



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 906**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04819228 .0**

86 Fecha de presentación : **26.11.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1687441**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **Medios y métodos para la determinación de AMPc *in vitro*.**

30 Prioridad: **26.11.2003 EP 03027311**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **Bayerische
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Sanderring 2
97070 Würzburg, DE**

72 Inventor/es: **Nikolaev, Viacheslav;
Bünemann, Moritz y
Lohse, Martin, J.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para la determinación de AMPc *in vitro*.

La presente invención se refiere a un péptido quimérico, que comprende un grupo de unión a AMPc que tiene sólo un sitio de unión a AMPc y al menos dos marcadores detectables, por lo que el primero de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo carboxilo y el segundo de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo amino de dicho grupo de unión a AMPc. Dicho péptido quimérico de la invención es particularmente útil en/para la determinación directa de la(s) concentración(es) de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*. Además, se describen las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas quiméricas así como vectores y células huésped que comprenden las mismas. La presente invención también proporciona métodos para la producción de las proteínas quiméricas de la invención y métodos para la identificación y cribado de moléculas o compuestos que son capaces de modificar la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención o la función biológica y/o farmacológica de las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Además, se describe un método para la determinación de AMPc en una muestra y un método para la detección de AMPc en células vivas o tejidos. Finalmente, se divulga un kit que comprende los compuestos de la presente invención.

La señalización a través de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) puede producir muchas respuestas celulares, que varían desde la regulación de los niveles intracelulares de AMPc a la estimulación de la transcripción génica. Los miembros de esta familia de receptores se han agrupado en diferentes categorías dependiendo de los subtipos particulares de proteínas G con los que interactúan de forma predominante. Por ejemplo, los receptores que se acoplan a las proteínas G_s estimularán la adenilato ciclasa en muchas células, mientras que los receptores acoplados a G_{q/11} pueden movilizar el Ca²⁺ intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C. Los miembros de la familia de receptores de siete dominios transmembrana detectan una variedad de señales fisiológicas tales como neurotransmisores, hormonas y luz. Estos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) activan las proteínas G fomentando la unión de GTP en intercambio por GDP. Tanto las subunidades G α como las G $\beta\gamma$ de las proteínas G activadas pueden regular efectores posteriores tal como adenilato ciclasas, fosfolipasas o canales de iones.

Estudios de interrupción de genes han mostrado que las adenilato ciclasas estimuladas por Ca²⁺, AC1 y AC8 son críticas para algunas formas de plasticidad sináptica, incluyendo potenciación a largo plazo así como formación de memoria a largo plazo (LTM). Se hipotetiza que estas enzimas se requieren para la LTM para apoyar la expresión aumentada de una familia de genes regulada mediante la vía transcripcional AMPc/proteína de unión al elemento de respuesta de Ca²⁺/elemento de respuesta de AMPc. Por el contrario a AC1 y AC8, AC3 es una adenilato ciclasa inhibida por Ca²⁺ que tiene un papel esencial en la transducción de la señal olfativa. El acoplamiento de los receptores olfativos a AC3 estimula picos transitorios de AMPc que funcionan como el segundo mensajero principal en la señalización olfativa. Estos picos transitorios de AMPc están producidos, al menos en parte, mediante la inhibición por Ca²⁺ de la AC3, que está mediada mediante la proteína quinasa dependiente de calmodulina II. La estructura única y propiedades reguladoras de estas adenilato ciclasas las hacen sitios diana atractivos para drogas para la modulación de ciertos procesos fisiológicos incluyendo la formación de memoria y el olfato. (Hongbing Wang y Daniel R. Storm. Calmodulin-Regulated Adenylyl Cyclases: Cross-Talk and Plasticity in the Central Nervous System. Mol. Pharmacol. Vol. 63, Número 3, 463-468, Marzo 2003; Miles D. HOUSLAY y David R. ADAMS. PKA-mediated activation of PDE4, ERK mediated phosphorylation inhibits PDE4. Biochem. J. (2003) 370 (1-18); Donald H. Maurice, Daniel Palmer, Douglas G. Tilley, Heather A. Dunkerley, Stuart J. Netherton, Daniel R. Raymond, Hisham S. Elbatarny, y Sandra L. Jimmo. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. Mol Pharmacol 64: 533-546, 2003).

El AMP cíclico es un segundo mensajero intracelular ubicuo que transmite información a varias proteínas incluyendo los canales de iones operados por nucleótidos cíclicos, la proteína quinasa A (PKA) y EPAC. Sucesivamente, estos efectores regulan tal diversidad de funciones como la entrada de Ca²⁺, excitabilidad, y expresión génica, así como procesos específicos de células tal como glucogenolisis y lipólisis. Se han estudiado en detalle las enzimas que se sabe que regulan los niveles de AMPc, adenilato ciclasa y fosfodiesterasa (Hepler JR, Gilman A.G. G proteins. Trends Biochem Sci. Oct 1992; 17 (10): 383-7; Exton J.H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996; 36: 481-509; Beavo J.A., Brunton L.L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. Nat Rev Mol Cell Biol. Sep 2002; 3(9): 710-8; Ishikawa Y. Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. Cardiovasc. Pharmacol. 2003; 41: 1-4).

Aparte del calcio, se considera al AMPc como un mediador universal (segundo mensajero) para señales intracelulares de una variedad de receptor acoplados a proteínas G, que se sabe tienen un papel importante para procesos biológicos, tales como metabolismo, crecimiento y migración celulares, defensa inmune, o contracción de células de miocardio (McKnight G.S., Cummings D.E., Amieux P.S., Sikorski M.A., Brandon E.P., Planas J.V., Motamed K., Idzerda R.L. Recent Prog Horm Res. 1998; 53: 139-59; 160-1 ; Prasad K.N., Cole W.C., Yan X.D., Nahreini P., Kumar B., Hanson A., Prasad J.E. Defects in cAMP-pathway may initiate carcinogenesis in dividing nerve cells: A review. Apoptosis. Dic 2003; 8(6): 579-86; Torgersen K.M., Vang T., Abrahamsen H., Yaqub S., Tasken K. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. Cell Signal. Enero 2002; 14(1): 1-9; Bailey C.H., Bartsch D., Kandel E.R. Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci USA. 26 Nov 1996; 93(24): 13445-52; Wang H. y Storm D.R. Calmodulin-Regulated Adenylyl Cyclases: Cross-Talk and Plasticity in the Central Nervous System Mol. Pharmacol. Vol. 63, Número 3, 463-468, Marzo 2003 Evans D.B. Modulation of cAMP: mechanism for positive inotropic action. J Cardiovasc Pharmacol. 1986; 8 Supl 9: S22-9).

Hasta hace cinco años, se pensaba que la proteína quinasa A (PKA) era el único efector del AMPc. En 1998, se descubrió la familia de EPAC (factores de intercambios activados directamente por AMPc), los dominios de unión a AMPc de los cuales muestran un alto grado de homología con el dominio B de la subunidad reguladora de la PKA (de Rooij, J., *et al.*, EPAC is a RAP1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477 (1998)). En los últimos años, muchos de los efectos del AMPc que se habían considerado anteriormente dependiente de la PKA se podrían atribuir a la activación EPAC, lo que caracteriza a esta proteína como otra diana importante del AMPc en la célula (Bos, J.L., EPAC: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Molecule. Cell. Biol.* 4(9),733-738 (2003)). En enero de 2003, se publicó la estructura del dominio de unión a AMPc de EPAC2 (Rehmann, H. *et al.*, Structure and regulation of the cAMP binding domains of EPAC2. *Nat. Struct. Biol.* 10(1), 26-32 (2003)). Los datos cristalográficos sugieren un cambio marcado en la conformación dependiente de AMPc que se dice que lleva a un cambio en la distancia entre la hélice α 4 y 6:B.

Las proteínas EPAC se expresan en varios tejidos que incluyen cerebro, glándula suprarrenal, riñón, corazón, ovario, tiroides, bazo, médula espinal, pulmón, hígado y páncreas (Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D.E., Graybiel A.M. A family of CAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 18 Dic 1998; 82(5397): 2275-9; Ueno H., Shibasaki T., Iwanaga T., Takahashi K., Yokoyama Y., Liu L.M., Yokoi N., Ozaki N., Matsukura S., Yano H., Seino S. Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. *Genomics*. 2001 Nov; 78(1-2): 91-8).

Se ha encontrado que EPAC regula las proteínas integrinas que tienen un papel importante en la adhesión celular, por ejemplo de algunas células tumorales, células B y migración de linfocitos (Kinbara, K. *et al.*, Ras GTPase intergrins friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4(10), 767-776 (2003)). Además, la secreción de insulina por las células β del páncreas está dirigida por EPAC2 y canales sensibles a rianodina (Ozaki N., Shibasaki T., Kashima Y., Miki T., Takahashi K., Ueno H., Sunaga Y., Yano H., Matsuura Y., Iwanaga T., Takai Y., Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* Nov 2000; 2(11): 805-11; Kang G., Joseph J.W., Chepurny O.G., Monaco M., Wheeler M.B., Bos J.L., Schwede F., Genieser H.G., Holz G.G. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-CAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 7 Mar 2003; 278(10): 8279-85). Además, EPAC regula la cascada de ERK (quinasa regulada por señal extracelular) que es de particular importancia para la proliferación celular (Fujita T., Meguro T., Fukuyama R., Nakamuta H., Koida M. New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 21 Jun 2002; 277(25): 22191-200; Lin S.L., Johnson-Farley N.N., Lubinsky D.R., Cowen D.S. Coupling of neuronal 5-HT₇ receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J Neurochem.* Dic 2003; 87(5): 1076-85). Además, EPAC1 tiene un posible papel en mitosis (Qiao J., Mei F.C., Popov V.L., Vergara L.A., Cheng X. Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by CAMP. *J Biol Chem.* 19 Jul 2002; 277(29): 26581-6). Finalmente, la regulación de los canales de potasio en células de riñón también es una función importante de EPAC (Laroche-Joubert N., Marsy S., Michelet S., Imbert-Teboul M., Doucet A. Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I. *J Biol Chem.* 24 May 2002; 277(21): 18598-604).

En vista de la importancia del sistema de segundo mensajero del AMPc, se han desarrollado varias aproximaciones *in vitro* para determinar los niveles de AMPc. Algunos de estos ensayos son técnicas basadas en anticuerpos anti-AMPc, tal como el radioinmunoensayo (RIA) que es un método para la detección indirecta del AMPc (Kariv I.I., Stevens M.E., Behrens D.L., Oldenburg K.R. High Throughput Quantitation of cAMP Production Mediated by Activation of Seven Transmembrane Domain Receptors. *J Biomol Screen.* 1999; 4(1): 27-32.). Sin embargo, el RIA necesita mucho tiempo y requiere materiales radiactivos caros. Además, el RIA no es aplicable para el uso en células vivas y tejidos. También se han aplicado inmunoensayos de competición *in vitro* con anticuerpos anti-AMPc de alta afinidad para detectar o determinar AMPc (Golla R., Seethala R. A homogeneous enzyme fragment complementation cyclic AMP screen for GPCR agonists. *J Biomol Screen.* Dic 2002; 7(6): 515-25; Gabriel D., Vernier M., Pfeifer M.J. *et al.* High throughput Screening technologies for Direct cyclic AMP Measurements. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2003, 1(2): 291-303; Sportsman J.R., Daijo J., Gaudet E.A. Fluorescence polarization assays in signal transduction discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* May 2003; 6(3): 195-200). Este método comprende la adición de anticuerpos anti-AMPc a lisados celulares que contienen AMPc. La unión de anticuerpo anti-AMPc con AMPc bien produce una activación de una enzima que activa un compuesto fluorescente/ quimioluminiscente (por ejemplo ensayo cAMP-screenTM, Hit HunterTM Enzyme Fragment Complementation Assay, cyclic AMP EIA kit), degradación de un complejo fluorescente (Alpha screenTM Assay) o un cambio en la polarización de fluorescencia de marcadores marcados con fluorescencia (Fluorescent Polarization cAMP Assay) (Golla R., Seethala R. A homogeneous enzyme fragment complementation cyclic AMP screen for GPCR agonists. *J Biomol Screen.* Dic 2002; 7(6): 515-25; Gabriel D., Vernier M., Pfeifer M.J. *et al.* High throughput Screening technologies for Direct cyclic AMP Measurements. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2003, 1(2): 291-303; Sportsman J.R., Daijo J., Gaudet E.A. Fluorescence polarization assays in signal transduction discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* May 2003; 6(3): 195-200). Sin embargo, como se ha indicado, los métodos anteriores son solo adecuados para la detección de AMPc *in vitro*.

