggg	gaactgtggg	13020
	ccctgggtgg	gtctggagtg	cctggaggaa	gcccaggcgc	agagaggaga	agatgggatg	13080
	ggtggcgagc	cccaggctgg	gccgacctca	cactgtgctc	tgtgcccctg	ccgtggacca	13140
5	ggtgagccat	acgtcgccat	caaggcctac	actgctgtgg	agggggacga	gggtgtccctg	13200
	ctcgaggggtg	aagctgttga	ggtcattcac	aagctcctgg	acggctggtg	ggtcattcagg	13260
	taggagggcc	cctctccatc	cagagcacc	atctgagtea	gccccagcca	ggacggcggtg	13320
	tttagggatc	tggggtgact	tgtccctggg	actctgggta	agccactgcc	cctctctggg	13380
	cttagtttcc	atctcagtag	cagggaaggaa	tgagcccacc	cttgccctgtc	ttgtggggat	13440
	ccaatgtect	tgtccaagtg	ggtgcatttc	tcctttgtga	tttagggctc	cttcccaacc	13500
10	atctattatt	attcctttctc	tggcaacatg	gtgaactgtt	gtataaataa	ttacattcct	13560
	agctagggcg	aatggctcag	gcctgtaate	ccagcacttt	gggagcccag	ggcaggacga	13620
	tcacgtgagg	tcaggagttc	gagaccacc	tggccaacat	ggcaaaaccc	tatctctact	13680
	aaaaacacaa	acatgagccg	ggtgttgtgg	tgggagcctg	taatcccagc	tactcgggag	13740
	tctcgagaca	agagaatcac	ttcaaccggg	gaggcggagg	ttgcagtga	ccaagatcgc	13800
15	gccattgcac	tcacgactgg	tcacgactgg	cgaaactccg	tctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	13860
	aaaaagatta	ctttcttttt	atcattctctt	tatcttttaa	agctttcttg	cagtccaggtg	13920
	cagtgtctca	tgcctgtaat	cccaacactt	tgggaagctg	aggtgggagg	atcactcaag	13980
	gctacaagtt	caagaccaac	ctggccaatg	tagggagacc	tctgtctcta	caaaaaaat	14040
	taaaaaatag	ctggatgtgg	tagcacacac	ctgtagcccc	agctactcag	gaggctgagg	14100
20	tgaaggatc	acttgacccc	aggagttgga	ggctgcagtg	agctatgact	gcaccactgc	14160
	acccggagct	gggtgatgga	gcaagaccct	gtctcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaagctt	14220
	ccattgcaat	tcccatctgt	ttatcttcca	aatgaatgca	gaaataactaa	ttatcttttt	14280
	tctggttctg	gggaacacag	aattctagcg	gcttgtggag	ccatttccct	ggagccatgg	14340
	ggcctcccag	gtcctttcct	gtgtcttcat	tttttacgaa	ttttttcatt	tttttgagaca	14400
25	ggatcttgtc	ctgactccca	agctggagca	caatcatcgc	tcactcaagc	gatcctccca	14460
	cctcaggctc	ccacgtagct	gggactacag	gtgagcacca	ccacatctgg	ctaattgttt	14520
	ttaatttttt	tgtagggatg	gggtctcact	atggtgccaa	gactagtctt	aaactcctgg	14580
	cctcaagagt	tcctcctgcc	ttggcctccc	aaagcactgg	gattacagga	atgagcttcc	14640
	atgctgggcc	tttgcctggc	tcttcagagc	cctaggtcac	agggccagcc	tggcgccctg	14700
30	cgcgaagctt	atcttaaagc	tgggaccaca	acatgcatac	ctgcagccgg	gccccggggc	14760
	agagggcttt	gaggcagcat	ttctcagcct	tttagacaca	cactctgtta	acccccatcc	14820
	tgtgtctctg	ataatcttct	tgtgatcctc	ccaccagcca	agaattgggt	tttatgtgaa	14880
	ccttgtatta	tgcaagttt	tcttttgttt	tttttttcac	tcccaaatat	aataattgaa	14940
	atagaaagaa	agtcttttca	acaaatgggt	ctggaacaga	tggatttcca	tactggaana	15000
35	aaaaaaaaaa	agtcacaaaa	caaacctaga	cccttccctc	acactgtaca	catatgttta	15060
	cttcagatgg	atcacagggt	tatcccagag	taaaacctga	aactaaaaac	catttggggc	15120
	tggacagggg	gctcacgcct	gtaatctcag	cactttggga	ggctgaggca	gggtggatcac	15180