Para intentar establecer métodos que permitan determinar el AMPc *in vivo*, se han emprendido algunas aproximaciones limitadas para usar sistemas de ensayos basados en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) usando proteínas que unen AMPc, tal como la proteína del receptor bacteriano de AMPc o PKA. Estos siste-

mas usan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre proteínas fluorescentes (proteína fluorescente cian (CFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP)) insertadas en un fragmento de ADN que se asocia con las proteínas del receptor bacteriano de AMPc (*in vitro* Bridge IT Assay; <http://www.biocompare.com/itemdetails.asp?List=2263,173277>) o con proteína quinasa A (PKA) (Zaccolo *et al.*, Nat. Cell. Biol. 2000).

5 Sin embargo, hasta ahora es sólo el método con PKA descrito antes el que es capaz de detectar activación de la cascada de señales de AMPc en una célula viva. Discutido brevemente, se ha producido dicho sensor para AMPc uniendo genéticamente las subunidades catalíticas (C) de la PKA a GFP y la subunidad reguladora de la PKA (R) a la variante azul de GFP (EBFP). GFP y EBFP muestran características espectrales que las hacen un par adecuado para FRET. 10 Midiendo los cambios de FRET fue posible evaluar cambios en el AMPc en células individuales. Aunque esta nueva metodología es adecuada para el mapeo temporal y topográfico de la señalización AMPc/PKA, esta aproximación muestra algunos inconvenientes importantes. Por ejemplo, el sensor usado para el proceso de PKA posee actividad catalítica debido a las subunidades catalíticas de la PKA y, por lo tanto, interviene en varios procesos intracelulares. Por ejemplo, se ha observado inducción de apoptosis (Myklebust J.H., Josefsen D., Blomhoff H.K., Levy F.O., Naderi S., Reed J.C., Smeland E.B. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. J Cell Physiol. Jul 1999; 180(1): 71-80). De esta manera, muchas células no pueden tolerar el aumento en la actividad de la PKA e incluso mueren cuando la PKA se sobreexpresa. Además, está bien descrito en la técnica que la actividad catalítica de la PKA inicia la desensibilización mediada por PKA, que produce un descenso rápido en la concentración de AMPc (Houslay M.D., Adams D.R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. Biochem J. 15 Feb 2003; 370(Pt 1): 1-18; Conti M., Richter W., Mehats C., Livera G., Park J.Y., Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. J Biol Chem. 21 Feb 2003; 278(8): 5493-6; Kohout T.A., Lefkowitz R.J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. Mol Pharmacol. Ene 2003; 63(1): 9-18). Además, el sensor de PKA consiste en dos 25 proteínas relativamente grandes que se deben marcar individualmente. Dichas proteínas se tienen que expresar en concentraciones iguales para cuantificar las concentraciones de AMPc. Por último, la PKA contiene cuatro sitios de unión para AMPc con diferentes niveles de afinidad, en donde la unión de AMPc se da en una forma cooperativa compleja. De esta manera, debido a la unión cooperativa del AMPc, la cuantificación exacta de los niveles de AMPc es complicada. Además, los cuatro sitios de unión deben estar unidos a AMPc para activar el sensor de PKA, lo que 30 produce un retraso de la señal.

Debido a estas desventajas de los ensayos de AMPc descritos en la técnica, existe una necesidad para medios y métodos que proporcionen una nueva generación de sensores de AMPc que tengan propiedades mejoradas tal como sensibilidad, afinidad, y detectabilidad y que permitan la determinación óptica a tiempo real de AMPc *in vitro*. Tales 35 medidas no se han proporcionado todavía o no son accesibles en los métodos de la técnica anterior.

Este problema técnico se resuelve mediante la provisión de formas de realización como se caracterizan en las reivindicaciones.

40 De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un péptido quimérico, que comprende un grupo de unión a AMPc que tiene sólo un sitio de unión a AMPc y al menos dos marcadores detectables, donde un primer de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo carboxilo y un segundo de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo amino del grupo de unión a AMPc. El término "péptido quimérico" se refiere, según esta invención a una construcción de fusión proteínica que comprende un grupo de unión a AMPc y dos marcadores 45 detectables como se describe aquí. El péptido/construcción quimérico es particularmente útil en la determinación directa de la(s) concentración(es) de AMPc *in vitro*.

La unión de AMPc induce un cambio conformacional en los dominios de unión a AMPc de EPAC2 (Rehmann, H. *et al.*, Structure and regulation of the cAMP binding domains of EPAC2. Nat. Struct. Biol. 10(1), 26-32 (2003). 50 En base a esta indicación, los inventores han investigado si dicho cambio conformacional en los grupos de unión a AMPc se puede utilizar para producir una nueva generación de sensores de AMPc que tengan sensibilidad, afinidad, y detectabilidad mejoradas y que permita determinación óptica a tiempo real del AMPc *in vitro* y/o *in vivo*. Para este fin, se ha generado un nuevo sensor de AMPc monomolecular flanqueando los dominios de unión a AMPc con fluoróforos. Se sospechaba que tras la unión de AMPc, dicho cambio conformacional en el grupo de unión a AMPc debería inducir un cambio en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre los fluoróforos, es decir, FRET intramolecular. En una primera serie de experimentos, se han analizado péptidos quiméricos en los que tanto los dominios de unión a AMPc A como los B de la proteína quinasa A o de la EPAC2 estaban metidos entre dos variantes de la proteína fluorescente verde (EYFP y ECFP). Sin embargo, tras la activación de la señalización del AMPc o añadiendo AMPc, dichas construcciones fallaron en producir un cambio en FRET en células que expresaban 55 dichas construcciones. De forma sorprendente, y por el contrario a las enseñanzas de la técnica anterior, los péptidos quiméricos que contenían solo un sitio de unión a AMPc flanqueado por dos fluoróforos en los extremos C- y N- mostraron una pérdida rápida de FRET después de la estimulación de la vía del AMPc o la adición de AMPc, medido mediante fluorometría *in vitro*. Por consiguiente, después de haber optimizado la longitud de la secuencia sensora de AMPc y la posición de los fluoróforos, se han generado varias proteínas sensoras de AMPc muy sensibles para 60 aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, como se muestra en los siguientes ejemplos y figuras. Las construcciones fusión proporcionadas aquí (que comprende sólo un dominio individual de unión a AMPc con un sitio de unión a AMPc) son sensores de AMPc muy sensibles, que son particularmente útiles en la determinación de patrones espacio-temporales y/o reguladores de las respuestas de AMPc mediadas por receptor. Como se documenta posteriormente y en

particular en la Figura 1, dicho “dominio individual de unión a AMPc” también puede estar dividido/separado por uno de los al menos dos marcadores detectables; ver también las SEQ ID Nos. 14, 15 ó 20, etc. adjuntas. Las construcciones proporcionadas aquí, los “sensores de dominio individual”, demuestran una resolución temporal particularmente alta. Las construcciones se basan en un dominio de unión a AMPc individual (que comprende sólo un sitio de unión individual a AMPc) y revelan una velocidad de activación rápida y son, por lo tanto, adecuados para medir AMPc con dicha resolución espacial y temporal alta. Como se documenta con posterioridad, las construcciones inventivas son útiles en el estudio de procesos de regulación celular y de la función biológica del AMPc en células vivas. Un uso preferido particular de las construcciones químicas inventivas es la investigación farmacológica y/o aproximaciones de cribado de drogas.

Según se ilustra aquí, y en particular en los ejemplos y figuras, el término “grupo de unión a AMPc que tiene solo un sitio de unión a AMPc” se refiere a un grupo de unión a AMPc que es bastante pequeño (aproximadamente de 100 a 200 aminoácidos, preferiblemente alrededor de 120 a 200, lo más preferiblemente alrededor de 130 a 180 aminoácidos) y que comprende sólo un sitio de unión a AMPc (que comprende aproximadamente de 10 a 20 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 12 a 18 residuos de aminoácidos y particularmente preferido de 13 a 15 residuos de aminoácidos). También se prevé que el grupo de unión a AMPc comprendido en las construcciones inventivas comprende meramente una cantidad limitada y pequeña de residuos de aminoácidos adicionales además del sitio de unión a AMPc comprendido en el mismo. De acuerdo con esto, también un “grupo de AMPc” de alrededor de 20 residuos de aminoácidos, preferiblemente alrededor de 40 residuos de aminoácidos y lo más preferiblemente de alrededor de 50 residuos de aminoácidos también se prevé que según esta invención esté comprendido en las construcciones químicas que se proporcionan aquí. Las construcciones ilustrativas que se proporcionan en los ejemplos comprenden un “grupo/dominio de unión a AMPc” de alrededor de 130 hasta alrededor de 180 residuos de aminoácidos. Lo más importante, la construcción química tiene que comprender el “sitio de unión a AMPc” individual. De forma ilustrativa, la figura 14 muestra los dominios de unión a AMPc correspondientes que comprenden un sitio de unión a AMPc de los ejemplos ilustrativos.

De acuerdo con esto, el dominio de unión a AMPc empleado en un péptido/construcción química de la presente invención comprende sólo un sitio de unión a AMPc, que también es fácilmente detectable por el experto en la materia. Como se ha señalado anteriormente, un sitio de unión a AMPc preferido comprende de 10 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de 13 a 15 aminoácidos. Un ejemplo ilustrativo también se muestra en la Figura 14. Como se detalla más adelante, el experto en la materia puede utilizar técnicas para la deducción de los grupos de unión a AMPc y/o sitios de unión a AMPc que comprende el uso de programas informáticos (como TBLASTN) y ensayos bioquímicos/biológicos, como análisis de digestión con enzimas de restricción, ensayos de unión, ensayos de competición y similares.

En particular, se han generado nuevos sensores de AMPc que contienen un solo sitio de unión a AMPc en los que se insertaron los fluoróforos (variantes de GFP) en posiciones particulares de los dominios de unión a AMPc del ADNc de EPAC1 humana, EPAC2 murina o la subunidad reguladora II de la PKA murina. Para analizar la cinética de activación de estas nuevas proteínas sensoras de AMPc, se transfectaron de forma transitoria células que expresaban establemente el receptor A2B de adenosina, que se acopla a la proteína Gs y activa la producción de AMPc a través de la adenilato ciclasa, con plásmidos que codifican estas proteínas sensoras (Volpini R., Costanzi S., Vittori S., Cristalli G., Klotz K.N. Medicinal chemistry and pharmacology of A2B adenosine receptors. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3(4): 427-43). Después de la transfección, se midió la FRET en células vivas individuales como se describe en más detalle posteriormente. La adición de adenosina a las células dio como resultado el descenso en FRET entre los fluoróforos, lo que implica un cambio conformacional inducido por AMPc que lleva a un aumento en la distancia entre los fluoróforos.

Los fluoróforos, como las variantes de GFP muestran una estructura cilíndrica o tipo varilla de 30 Ångstrom y, de esta manera, se sabe que son proteínas relativamente grandes. Por lo tanto, se espera que flanquear el sitio de unión a AMPc individual mediante dos fluoróforos cubriría la superficie de dicho grupo de unión a AMPc, previniendo de esta manera la interacción con el AMPc. Aquí, se encontró de forma sorprendente que el uso de dos análogos de GFP o fluoróforos no constreñía o alteraba el grupo de unión a AMPc. Inesperadamente, el grupo era todavía funcional e incluso proporciona un sistema de prueba en donde los movimientos intramoleculares se pueden evaluar en el intervalo de milisegundos. Por lo tanto, se encontró de forma sorprendente que a pesar del hecho de que el tamaño de incluso una variante de GFP (diámetro de 30 Ångstrom; Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67: 509-544) puede cubrir el grupo de unión a AMPc dicho grupo de unión a AMPc fusionado a dos variantes de GFP todavía es capaz de unirse a AMPc. De acuerdo con esto, no se podría haber esperado que la preparación del péptido químico como se describe aquí proporciona una herramienta de cinética rápida, funcional y fiable para medidas directas de AMPc *in vitro*.

Según lo anterior, los marcadores detectables presentes en el péptido químico de la invención facilitan la detección de un cambio conformacional en el péptido químico de la invención tras la unión de AMPc, que, sucesivamente, produce un cambio de la energía emitida por los marcadores detectables. De esta manera, el péptido químico de la invención proporciona una herramienta monomolecular particularmente viable para determinar directamente los niveles de AMPc *in vitro*, por ejemplo en un lisado celular. Por ejemplo, el péptido químico como se ha definido anteriormente, se puede añadir a un lisado celular y registrando la FRET o BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia), se puede medir la concentración de AMPc en dicha muestra comparando los valores de la emisión de fluorescencia con una curva patrón obtenida con concentraciones definidas de AMPc como se explica en más detalle posteriormente. La presente invención también proporciona una técnica basada en fluorescencia gene-

ralmente aplicable para evaluar a tiempo real el AMPc en células vivas individuales o incluso en tejidos. Además, la presente invención proporciona métodos para la identificación y cribado de moléculas o compuestos que son capaces de modificar la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención o la función biológica y/o farmacológica de las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas como se explica más adelante.

Particularmente, los inventores desarrollaron una proteína quimérica para la determinación óptica del AMPc que supera los inconvenientes de los ensayos de AMPc y sistemas de detección descritos en la técnica anterior.

Primero, y como se ha discutido anteriormente, el péptido quimérico de la invención es relativamente corto y no contiene actividad catalítica o sitio(s) de unión a otras moléculas, excepto para AMPc. Por lo tanto, la proteína no interfiere con otros procesos intracelulares tal como la desensibilización o fosforilación de otras proteínas. Como se ilustra en los ejemplos y figuras, las construcciones de la presente invención comprenden un dominio de unión a AMPc, que comprende aproximadamente de 100 a 200 residuos de aminoácidos y que tiene sólo un sitio de unión a AMPc que comprende entre 10 y 20, preferiblemente de 13 a 15 y lo más preferible 14 residuos de aminoácidos.

Segundo, en contraste con el sistema de la PKA (Zaccolo *et al.*, loc. cit), la proteína quimérica de la invención es un sistema monomolecular que se puede expresar fácilmente en células vivas.

Tercero, el péptido quimérico de la presente invención contiene un solo sitio de unión a AMPc de alta afinidad, que permite la determinación directa del AMPc *in vitro*. Una consecuencia más del sitio individual de unión a AMPc es que la cinética de la detección de AMPc es mucho más rápida que en sistemas de detección de AMPc previamente disponibles descritos en la técnica. Como se demuestra en los siguientes ejemplos, la cinética de activación de las proteínas sensoras de AMPc basadas en un dominio único de unión de EPAC2 comparada con la del sensor de PKA previamente descrita (Zaccolo *et al.*, Nat. Cell. Biol., 2000) revela que el nuevo sensor de EPAC2 muestra una señal de activación más rápida. Esto se debe posiblemente a la presencia de un solo dominio de unión a AMPc de alta afinidad y a la ausencia de actividad catalítica (inducción de la desensibilización a través de la activación de la fosfodiesterasa) del péptido quimérico de la invención. En comparación, la PKA tiene 4 sitios de unión que actúan de forma cooperativa y muestra propiedades de activación de la fosfodiesterasa.

Cuarto, la proteína quimérica de la invención permite detección de AMPc a tiempo real *in vitro* sin usar compuestos radiactivos.

La “transferencia de energía por resonancia (RET)” como se usa aquí se refiere a transferencia no radiactiva de energía de excitación desde una molécula donante (primera parte de detección) hasta una aceptora (segunda parte de detección). El cambio conformacional del grupo de unión a AMPc tras la unión de AMPc da como resultado un cambio detectable de RET entre las partes de detección. Si, por ejemplo, la RET aumenta, el pico de emisión del aceptor sube y el pico de emisión del donante disminuye. De esta manera, la razón de la intensidad de emisión del aceptor a la del donante es indicativa del grado de RET entre las partes de detección. El cambio conformacional del péptido quimérico de la invención tras la unión de AMPc puede producir bien un descenso bien un aumento de la distancia entre las partes de detección.

El término “quimérico” como se define aquí se refiere a una molécula que contiene secuencias de dos, tres o más genes diferentes, que pueden derivar de una, dos, tres o más especies diferentes.

El término “péptido” como se usa aquí se refiere a un polipéptido o proteína que puede estar compuesto de aminoácidos unidos unos a otros mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, péptidos isómeros y pueden contener aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos se pueden modificar bien mediante procesos naturales, tal como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden suceder en cualquier lugar del polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o grado variable en varios sitios en un polipéptido determinado. Además, un polipéptido determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados, y ramificados cíclicos pueden ser el resultado de procesos postraduccionales naturales o se pueden hacer mediante métodos de síntesis. Las modificaciones incluyen, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un anclaje por GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación. (Ver, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pags. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992).).

El término “péptido quimérico” como se usa aquí se refiere a las construcciones de polipéptidos o proteínas que son el resultado de combinar proteínas múltiples, dominios de proteínas y/o secuencias enlazadoras como se explica en más detalle con posterioridad. Esto se puede alcanzar mediante clonación molecular de las secuencias de nucleótidos que codifican tales dominios para producir una nueva secuencia de polinucleótidos que codifica el nuevo péptido quimérico como se usa aquí. De forma alternativa, la creación de un péptido quimérico se puede alcanzar uniendo químicamente dos o más proteínas.

Particularmente, el término “péptido quimérico” como se define aquí puede comprender la estructura A-B-C en donde A representa un primer marcador detectable, B representa un grupo de unión a AMPc que tiene un solo sitio de unión a AMPc, y C represente un segundo marcador detectable. Por ejemplo, el grupo de unión a AMPc puede ser de la subunidad reguladora (R) de una proteína quinasa dependiente de AMPc (tal como la PKA), un factor de intercambio nucleótidos de guanina (por ejemplo EPAC), una proteína activadora de un gen catabólico de *E. coli*, un canal de iones operado por AMPc, un canal operado por nucleótidos cíclicos (por ejemplo HCN), la esterasa diana de neuropatía (NTE) o el receptor de AMPc de Dictyostelium. Preferiblemente, la proteína quinasa dependiente de AMPc es PKA, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina es EPAC1 o EPAC2, el canal operado por nucleótido cíclico es HCN2 (canal de K⁺ activado por hiperpolarización, operado por nucleótidos cíclicos), la proteína activadora del gen catabólico deriva de *E. coli*, el canal de iones operado por AMPc es de origen humano, la esterasa diana de neuropatía (NTE) es de origen humano y el receptor de AMPc es de Dictyostelium. Se pueden usar, para la PKA las subunidades reguladoras de PKAIIalfa-A ó B; PKAIIbeta A ó B; PKAIIalfa A ó B, ó PKAIIbeta A ó B. Incluso más preferiblemente, PKA, EPAC1 o EPAC2 son de origen humano, de ratón o rata.

Un grupo o dominio de unión a AMPc como se usa aquí se refiere a un dominio/grupo de unión a AMPc que contiene bien solo el sitio único de unión a AMPc (casete) o el sitio único de unión a AMPc (casete) más secuencias adicionales adyacentes tal como hélices alfa como se ejemplifica en las siguientes figuras. El grupo de unión a AMPc como se usa aquí preferiblemente corresponde a las secuencias de aminoácidos mostradas en las siguientes secuencias de las lista de secuencias: residuos de aminoácidos 281-445, o preferiblemente 284 a 443 de EPAC2 (dominio B) (SEQ ID NO: 3), residuos de aminoácidos 203-323, o preferiblemente 157 a 316 de EPAC1 (SEQ ID NO: 2), residuos de aminoácidos 274-416, o preferiblemente 255 a 416 o preferiblemente 264 a 416 de la subunidad reguladora II beta de la PKA (SEQ ID NO: 1), residuos de aminoácidos 544-661 del canal de potasio 2 operado por cíclico (SEQ ID NO: 4), residuos de aminoácidos 12-98 de la proteína activadora de gen de catabolito (SEQ ID NO: 6), residuos de aminoácidos 473-568 de la esterasa diana de neuropatía (SEQ ID NO: 7), residuos de aminoácidos 628-767 del canal de cationes 4 operado por nucleótidos cíclicos (CNG) (SEQ ID NO: 5) o residuos de aminoácidos 467 a 638, ó 497 a 638, ó 523 a 638, ó 517 a 625 del canal de K⁺ 2 activado por hiperpolarización, operado por nucleótidos cíclicos (HCN2; SEQ ID NO: 72).

El sitio de unión de AMPc como se usa aquí se puede deducir fácilmente por el experto en la materia y corresponde preferiblemente a los residuos de aminoácidos 403-417 de EPAC2 (NP 062662), residuos de aminoácidos 258-285, preferiblemente 268 a 281 de EPAC1 (O95398), residuos de aminoácidos 348-362 de la subunidad reguladora II beta de la PKA (P12369), residuos de aminoácidos 607-621 del canal de potasio 2 operado por cíclico (Q9UL51), residuos de aminoácidos 71-86 de la proteína activadora del gen de catabolito (AAN82570), residuos de aminoácidos 649-663 la esterasa diana de neuropatía (AAH50553), o residuos de aminoácidos 580 a 593 de HCN2 (NP_032252). Se proporcionan las construcciones/péptidos quiméricos preferidos correspondientes de la invención como ejemplos ilustrativos en la figura 1 o la figura 11 adjuntas. Las construcciones como se muestran en la figura 1 también se proporcionan en SEQ ID Nos: 8 a 20. Las construcciones como se proporcionan en la figura 11 (que se refieren a los ejemplos ilustrativos que comprenden el grupo/dominio de unión de AMPc de HCN2) también se proporcionan mediante las secuencias codificantes (SEQ ID Nos. 66, 68 y 70) y sus secuencias de aminoácidos correspondientes mostradas en SEQ ID Nos: 67, 69 y 71. Se define un polipéptido HCN2 (de ratón) en SEQ ID NO: 74. El experto en la materia fácilmente puede deducir el dominio de unión de AMPc (que tiene un solo sitio de unión de AMPc) a partir de la información dada aquí. De acuerdo con esto, los dominios de unión a AMPc en el sentido de esta invención pueden comprender el tramo de aminoácidos L219 a F300 de EPAC1 (como se muestra en SEQ ID NO: 27, codificado, entre otros, por SEQ ID NO: 26), el tramo de aminoácidos L354 a F435 de Epac2 (como se muestra en SEQ ID NO: 29, codificado, entre otros, por SEQ ID NO: 28), el tramo de aminoácidos I290 a F379 de PKA (como se muestra en SEQ ID NO: 31, codificado, entre otros, por SEQ ID NO: 30), o el tramo de aminoácidos L533 a I636 de HCN2 (como se muestra en SEQ ID NO: 33, codificado, entre otros, por SEQ ID NO: 32). Los grupos de unión a AMPc correspondientes se ilustran también y adicionalmente en las figuras adjuntas 1 y 14.