	ttgatgtcag	gagtttgaga	ccagccatga	ccaacatggt	gaaatcctgt	ctctactaaa	15240
	aaaatacaaa	attmaaccaag	tgtgggtggt	catgcctgta	atcccagcta	cctgggaagc	15300
40	tgagacagga	gaattgcttg	aacttgggaa	gcagagggtg	caatgagtcg	acatcatgcc	15360
	attgcactcc	agcctaggca	acaagagcaa	aactctgtct	tgggggttgg	cgggggaaaa	15420
	gcattttggaa	gaaagcatag	aattttggtg	cctggaggta	ggcaaagggt	cgtaggagac	15480
	agaaggcagt	taacataaaa	gaaaaatttg	caaataataa	cctgccagtg	tcttcttttt	15540
	tctttaattt	tttcgggagg	tagagatagg	ggctctgtta	tgttaccag	gctgatctcc	15600
45	aactcctggc	ctcaagcgat	cctcccacct	agatccctca	aagtactggg	attacaggcg	15660
	tgagcgaccg	tgccttgccc	attcttacca	atgtcatata	gctgataact	gtcccctgcg	15720
	gtgacctgga	tctgttaacc	tcaccccctt	ccttgactgt	ggaaggattg	ctggaagggt	15780
	ctcagttgca	cagaccagga	aactgaggcc	cacagaggca	gggtgtccgg	tgtttgcaac	15840
	ctctcagcct	gtgctaacc	caattgttca	gagagagccc	tgaaaccttc	tcctctgggc	15900
50	gccccagggt	gactgcccc	gcctcaaggg	ctgcctctgt	tgagggaag	acgacgtcac	15960
	aggctacttt	ccgtccatgt	acctgcaaaa	gtcagggcaa	gaegtgtccc	aggcccaacg	16020
	ccagatcaag	cggggggcgc	cgcctccgag	gtaagcgggg	gtccccgggg	ctgggcgggg	16080
	tcgagcgggg	gcgcaccacg	gggtcgtctc	gtctaggcca	tagcttggca	gtgccggggc	16140
	gggggctctc	agcctggcag	gagaggcagg	acctcacgg	gggaaagggg	ctggacgcgc	16200
55	ctggcccgcg	tgtggggctg	gcacgggggc	ggaaggaaag	cggcgatgcc	cgggggcttc	16260
	ggggatgggc	agtccagggg	ggctccccgg	agagggggac	gacagaccga	aggctgggtga	16320

ES 2 312 780 T3

	ggggcggtgga	aaacgcgcca	ggctctgctg	cagggcaagg	gtccttgctg	tgacggggggc	16380
	agccgcctct	tgtcccgcg	gggtcgtgca	gactaccggc	cccctactgc	ccccacttc	16440
	ctcggaaccag	gggtgcccac	ctgagtcctt	gggggcaggg	gcgcctctcg	gctttgacga	16500
	cgcctccctc	cgtggggcca	ggtcgtccat	ccgcaacgtg	cacagcatcc	accagcggtc	16560
5	gcggaagcgc	ctcagccagg	acgcctatcg	ccgcaacagc	gtccgttttc	tgacgcagcg	16620
	acgccgccag	gcgcggccgg	gaccgcagag	ccccgggagc	ccgctcgggtg	agtgcagcgg	16680
	agagggcagg	aagggaagc	cgtagaggcg	gagtcagcgg	gagagggcgg	gccagaggtg	16740
	gggccagagt	agcggggcgg	gaccagaggg	cggaaacaga	gggagagggc	gggactggag	16800
	gcggggtcag	aggaggagcc	agcgcttagg	gggcgggagc	atccctaaga	ggcggagtca	16860
10	gagggagagg	cacaagcggg	aggcgaggcc	agagcgcgga	gcaggagtgtg	gagaccgcgg	16920
	cggggcgagg	ccagagagcg	ctgtggggcg	ggccagtgtg	cggggcgggg	cgtctgactc	16980
	ggccccgctc	tctgccccga	gagggaggagc	ggcagacgca	gcgctctaaa	ccgcagccgg	17040
	cgggtgcccc	gcggccgagc	gccgacctca	tcctgaaccg	ctgcagcagag	agcaccaagc	17100
	ggaagctggc	gtctgcccgc	tgaggctgga	gcgcagtcctc	cagctagcgt	ctcgggccctt	17160
15	gccgcccttg	ccgccccgtg	cctgtacata	cgtgttctat	agagcctggc	gtctggacgc	17220
	caggggcagc	cccgaacctt	gtccagcgcg	gctcccgcca	ccctcaataa	atgttgcttg	17280
	gagtggaata	aaaaaaaaaa	aa				17302
20							
25							
30							
35							
40							
45							
50							
55							
60							
65							