Además, los dominios de unión a AMPc según esta invención también ilustrados esquemáticamente en las figuras 1 y 11 también están comprendidos en las secuencias adjuntadas aquí, como SEQ ID Nos: 8 a 20, o en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73.

Las construcciones quiméricas particularmente preferidas de la presente invención son construcciones, en donde el grupo de unión a AMPc se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un grupo de unión a AMPc de un polipéptido mostrado (y comprendido) en SEQ ID Nos: 1 a 7 y 74;
- (b) un grupo de unión a AMPc mostrado o comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36 y 37;

ES 2 305 906 T3

- (c) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 8 a 20;
- (d) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73; y
- (e) un grupo de unión a AMPc que es al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idéntico a un grupo de unión a AMPc según se ha definido aquí o al grupo de unión a AMPc de (a) a (d).

El péptido quimérico inventivo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

- (a) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 70 y 72;
- (b) un péptido quimérico que comprende una secuencia mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 (correspondiente a SEQ ID NO: 73), 67, 69, 71 y 73;
- (c) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos el 70% idéntico a un polipéptido como se define en (a) ó (b) y que se puede usar para la determinación directa de la concentración de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*, y
- (d) un péptido quimérico que está codificado por una molécula de ácido nucleico que es degenerada a una secuencia de ADN como se define en (a) y (c).

También se documentan los péptidos/construcciones quiméricos ilustrativos ejemplificados de la invención como se muestran en las figuras 1 y 11 en el protocolo de secuencias adjuntas. De acuerdo con esto, SEQ ID NO: 8 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a E443). SEQ ID NO: 9 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E292 a E443). SEQ ID NO: 10 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos M304 a E443). SEQ ID NO: 11 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos M310 a E443). SEQ ID NO: 12 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a Q454). SEQ ID NO: 13 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a E460). SEQ ID NO: 16 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (también comprende el anclaje a la membrana; aminoácidos E285 a E443; ver también SEQ ID NO: 57). SEQ ID NO: 17 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC1 (aminoácidos E157 a E316). SEQ ID NO: 18 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de PKA (RII beta) (aminoácidos M264 a A416, HA; ver también SEQ ID NO: 63). SEQ ID NO: 19 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de PKA (RII beta) (aminoácidos M264 a A403, sin HA; ver también SEQ ID NO: 59). SEQ ID NO: 39 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC1 (aminoácidos E157 a E316). SEQ ID NO: 41 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a E443; ver también SEQ ID NO: 8). SEQ ID NO: 43 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E292 a E443; ver también SEQ ID NO: 9). SEQ ID NO: 45 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E304 a E443; ver también SEQ ID NO: 10). SEQ ID NO: 47 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos M310 a E443; ver también SEQ ID NO: 11). SEQ ID NO: 49 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a Q454; ver también SEQ ID NO: 12). SEQ ID NO: 51 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de EPAC2 (aminoácidos E285 a E460; ver también SEQ ID NO: 13). SEQ ID NO: 61 se refiere a una construcción quimérica según esta invención que comprende un grupo de unión a AMPc que comprende un solo sitio de unión a AMPc y que está derivado de PKA (aminoácidos V255 a A416 y antígeno de hemaglutinina (HA)).

SEQ ID Nos: 14, 15, 20, 53, 55, 65 (que es la misma que la 73) son construcciones según esta invención, donde uno de los marcadores detectables está situado entre el extremo carboxilo y el extremo amino del grupo/dominio

de unión a AMPc que tiene un solo sitio de unión a AMPc. Dichas construcciones comprenden además residuos de aminoácidos del grupo/domino de unión a AMPc sin un sitio de unión a AMPc en el extremo carboxi terminal (ver también la figura 1). De acuerdo con esto, la construcción quimérica de la presente invención también comprende construcciones donde uno de los al menos dos marcadores detectables se intercala/inserta en dicho grupo/domino de unión a AMPc. Ejemplos no limitantes son las construcciones enumeradas anteriormente mostradas en SEQ ID Nos: 14, 15, 20, 53, 55, 65 (que es la misma que la 73). De acuerdo con esto, SEQ ID NO: 14 y 53 describen una construcción que comprende un dominio/grupo de unión a AMPc de EPAC2 con solo sitio de unión a AMPc en el formato E285 a I388 (marcador detectable EYFP) - G390 a E443 - (marcador detectable ECFP). SEQ ID NO: 15 y 55 describen una construcción que comprende un dominio/grupo de unión a AMPc de EPAC2 con solo sitio de unión a AMPc en el formato E285 a I388 (marcador detectable EYFP) - G390 a E460 - (marcador detectable ECFP). SEQ ID NO: 20 describen una construcción que comprende un dominio/grupo de unión a AMPc de PKA con solo sitio de unión a AMPc en el formato M264 a I331 (marcador detectable EYFP) - E333 a A403 - (marcador detectable ECFP). SEQ ID NO: 65 y 73 describen una construcción que comprende un dominio/grupo de unión a AMPc de PKA con solo sitio de unión a AMPc en el formato V255 a I331 (marcador detectable EYFP) - E333 a A403 - (marcador detectable ECFP).

La fusión entre las partes/casetes enumeradas anteriormente A, B y C no necesita necesariamente ser directa, sino que puede suceder por medio de secuencias enlazadoras. Según esto, el péptido quimérico también puede tener la estructura A-D-B-C, A-B-E-C ó A-D-B-E-C, en donde D y E representan un enlazador situado entre el marcador detectable y el grupo de unión a AMPc. El término “enlazador” o “secuencia enlazadora” como se usa aquí se refiere a secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que se usan en la construcción del péptido quimérico de la invención. Las funciones de un región enlazadora pueden incluir la introducción de sitios de clonación en la secuencia de nucleótidos, introducción de un componente flexible o región que crea espacio entre dos dominios de proteína, o la creación de un etiqueta de afinidad para una interacción específica de moléculas. Una región enlazadora se puede introducir en el péptido quimérico como resultado de las elecciones hechas durante la construcción de la secuencia de polipéptido o nucleótido. Dicho enlazador como se usa aquí puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30, o incluso 50 residuos de aminoácidos de longitud, en donde las secuencias enlazadoras D y E pueden tener o no la misma longitud. Preferiblemente, los enlazadores cortos consisten en 1, 2, 3, 4, ó 5 residuos de aminoácidos. El péptido quimérico como se usa aquí también puede ser manipulado para mejorar las características del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N o al extremo C del péptido quimérico para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación a partir de la célula huésped o el posterior manejo y almacenamiento. Además, se pueden añadir grupos peptídicos al péptido quimérico para facilitar la purificación. Tales regiones se pueden eliminar antes de la preparación final del polipéptido. La adición de grupos peptídicos, también denominados “etiquetas”, para facilitar el manejo de los polipéptidos son métodos familiares y rutinarios en la técnica. El término “etiqueta” como se usa aquí se refiere a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, que facilita el aislamiento, purificación y/o detección del péptido quimérico como se usa aquí que contiene la etiqueta. Los expertos en la materia conocen una gran variedad de tales etiquetas, y son adecuadas para el péptido quimérico, métodos o usos de la presente invención. Las etiquetas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, péptido HA, péptidos de polihistidina, biotina/avidina, etiqueta flag u otros sitios de unión a epítopos de anticuerpos. Por ejemplo, la secuencia marcadora de aminoácidos puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Eton Avenue 9259, Chatsworth, CA, 91311), que, entre otros, están disponibles comercialmente. Como se describe en Genz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona medios para una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta peptídica útil para la purificación, la etiqueta “HA”, corresponde a un epítipo derivado de la proteína de la gripe hemaglutinina. (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984). De forma alternativa, el péptido quimérico de la invención se puede fusionar con el dominio constante de las inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o partes de las mismas (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de las mismas). Además, el péptido quimérico como se usa aquí se puede dirigir a lugares celulares específicos, es decir compartimentos particulares de las células, en base a señales de direccionamiento. El péptido quimérico se puede expresar como una proteína soluble en el citoplasma de una célula, o se puede insertar en una membrana biológica de la célula y/o membrana artificial, como una membrana celular, una preparación cruda de membrana, liposomas así como membranas artificiales que comprenden micelas, monocapas de lípidos o bicapas de lípidos. Por ejemplo, el péptido quimérico como se ha definido aquí se puede localizar en las membranas celulares, por ejemplo, membranas de células cultivadas o membranas de oocitos. El péptido quimérico también puede ser dirigido a otros compartimentos particulares de la célula tal como el núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico, cloroplastos o similares, por ejemplo usando secuencias señal o señales de localización, tal como secuencias de localización nuclear o secuencias de localización que tienen como diana el aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, o citoesqueleto. Estas están bien descritas en la técnica.

Como se detalla más adelante, también se prevé que el péptido quimérico de la invención se exprese en animales transgénicos no humanos. Según esto, también las células, tejidos y órganos de dichos animales transgénicos no humanos pueden expresar el péptido quimérico de la presente invención y pueden ser en particular útiles en el cribado de drogas como se explica en detalle posteriormente.

El péptido quimérico como se usa aquí se puede producir de forma recombinante mediante métodos conocidos en la técnica; ver, entre otros, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001. Además, el péptido quimérico de la invención se puede sintetizar de forma química usando métodos conocidos en la técnica.

El término “y/o” dondequiera que se use aquí incluye el significado de “y”, “o” todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados mediante dicho término.

El término “membrana” como se usa aquí se refiere a membranas naturales así como a membranas artificiales. Preferiblemente, las membranas consisten en bicapas de lípidos. Como se ha señalado anteriormente, ejemplos específicos son membranas celulares y biomembranas, como la membrana plasmática de las células, el retículo endoplásmico, membranas mitocondriales, vesículas del golgi, lisosomas, peroxisomas, pero también membranas celulares de células vegetales, como membranas de los cloroplastos u otros orgánulos así como vacuolas. La membrana celular o biomembrana en la que se inserta el péptido quimérico de la invención es la membrana plasmática de una célula animal, más preferiblemente una célula de mamífero, pero también de células de anfibios, como oocitos de rana. Es más, como también se ha discutido aquí, las preparaciones de membrana, como preparaciones crudas de membrana o liposomas se conciben como “membranas” en donde se inserta el péptido quimérico de la presente invención.

El término “al menos dos marcadores detectables” como se usa aquí significa que el péptido quimérico de la invención puede comprender, dos, tres, cuatro, cinco o más marcadores detectables, lo más preferido, sin embargo, son construcciones que comprenden dos marcadores detectables. Los marcadores detectables se detallarán aquí más adelante y pueden, en particular comprender fluoróforos así como sustancias bioluminiscentes. Según los ejemplos adjuntos, sin embargo, lo más preferido son dos marcadores detectables en un péptido quimérico de la invención.

El término “dicho marcador está situado en” como se emplea aquí significa que el marcador está dispuesto bien el extremo carboxi o en el amino del grupo de unión a AMPc. Como ya se ha indicado anteriormente, la fusión puede ser directa o a través de un enlazador intermedio y también se concibe y se documenta aquí que al menos uno de dichos al menos dos marcadores detectables está situado dentro de los grupos de unión a AMPc (intercalado o insertado en dicho grupo de unión a AMPc). Se dan ejemplos correspondientes, entre otros, en SEQ ID Nos: 14 (también 53), 15 (también 55), 20 y 65 (también 73) y se ilustran en la figura 1.

En lo que respecta a la inserción de marcadores detectables, es evidente para el experto en la materia que dichas inserciones pueden ser variables. Es más, se debe advertir que las inserciones del marcador detectable puede producir delección/reemplazo de aminoácidos naturales en el grupo de unión a AMPc, sin embargo, sin afectar la unión de AMPc al sitio de unión de AMPc.

Los términos “amino terminal” y “carboxi terminal” como se usan aquí se refiere al extremo amino terminal y carboxi terminal del grupo de unión a AMPc del péptido quimérico de la invención o (donde se indique explícitamente) del péptido quimérico de la invención.

Los marcadores detectables a introducir en el péptido quimérico de la presente invención son preferiblemente marcadores fluorescentes o marcadores bioluminiscentes. Los marcadores detectables también comprenden fluoróforos codificados genéticamente así como fluoróforos sintéticos que se unen específicamente a un sitio codificado y modificado genéticamente (tecnología Flash; ver, en otros, Adams (2002), J. Am. Chem. Soc. 124, 6063-6076 o Griffin (2000), Meth. Enzym. 327, 565-578).

Como se discute aquí, las construcciones inventivas son particularmente útiles en la determinación directa de la concentración de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*. De acuerdo con esto, las partes/marcadores de detección presentes en el péptido quimérico de la invención facilitan la detección de un cambio conformacional en el péptido quimérico de la invención tras la unión de AMPc, que, sucesivamente, es indicativo de un cambio de la energía emitida por las partes de detección/marcadores detectables. Según esto, el término “determinación directa de la concentración de AMPc” se refiere al hecho de que el péptido quimérico de la invención proporciona una herramienta monomolecular particularmente viable de determinar directamente los niveles de AMPc en una muestra. Por ejemplo, se puede añadir el péptido quimérico como se ha definido anteriormente, a una muestra y midiendo y/o registrando la FRET o BRET se puede medir la concentración de AMPc en la muestra comparando los valores de la emisión de fluorescencia con una curva patrón obtenida con concentraciones definidas de AMPc. Los “indicadores quiméricos” proporcionados en esta invención se pueden aplicar de forma ubicua para estudiar, por ejemplo, AMPc, su papel fisiológico así como las regulaciones espacio-temporales.

El término “determinación directa” como se usa aquí indica que el AMPc se une directamente al sitio de unión de AMPc de la proteína quimérica de la invención que produce entonces una señal detectable. De esta manera, y en contraste con la técnica anterior, sólo se necesita una proteína para detectar AMPc *in vivo* o para determinar la concentración de AMPc *in vitro*, sin necesidad de cualquier herramienta más tal como proteínas auxiliares, anticuerpos, marcadores, indicadores o similares. En este contexto hay que hacer notar que los sensores de AMPc de la técnica anterior confían en las interacciones dependientes de AMPc entre/de dos proteínas.

La muestra como se define aquí puede ser por ejemplo una célula, un lisado celular, un extracto celular crudo, una preparación de membrana, un tejido o fluidos biológicos. Los fluidos biológicos como se usa aquí se refieren preferiblemente a fluidos corporales tales como semen, linfa, suero, plasma, orina, líquido sinovial o líquido raquídeo.

Además, el péptido quimérico de la invención se puede usar para evaluar en espacio y tiempo la cantidad, distribución, localización o fluctuación de AMPc en una célula viva o tejido. Por ejemplo, se puede transfectar o transformar

una célula o tejido con el ácido nucleico o vector de la invención y se puede medir/registrar la FRET o BRET de la célula viva o tejido.

En una forma de realización del péptido quimérico de la invención, estos marcadores de detección son partes de una proteína de fluorescencia dividida. Preferiblemente, estas partes fluorescentes divididas es una proteína verde fluorescente dividida (GFP dividida). El término “proteína verde fluorescente” o “GFP” como se usa a lo largo de la presente solicitud se refiere a la GFP inicialmente clonada por Prasher (Gene 111 (1992), 229-233) de *Aequorea victoria* y mutantes de la misma que muestran actividad GFP. El término “actividad GFP” se refiere a las propiedades conocidas de un GFP, es decir emisión de fluorescencia tras la excitación por una luz adecuada, la capacidad de maduración autocatalítica que implica plegamiento en una estructura terciaria y la formación del cromóforo y la independencia de cualquier cofactor o suministro de energía metabólica para llevar a cabo la fluorescencia así como la maduración autocatalítica. Estas propiedades son bien conocidas en la técnica y están revisadas por ejemplo por Tsien (Ann. Rev. Biochem. 67 (1998), 509-544). Para los fines de la presente invención, a menos que se especifique de otra manera, cualquier longitud de onda de emisión detectable de un mutante de GFP puede ser útil para aplicar el péptido quimérico de la invención. En la técnica anterior, se describen muchos mutantes de GFP, en donde se sustituyen residuos de aminoácidos específicos con el efecto de una eficacia de fluorescencia mejorada y/o una longitud de onda de excitación y/o emisión cambiada (ver, por ejemplo, Heim, Methods Enzymol. 302 (1999), 408-423; Heikal *et al.*, PNAS 97 (2000), 11996-12001). Particularmente, la mutación de la glutamina en posición 69 a metionina puede reducir el pH intrínseco y la sensibilidad a haluros de eYFP (Griesbeck *et al.*, J. Biol. Chem. (2001) 276, 29188-29194). De esta manera, si se usa eYFP, o un derivado de la misma que tiene sustancialmente el mismo espectro de excitación y emisión, como una parte de detección de la proteína de fusión de la invención, se prefiere que la eYFP o derivada de la misma muestre esta mutación. Así, como se muestra en los ejemplos adjuntos, YFP también es útil según esta invención. Los ejemplos de mutantes de GFP útiles para aplicar la invención incluyen proteína amarilla fluorescente (mejorada) ((e)YFP), proteína cian fluorescente (mejorada) ((e)CFP), proteína azul fluorescente (mejorada) ((e)BFP), proteína verde fluorescente (mejorada) ((e)GFP), DsRED, citrina y Zafiro. Se puede usar cualquier mutante de GFP o análogo funcional de GFP, mientras muestre actividad fluorescente, dentro del ámbito de la presente invención. Preferiblemente, tales variantes/mutantes de GFP están codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida, preferiblemente en condiciones rigurosas, con la secuencia de nucleótidos que codifican la GFP salvaje, o con los polinucleótidos que codifican variantes/mutantes según la secuencia representada en SEQ ID NOS: 23 y 24. Estos mutantes/variantes de GFP que muestran la secuencia de polipéptidos representada en SEQ ID NOS: 21 y 22 se refieren a las variantes de GFP más preferidas para ser empleadas en esta invención, es decir proteína cian fluorescente mejorada (eCFP) y proteína amarilla fluorescente (YFP). Las condiciones de hibridación adecuadas preferidas y los valores de identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos que codifican un mutante de GFP que hibridan se mencionan más adelante.

En este contexto, el término “hibridación” significa hibridación en condiciones convencionales de hibridación. Pueden ser poco rigurosas, preferiblemente condiciones de hibridación rigurosas (es decir, muy rigurosas), como se describe por ejemplo en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, loc. cit. En una forma de realización especialmente preferida el término “hibridación” significa que la hibridación sucede en “condiciones rigurosas de hibridación” que se refiere a una incubación durante la noche a 42 grados C en una solución que comprende formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6) solución de Denhardt 5X, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado 20 µg/ml, seguido por lavado de los filtros en SSC 0,1x a alrededor de 65 grados C.

El término “proteína fluorescente dividida” se refiere a una proteína fluorescente cuya secuencia de aminoácidos está dividida en dos partes, donde tras una unión espacial secundaria de estas partes, la proteína fluorescente dividida adopta una estructura tridimensional que la permite emitir fluorescencia cuando es excitada por luz de la longitud de onda adecuada. Se contempla por ejemplo que la proteína fluorescente dividida es una GFP dividida, como se ha descrito en Baird (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 11241-11246). Según las enseñanzas de la técnica anterior, es posible para el experto en la materia dividir una GFP en dos partes GFP divididas para fusionarlas al péptido quimérico de la invención. Además es concebible que otras proteínas fluorescentes diferentes de GFP, por ejemplo las mencionadas infra, se puedan dividir para constituir dos partes de detección de la misma manera que la GFP dividida descrita aquí.

En otra forma de realización de la presente invención, el primer marcador de detección es una parte de proteína que emite energía y la segunda parte de detección es un marcador de proteína fluorescente o viceversa. En relación con esta forma de realización, no es importante en qué parte del péptido quimérico está situada la primera parte de detección con respecto a la otra parte definida aquí, es decir si dicho marcador de detección está situado en el extremo N- o el C- del grupo de unión a AMPc del péptido quimérico de la invención, fusionado directamente o a través de un enlazador como se ha explicado anteriormente. Como se ha discutido antes, uno de los marcadores de detección también puede estar situado dentro del dominio/grupo de unión a AMPc como se ha descrito aquí; ver, por ejemplo los ejemplos dados en la figura 1 o las secuencias proporcionadas, entre otras, en SEQ ID Nos: 14, 15 ó 20. El término “parte de la proteína que emite energía” se refiere a proteínas capaces de emitir energía radiactiva que puede (i) absorber energía en una forma adecuada y (ii) transmitir al menos parte de esta energía mediante transferencia de energía por resonancia (RET) al segundo marcador de detección que es una parte de proteína fluorescente de este modo inducida a la emisión de energía. La forma de absorción de energía puede ser cualquiera que sea concebible al experto en la materia y puede implicar, por ejemplo, una reacción química (quimioluminiscencia o bioluminiscencia) o absorción de radiación (fluorescencia o fosforescencia).

El término “parte de proteína fluorescente” se refiere a proteínas que son capaces de fluorescencia, es decir de absorber energía de radiación de una cierta longitud de onda, por ejemplo luz ultravioleta o visible, y emitir esta energía o una parte de la misma mediante radiación, en donde la radiación emitida tiene una longitud de onda mayor que la radiación inductora. Existen muchos ejemplos de proteínas fluorescentes descritas en la bibliografía que pueden ser útiles en relación con la presente invención tal como las GFPs mencionadas antes, proteínas fluorescentes de organismos no bioluminiscentes de la clase Anthozoa (WO 00/34318, WO 00/34319, WO 00/34320, WO 00/34321, WO 00/34322, WO 00/34323, WO 00/34324, WO 00/34325, WO 00/34326, WO 00/34526) o la proteína fluorescente bmFP de *Photobacterium phosphoreum* (Karatani, Photochem. Photobiol. 71 (2000), 230). Preferidas, sin embargo, son las proteínas fluorescentes que son una YFP y eCFP como las utilizadas en los ejemplos adjuntos.

El término “transferencia de energía por resonancia (RET)” se refiere a transferencia no radiactiva de energía de excitación desde un donante (primera parte de detección) a una molécula aceptora (segunda parte de detección) como se ha indicado anteriormente (Heyduk T. Measuring protein conformational changes by FRET/LRET. Curr Opin Biotechnol. Agosto 2002; 13(4): 292-6. Revisión; Truong K., Ikura M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*. Curr Opin Struct Biol. Oct 2001; 11(5): 573-8. Revisión; Issad T., Boute N., Boubekeur S., Lacasa D., Pernet K. Looking for an insulin pill? Use the BRET methodology! Diabetes Metab. Abr. 2003; 29(2 Pt 1): 111-7; Boute N., Jockers R., Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. Trends Pharmacol Sci. Agosto 2002; 23(8): 351-4. Revisión).

Además, se pueden determinar la FRET o BRET como se muestra en las siguientes figuras y ejemplos.

En una forma de realización preferida el péptido quimérico de la invención, el sitio de unión de AMPc del grupo de unión a AMPc se une a AMPc con alta afinidad. Preferiblemente, el sitio de unión de AMPc del grupo de unión a AMPc se une a AMPc con una K_d en el intervalo de 1 nM a 50 μ M, más preferiblemente en el intervalo de 1 nM a 50 μ M, más preferiblemente en el intervalo de 5 nM a 40 μ M, más preferiblemente en el intervalo de 100 nM a 30 μ M, más preferiblemente en el intervalo de 200 nM a 20 μ M. Como se muestra en los ejemplos, un intervalo preferido en este contexto es, por ejemplo, 5 nM a 5 μ M, pero también 100 nM a 25 μ M. Un intervalo particularmente preferido en este contexto está entre 100 nM y 50 μ M. Como se muestra en la figura 13, un intervalo lo más preferido está entre 10 nM y 50 μ M, lo más particularmente preferido entre 10 nM y 3 μ M.

En otra forma de realización preferida del péptido quimérico de la invención, el grupo de unión a AMPc se selecciona del grupo que consiste en la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa dependiente de AMPc, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, una proteína activadora de un gen catabólico, un canal de ión operado por AMPc, un canal de ión operado por nucleótido cíclico, la esterasa diana de neuropatía (NTE) y el receptor de AMPc de *Dictyostelium*.

La familia de las proteínas que se unen a AMPc comprende más de diez secuencias de proteínas que codifican proteínas con función conocida, así como varias secuencias derivadas de búsquedas en bases de datos para sitios potenciales de unión a nucleótidos cíclicos (Dremier S, Kopperud R, Dorskland SO, Dumont JE, Maenhaut C. Search for new cyclic AMP-binding proteins. FEBS Lett. 3 Jul 2003; 546(1): 103-7). Hasta 1998 cuando se clonó y caracterizó EPAC1 (de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature. 3 Dic 1998; 396(6710): 474-7) la proteína quinasa A (PKA) estaba aceptada como un efector único del AMPc en la célula. En el estado actual de conocimiento, varias proteínas se unen a AMPc y regulan la función celular, por ejemplo EPAC 1 y 2, canales operados por nucleótidos cíclicos (CNGC), proteína activadora de genes de catabolitos en *E. coli* (CAP), esterasa diana de neuropatía (NTE). Se han identificado ciertas secuencias que codifican para proteínas con potencial actividad de unión a AMPc, pero su función permanece elusiva: una secuencia EST embrionaria de ratón (AI595216), secuencia humana KIAA0313 (AB002311), secuencia Im493605 (Dremier S, Kopperud R, Dorskland SO, Dumont JE, Maenhaut C. Search for new cyclic AMP-binding proteins. FEBS Lett. 3 Jul 2003; 546(1): 103-7). Como es evidente para un experto en la materia, también se pueden usar estas secuencias para la construcción del péptido quimérico de la invención.

Preferiblemente, el grupo de unión a AMPc es de PKA, EPAC1, EPAC2, proteína activadores de gen catabólico en *E. coli*, dicho canal de iones operado por AMPc, como HCN2 (canal de K^+ 2 activado por hiperpolarización, operado por nucleótido cíclico), esterasa diana de neuropatía (NTE) y receptor de AMPc de *Dictyostelium*. El grupo de unión a AMPc de PKA, EPAC1 ó EPAC2 es preferiblemente de origen bacteriano, de ratón, rata o humano.

En otra forma de realización preferida del péptido quimérico de la invención, los marcadores detectables son marcadores fluorescentes, marcadores bioluminiscentes o marcadores de espín (Jahnke W. Spin labels as a tool to identify and characterize protein-ligand interactions by NMR spectroscopy. Chembiochem. 1 Mar 2002; 3(2-3): 167-73. Revisión). Preferiblemente, dichos marcadores fluorescentes se seleccionan del grupo que consiste en GFP, YFP, CFP, BFP, citrina, zafiro y dsRed. El marcador bioluminiscente es preferiblemente luciferasa, tal como luciferasa de renilla o luciferasa de luciérnaga.

Como se ha discutido anteriormente, en una forma de realización más preferida del péptido quimérico de la invención, el grupo de unión a AMPc se selecciona del siguiente grupo. Estas construcciones son también particularmente

ES 2 305 906 T3

útiles en los métodos proporcionados aquí y pueden estar comprendidas en los kits descritos más adelante. Las construcciones preferidas comprende grupos de unión a AMPc seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) un grupo de unión a AMPc de un polipéptido mostrado (y comprendido) en SEQ ID Nos: 1 a 7 y 74;
- (b) un grupo de unión a AMPc mostrado o comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36 y 37;
- (c) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 8 a 20;
- (d) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73; y
- (e) un grupo de unión a AMPc que es al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idéntico a un grupo de unión a AMPc según se ha definido aquí o al grupo de unión a AMPc de (a) a (d).

De acuerdo con esto, los péptidos quiméricos particularmente preferidos se pueden seleccionar de

- (a) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 70 y 72;
- (b) un péptido quimérico que comprende la secuencia mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 (correspondiente a SEQ ID NO: 73), 67, 69, 71 y 73;
- (c) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos el 70% idéntico a un polipéptido como se define en (a) ó (b) y que se puede usar para la determinación directa de la concentración de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*, y
- (d) un péptido quimérico que está codificado por una molécula de ácido nucleico que es degenerada a una secuencia de ADN como se define en (a) y (c).

La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos quiméricos definidos anteriormente. Tales moléculas de ácido nucleico comprenden, pero no están limitadas a moléculas de ADN mostradas en SEQ ID Nos: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70 y 72.

El término “molécula de ácido nucleico” como se usa aquí significa ADN ó ARN o ambas en combinación o cualquier modificación de las mismas que se conozca en el estado actual de la técnica (ver, por ejemplo, US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). Tales moléculas de ácido nucleico son de cadena sencilla o doble, lineales o circulares y sin limitación de tamaño. Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden obtener por ejemplo de fuentes naturales o se pueden producir de forma sintética o mediante técnicas de recombinación, tal como PCR. En una forma de realización preferida, las moléculas de ácido nucleico de la invención son moléculas de ADN, en particular ADN genómico o ADNc, o moléculas de ARN. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es ADN de cadena doble. Moléculas de ácido nucleico inventivas particulares son las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de polipéptidos representadas en SEQ ID NOS: 8 a 20 así como las secuencias de polipéptidos mostradas en SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73 e ilustradas en las figuras 1 y 11.

La molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que la codifica es una molécula de ácido nucleico recombinante, es decir una molécula de ácido nucleico que se ha producido mediante una técnica útil para combinar de forma artificial moléculas de ácido nucleico o partes de las mismas que no estaban de antemano conectadas como en el péptido quimérico resultante. Las técnicas adecuadas están por ejemplo disponibles de la técnica anterior, como se representa en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989) así como Vilaradaga (1995), Biotechniques 18, 605-606. Además, las técnicas correspondientes se ilustran en los ejemplos adjuntos. Dichas técnicas comprenden en particular mutagénesis dirigida.

Para la construcción del péptido quimérico de la invención, se puede usar una secuencia de polinucleótidos que codifica un grupo de unión a AMPc, en donde la secuencia de polinucleótidos es al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica el grupo de unión a AMPc de una secuencia de polipéptido comprendida en SEQ ID NOS: 1 a 7 ó 74 o como en la lista anterior. Mediante un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de al menos, por ejemplo el 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos referencia descrita en la presente invención, se quiere decir que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos

de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden delecionar o sustituir por otro nucleótido, o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia.

Como se ha señalado anteriormente, el experto en la materia está fácilmente en la posición de deducir de una secuencia de aminoácidos determinada o de una secuencia de nucleótidos determinada un “grupo/dominio de unión a AMPc” y/o el “sitio de unión a AMPc”. Los métodos correspondientes comprenden los métodos divulgados, entre otros, en Dremier (2003) FEBS Letters 546, 103-107; Rehmann (2003), Nat. Str. Biol. 10, 25-32 or Kawasaki (1998), Science 282, 2275-2279. Los métodos correspondientes comprenden, según esto, búsquedas en bases de datos, bien solas o en combinación con ensayos biológicos y/o bioquímicos, por ejemplo ensayos de digestión con enzimas de restricción (y a continuación estudios de unión de tramos/fragmentos de proteínas expresadas a AMPc *in vivo* y/o *in vitro*), ensayos de unión, ensayos de competición (por ejemplo con AMPc marcado, por ejemplo radiactivo) y similares. Se debe advertir que un “sitio de unión a AMPc” también se conoce en la bibliografía como “PBC” o “casete de unión a fosfato” (“phosphate binding cassette”). Se puede deducir un “sitio de unión a AMPc” correspondiente mediante métodos análogos y normalmente comprende un tramo bastante corto de residuos de aminoácidos (preferiblemente entre 13 y 15 aminoácidos, en general 14) y normalmente empieza con “F” (fenilalanina) y acaba con una “A” (alanina); ver también la figura 14 o Rehmann (2003), loc. cit. Un programa de ordenador preferido en el contexto de la determinación de las partes funcionales de una secuencia determinada de aminoácidos es TBLASTN; ver también el algoritmo conocido de Dremier (2003), loc. cit.

Al igual que la determinación de los “dominios/grupos de unión a AMPc” y/o los “sitios de unión a AMPc” la identificación de moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos, que son al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idénticos a secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos descritas en la presente invención también puede comprender determinación convencional usando programas de ordenador conocidos. Un método preferido para determinar el mejor emparejamiento total entre una secuencia interrogante (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeta, también referido como alineamiento global de secuencia, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencias las secuencias interrogante y sujeta son ambas secuencias de ADN. Se puede comparar una secuencia de ARN convirtiendo las U's a T's. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en el alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = unitaria, k-tuple = 4, penalización por error de emparejamiento = 1, penalización por unión = 30, longitud de grupo al azar = 0, puntuación de corte = 1, penalización de brecha = 5, penalización de tamaño de brecha 0,05, tamaño del intervalo = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeta, lo que sea más corto.

De acuerdo con lo anterior, para la generación del péptido quimérico de la invención, se puede usar un grupo de unión a AMPc que es al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idéntico al grupo de unión a AMPc de un polipéptido mostrado en SEQ ID Nos: 1 a 7 ó 74 o en la lista anterior. Los particularmente preferidos se dan anteriormente aquí y comprenden, entre otros, los residuos de aminoácidos 281-445 de EPAC2 (domino B), residuos de aminoácidos 203-323 de EPAC1, residuos de aminoácidos 274-416 de la subunidad reguladora II beta de la PKA, residuos de aminoácidos 544-661 del canal de potasio 2 operado por cíclicos, residuos de aminoácidos 12-98 de la proteína activadora del gen de catabolito, residuos de aminoácidos 473-568 de la esterasa diana de neuropatía o residuos de aminoácidos 628-767 del canal de cationes 4 operado por nucleótido cíclicos (CNG-4).

El término “al menos el 70%” como se usa aquí se refiere al 70% o porcentaje mayor de identidad de secuencia.

Además, la invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente.

En una forma de realización preferida del vector de la invención, dicho vector es un vector de expresión.

La presente invención también se refiere a vectores de clonación y vectores de expresión, particularmente plásmidos, cósmidos, virus (tales como adenovirus o retrovirus) y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética, que comprenden una molécula de ácido nucleico o un casete de expresión de la invención.

En una forma de realización preferida de la invención, los vectores de la invención son adecuados para la transformación de células fúngicas, células vegetales, células de microorganismos (es decir, bacterias, protistas, levaduras, algas, etc.) o células animales, en particular células de mamífero. Preferiblemente, tales vectores son adecuados para la transformación de células humanas. Se puede usar métodos que son bien conocidos para los expertos en la materia para construir vectores recombinantes; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y Russell (2001) loc. cit. De forma alternativa, los vectores pueden ser liposomas en los que se pueden reconstituir las moléculas de ácido nucleico o casetes de expresión de la invención para la distribución a las células diana. Asimismo, el término “vector” se refiere a complejos que contienen tales moléculas de ácido nucleico o casetes de expresión que además comprenden compuestos que se sabe facilitan la transferencia de genes a las células tal como policationes, péptidos catiónicos y similares.

Además de la molécula de ácido nucleico o el casete de expresión de la invención, el vector puede contener más genes tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. En general, el vector también contiene uno o más orígenes de replicación.

De forma ventajosa, las moléculas de ácido nucleico contenidas en los vectores están operablemente unidas a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión, es decir aseguran la transcripción y síntesis de un ARN traducible, en células procariotas o eucariotas.

5 En un aspecto, la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención en células procariotas o eucariotas es interesante porque permite la producción del péptido quimérico de la invención. Además, es posible insertar diferentes mutaciones adicionales en las moléculas de ácido nucleico mediante métodos comunes en biología molecular (ver por ejemplo Sambrook y Russell (2001) loc. cit.), que producen la síntesis de proteínas que tienen posiblemente propiedades modificadas, por ejemplo en lo que respecta a afinidad de unión o la eficacia de emisión de energía (por ejemplo, RET). En este sentido, es posible mutar las moléculas de ácido nucleico presentes en el vector mediante inserción o delección de secuencias codificantes o introducir sustituciones de aminoácidos cambiando los tripletes de codones correspondientes.

15 Para la ingeniería genética, por ejemplo en células procariotas, se pueden introducir las moléculas de ácido nucleico de la invención o partes de estas moléculas en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de la secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los métodos estándar (ver Sambrook y Russell (2001) loc. cit.) permite que se realicen intercambios de bases o que se añadan secuencias naturales o sintéticas. De forma similar, para la expresión en células eucariotas, se pueden usar los vectores de expresión correspondientes, como pCDNA3. Los fragmentos de ADN se pueden unir entre si mediante la aplicación de adaptadores y enlazadores a los fragmentos. 20 Además, se pueden usar medidas de manipulación que proporcionan sitios de restricción adecuados o eliminan ADN sobrannte a sitios de restricción. En esos casos, en los que son posibles inserciones, delecciones o sustituciones, se puede usar mutagénesis *in vitro*, "reparación con cebador", restricción o ligación. En general, se llevan a cabo análisis de secuencias, análisis de restricción y otros métodos de bioquímica y biología molecular como método de análisis. La expresión de la molécula de ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente en una línea celular estable. 25 Los procedimientos para la selección de líneas de células transfectadas de formas estables se conocen en la técnica; ver, entre otros, Vilardaga (2001), JBC 276, 33435-33443. Las células huésped preferidas son células CHO, HEK 293, Cos 7, HeLa, PC12 o incluso células primarias como cardiomiocitos primarios, fibroblastos, células troncales endoteliales o embrionarias, en donde dichas células primarias no son células embrionarias humanas.

30 Además, la presente invención se refiere a casetes de expresión que comprenden la molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente operablemente unida a secuencias control que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas.

35 Las secuencias adecuadas de control incluyen promotores que son aplicables en el organismo huésped o célula huésped diana. Tales promotores son bien conocidos para el experto en la técnica de diversos huéspedes desde organismos procariotas y eucariotas y se describen en la bibliografía. Por ejemplo, tales promotores se pueden aislar de genes naturales o pueden ser promotores sintéticos o quiméricos. Asimismo, el promotor puede estar ya presente en el genoma diana y se unirá a la molécula de ácido nucleico mediante un método adecuado conocido en la técnica, tal como por ejemplo recombinación homóloga. Más adelante y en los ejemplos adjuntos se dan secuencias específicas de control de la expresión y las fuentes de las que se pueden derivar. 40

Los casetes de expresión según la invención son particularmente adecuados para una inserción fácil de usar en las moléculas de ácido nucleico diana tales como vectores o ADN genómico. Con este fin, el casete de expresión preferiblemente tiene secuencias de nucleótidos en sus flancos 5' y 3' que facilitan su eliminación y la inserción en posiciones 45 específicas de secuencia como, por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o secuencias diana para la recombinación homóloga como, por ejemplo, la catalizada por recombinasas.

La invención también se refiere a un huésped transformado con el vector o la molécula de ácido nucleico como se ha explicado anteriormente. 50

Otra forma de realización de la invención se refiere a las células huésped, en particular células procariotas o eucariotas, manipuladas genéticamente con la molécula de ácido nucleico, casete de expresión o vector de la invención descrito anteriormente, y a las células que descienden de tales células transformadas y que contienen la molécula de ácido nucleico, casete de expresión o vector de la invención y las células obtenibles mediante el método para producir 55 las mismas mencionado antes. Como se señala posteriormente, la invención también se refiere a animales transgénicos no humanos que comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido quimérico de la invención.

Preferiblemente, las células huésped son células huésped bacterianas, fúngicas, de insecto, vegetales o animales. En una forma de realización preferida, la célula huésped está manipulada genéticamente de tal manera que contiene 60 la molécula introducida de ácido nucleico integrada de forma estable en el genoma. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico se puede expresar de forma que lleve a la producción del péptido quimérico de la invención.

Una visión de conjunto clásica de los diferentes sistemas de expresión está contenida por ejemplo en Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516, en Bitter *et al.* (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544) y en Sawers *et al.* (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4), Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463), Griffiths *et al.*, (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440). Se da una visión de conjunto de los sistemas de expresión en levadura por ejemplo en Hensing *et al.* (Antoine von Leuwenhoek 67 (1995), 261-279), Bussineau (Developments in Biological Standardization 83

(1994), 13-19), Gellissen *et al.* (Antoine van Leuwenhoek 62 (1992), 79-93, Fleeer (Current Opinion in Biotechnology 3 (1992), 486-496), Vedvick (Current Opinion in Biotechnology 2 (1991), 742-745) y Buckholz (Bio/Technology 9 (1991), 1067-1072). Los sistemas de expresión particularmente preferidos incluyen, pero no están limitados a células Sf9, células de *E. coli* o células de mamífero tales como células CHO, HEK 293, Cos 7, HeLa, PC12 o células NIH3T3.

Los vectores de expresión se han descrito ampliamente en la bibliografía. Como norma, contienen no solo un gen marcador de selección y un origen de replicación que asegura la replicación en el huésped seleccionado, sino también un promotor bacteriano o viral y, en la mayoría de los casos, una señal de terminación de la transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación, en general hay al menos un sitio de restricción o un enlazador múltiple que permite la inserción de una secuencia de nucleótidos codificante. Es posible usar promotores que aseguren la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permiten un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias de promotores de bacterias y virus que poseen estas propiedades se describen en detalle en la bibliografía. Las secuencias reguladoras para la expresión en microorganismos (por ejemplo *E. coli*, *S. cerevisiae*) están suficientemente descritas en la bibliografía. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia posterior son por ejemplo el promotor T7 (Studier *et al.*, Methods in Enzymology 185 (1990), 60-89), lacUV5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer *et al.*, en Rodriguez y Chamberlin (Eds), Promoters, Structure and Function; Praeger, Nueva York, (1982), 462-481; DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25), lp1, rac (Boros *et al.*, Gene 42 (1986), 97-100). Los promotores inducibles se usan preferiblemente para la síntesis de proteínas. Estos promotores con frecuencia producen rendimientos más altos de proteínas que los promotores constitutivos. Para obtener una cantidad óptima de proteína, con frecuencia se usa un proceso de dos pasos. Primero, las células huésped se cultivan en condiciones óptimas hasta una densidad celular relativamente alta. En el segundo paso, se induce la transcripción dependiendo del tipo de promotor usado. A este respecto, un promotor tac es particularmente adecuado el cual se puede inducir por lactosa o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 21-25). Las señales de terminación para la transcripción tal como el sitio de poliadenilación del SV40 o el sitio poli-A de tk útiles para aplicaciones en células de mamífero también están descritos en la bibliografía. Los vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica tal como el vector de expresión pcDV1 con el ADNc de Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogene; ver también los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pCI (Promega).

La transformación de la célula huésped con una molécula de ácido nucleico o vector según la invención se puede llevar a cabo mediante métodos estándar, como por ejemplo los descritos en Sambrook y Russell (2001), loc. cit. La célula huésped se cultiva en medio nutriente que cumpla los requerimientos de la célula huésped particular usada, en particular con respecto al valor de pH, temperatura, concentración de sal, aeración, antibióticos, vitaminas, oligoelementos, etc. El péptido quimérico según la presente invención se puede recuperar y purificar a partir de los cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxiapatita y cromatografía en lectina. En caso de que el péptido quimérico de la invención se exprese como una proteína de membrana, la proteína se puede purificar aplicando detergentes, como Triton X-100 o SDS. Se puede usar pasos de plegamiento de proteínas, si es necesario, para completar la configuración de la proteína. Tal péptido purificado puede, entre otros, ser ensamblado y/o introducido en una membrana biológica artificial, como liposomas, preparaciones crudas de membrana o bicapas de lípidos.

Preferiblemente, el huésped es una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula bacteriana, o un animal transgénico no humano.

La presente invención además se refiere a organismos transgénicos no humanos, es decir, organismos multicelulares que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido quimérico de la invención o un casete de expresión o un vector como se ha descrito anteriormente, preferiblemente integrado de forma estable en su genoma, al menos en una subserie de células de ese organismo, o partes del mismo tal como tejido u órganos. Más preferiblemente, tal transgénico de origen no humano es un mamífero como un ratón, una rata, una oveja, un cerdo, un perro, una rata o un caballo.

El animal transgénico que expresa el péptido quimérico de la presente invención es particularmente útil en estudios farmacológicos, cribado y métodos de identificación como se proporciona aquí. Es notable que en particular para estos estudios son particularmente útiles no solo las células sino también órganos o partes de órganos de dichos animales transgénicos no humanos. Se prevé que, por ejemplo, se utilicen corazón, vasos sanguíneos, músculo, ganglios, hueso, riñón o hígado, o cerebro o cultivo de cortes de cerebro del animal transgénico no humano aquí descrito en el cribado y método de identificación proporcionado aquí. Además de los animales transgénicos no humanos que son mamíferos, también se prevé que dichos organismos transgénicos no humanos pueden ser un anfibio, un insecto, un hongo o incluso una planta. Los animales transgénicos no humanos particularmente preferidos en este contexto son *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* así como levaduras como *S. pombe* o *S. cerevisiae* o las especies de *Aspergillus*. Las plantas transgénicas comprenden, pero no están limitadas a, trigo, tabaco, perejil o *Arabidopsis*.

Como se ha mencionado aquí anteriormente y como en particular se ilustra en los ejemplos adjuntos, los péptidos quiméricos definidos aquí son en particular útiles en el cribado y métodos de identificación para moléculas o compuestos que son capaces de modificar la unión a AMPc del péptido quimérico o la acción biológica y/o farmacológica de las adenilato ciclasas y/o fosfodiesterasas. Como muestran los ejemplos, la adenosina como un agonista de los

ES 2 305 906 T3

receptores acoplados a la proteína Gs puede inducir el aumento del AMPc en la célula. Los activadores directos de la adenilato ciclasa, tal como la forskolina, también producen una señal de FRET detectable.

Más preferiblemente, dicha célula de mamífero es una célula CHO, HEK 293, HeLa, Cos 7, PC12 o célula NIH3T3 así como cultivos de células primarias, como cultivos neuronales. Como es obvio para el experto en la materia, las células primarias o animales transgénicos que expresan el péptido quimérico de la invención también se pueden utilizar para dicho cribado o métodos de identificación.

En otra forma de realización preferida el huésped de la invención, dicha célula de anfibio es un oocito, preferiblemente un oocito de xenopus.

En una forma de de realización más, la invención se refiere a un método para producir células o huéspedes capaces de expresar el péptido quimérico de la invención que comprende células o huéspedes genéticamente manipulados con la molécula de ácido nucleico, casete de expresión o vector de la invención descritos anteriormente.

Además, la invención se refiere a un método para producir el péptido quimérico como se ha definido anteriormente, que comprende cultivar/generar el huésped mencionado antes, y opcionalmente, aislar y/o purificar el péptido quimérico producido.

Además, la invención se refiere a péptidos quiméricos que se pueden obtener mediante un método para su producción como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con esto, una forma de realización más de la invención se refiere a un método para producir el péptido quimérico de la invención que comprende cultivar las células huésped descritas antes en condiciones que permitan la expresión de dicho péptido quimérico y recuperar dicho péptido quimérico de las membranas de la célula huésped u organismo huésped. En caso de que el péptido quimérico esté localizado en la membrana de las células huésped, la proteína se puede recuperar de las células cultivadas mediante tratamiento con detergente.

Además, la invenciones refiere a un método *in vitro* para determinar la concentración de AMPc en una muestra, que comprende añadir el péptido quimérico como se ha definido anteriormente, o que se puede obtener mediante el método mencionado, a la muestra y medir/registrar la FRET o BRET y determinar la concentración de AMPc en la muestra comparando los valores de la emisión de fluorescencia con una curva patrón obtenida con concentraciones de AMPc definidas.

Como ya se ha explicado anteriormente aquí, las detección de partes/marcadores presentes en el péptido quimérico de la invención facilita la detección de un cambio conformacional en el péptido quimérico de la invención tras la unión de AMPc, que, posteriormente, produce un cambio de la energía emitida por las partes de detección/marcadores detectables que se pueden seguir mediante FRET o BRET. El cambio conformacional del grupo de unión a AMPc tras la unión de AMPc da como resultado un cambio detectable de RET entre las partes/marcadores detectables. Tal cambio se puede tomar por ejemplo de la comparación de los espectros de emisión de un grupo de unión a AMPc en ausencia de un compuesto de unión adecuado, es decir AMPc, con el mismo grupo de unión a AMPc en presencia del tal compuesto. Si, por ejemplo, se aumenta la RET, el pico de emisión del aceptor sube y el pico de emisión del donante disminuye. De esta manera, la razón de la intensidad de emisión del aceptor a la del donante es indicativa del grado de RET entre las partes de detección. El cambio conformacional del péptido quimérico puede dar como resultado bien un descenso bien un aumento de la distancia entre las partes de detección. De esta manera, el péptido quimérico de la invención proporciona una herramienta monomolecular particularmente viable para determinar de forma directa los niveles de AMPc en una muestra. Por ejemplo, se puede añadir el péptido quimérico como se ha definido anteriormente, a una muestra y midiendo y/o registrando la FRET o BRET, se puede medir la concentración de AMPc en la muestra, por ejemplo, una célula, lisado celular, extracto celular crudo, preparación de membrana o tejido, comparando los valores de la emisión de fluorescencia con una curva patrón obtenida con concentraciones definidas de AMPc. Para ejemplificar un posible ensayo para medidas de AMPc *in vitro*, las células se pueden transfectar de forma transitoria con un plásmido que codifica, por ejemplo, un péptido quimérico basado en EPAC2 que lleva CFP e YFP como se ha descrito antes. 24 horas después de la transfección, se pueden preparar los lisados celulares y se pueden tomar los espectros de emisión después de la adición de diferentes concentraciones de AMPc como se indica en los ejemplos. La disminución en la intensidad a 525 nm con su aumento a 475 nm representa una pérdida en la señal de FRET entre CFP e YFP. Se puede trazar la relación de la intensidad de señal a 475 nm/intensidad a 525 nm frente a la concentración de AMPc en una curva de saturación para mediadas precisas posteriores de la concentración de AMPc en diferentes muestras desconocidas.

En un ensayo *in vitro* alternativo que se puede usar para la determinación de la concentración de AMPc en una muestra, por ejemplo se expresa el sensor de FRET EPAC-AMPc con una etiqueta de His de la invención en células Sf9 o *E. coli*. Posteriormente, se aísla la proteína mediante métodos de purificación adecuados, por ejemplo usando una columna de níquel. A continuación, se añade un volumen definido de una solución tamponante que contiene una concentración específica del péptido de la invención a un volumen definido de la muestra. Se detecta el cambio en la FRET de la muestra mediante el uso de un fotómetro que es adecuado para la detección de FRET, por ejemplo un lector de placas de 96 pocillos. Al mismo tiempo, se determina una curva de calibración usando alícuotas de la muestra a la que se añaden cantidades definidas de AMPc. Se siguen los cambios en FRET producidos por la unión de AMPc con el péptido quimérico de la invención que reduce la FRET.

ES 2 305 906 T3

Según lo anterior, la muestra como se define aquí puede ser por ejemplo una célula, un lisado celular, un extracto celular crudo, una preparación de membrana, un tejido, o biofluidos. Los biofluidos como se usa aquí se refiere a fluidos corporales como semen, linfa, suero, plasma, orina, líquido sinovial o líquido espinal.

El ensayo descrito anteriormente usando el péptido quimérico de la invención muestra varias ventajas. Por ejemplo, dichos ensayos son sensibles para muestras derivadas de varias fuentes. La fluorescencia se detecta según un estándar de la industria. Además, la velocidad de detección es muy alta, es decir <10 minutos comparada con >1 hora mediante los radioinmunoensayos (RIA) comunes. Además, el ensayo anterior muestra selectividad alta para AMPc comparado con ATP, que no es el caso para muchos ensayos RIA. Además, es rentable y el sensor de FRET se puede producir a gran escala mediante expresión en *Sf9/E. coli*, que no es el caso para los anticuerpos. Además, el ensayo descrito antes es aplicable para HTS. Por último, si se cambian los fluoróforos por luciferasa el ensayo anterior se puede adaptar para BRET.

Como es evidente para los expertos en la materia, los péptidos quiméricos de la invención también se pueden marcar *in vitro* usando marcadores de fluorescencia químicos.

La invención también se refiere a un método para seguir en espacio y tiempo la cantidad, distribución, localización, o fluctuación de AMPc en una célula viva o tejido, que comprende transformar una célula o tejido con el ácido nucleico o vector de la invención y medir/registrar la FRET o BRET en la célula viva o tejido, así como en animales transgénicos (no humanos) vivos.

Al medir los cambios de FRET usando el péptido quimérico de la invención, es posible determinar los cambios en la concentración de AMPc en células individuales alta resolución espacial y de tiempo (es decir temporal en ms). Esta nueva metodología es especialmente adecuada para el mapeo temporal y topográfico de la señalización de AMPc y tiene el potencial de descubrir nuevos aspectos de este sistema de transducción así como delinear los detalles finos de la bioquímica del AMPc *in vivo*.

Además, el péptido quimérico de la invención se puede utilizar para investigar cómo la vía de señalización del AMPc se organiza y se regula en la matriz tridimensional de las células, analizar su dinámica temporal y delinear los mecanismos de adaptación/alteración realizados en trastornos fisiopatológicos en varios tipos celulares. Por ejemplo, es posible analizar tipos celulares donde el AMPc tiene un papel fundamental, tal como miocitos cardiacos. Se ha mostrado recientemente que en los miocitos cardiacos neonatales, la estimulación del receptor β -adrenérgico genera microdominios locales de AMPc alto que se mantienen mediante la actividad de las fosfodiesterasas (Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. Science. 1 Mar 2002; 295(5560): 1711-5). El péptido quimérico de la invención se puede usar para extender tal análisis para generar información detallada sobre la cinética del AMPc, la dinámica espacio-temporal de activación de los receptores de 7 dominios transmembrana, adenilato ciclasa o fosfodiesterasa y los mecanismos reguladores implicados. Posteriormente, se pueden analizar trastornos patológicos donde se ha sugerido un posible papel para el AMPc. Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a tales como diabetes mellitus, hipertrofia cardiaca, insuficiencia cardiaca, o hipertensión. Además, está descrito que la señalización por AMPc está implicada en aprendizaje, memoria y respuesta inmune como ya se ha explicado anteriormente.

Además, está muy aceptado que la vía del AMPc juega un papel fundamental en el control de la proliferación, sin embargo los detalles moleculares de la regulación del ciclo celular dependiente de AMPc todavía se entienden poco debido a la dificultad de seguir *in vivo* los hechos moleculares específicos afectados por el AMPc. De esta manera, el péptido quimérico de la invención se puede usar para la determinación de AMPc basada en FRET/BRET en procariontas o eucariotas, preferiblemente células de mamífero para estudiar el papel de la vía de señalización del AMPc en el control del ciclo celular y en la proliferación celular. Por ejemplo, se pueden establecer clones de líneas celulares estables de mamíferos que expresen el péptido quimérico de la invención y se pueden medir los cambios en el AMPc siguiendo la dinámica del AMPc durante el ciclo celular de células sincronizadas. Posteriormente, se puede extender el mismo tipo de análisis a células individuales no alteradas.

El péptido quimérico de la invención también se puede usar para determinar en el espacio y tiempo la cantidad, distribución, localización, o fluctuación de AMPc en tejidos, por ejemplo, en órganos de animales transgénicos que expresan el péptido quimérico de la invención. Por ejemplo, usando promotores específicos de tejido, el péptido quimérico de la invención se puede expresar en un tejido u órgano particular de los animales transgénicos para estudiar la señalización del AMPc en organogénesis o patogénesis de enfermedades de ese órgano. Por supuesto, estos son sólo ejemplos no limitantes sin restringir las formas de realización de la invención.

De esta manera, el péptido quimérico de la invención proporciona un sensor de AMPc que es particularmente adecuado para la detección de la concentración intracelular de AMPc en células vivas, tejidos y animales transgénicos usando un fotómetro con resolución de tiempo en ms. Dichos ensayos muestran varias ventajas comparados con el ensayo PKA-FRET descrito en la técnica (Zaccolo *et al.*, loc. cit). Hasta ahora, el ensayo PKA-FRET es el único que es adecuado para la aplicación en células vivas. El ensayo de PKA-FRET se basa en la detección de la FRET entre dos subunidades de la proteína quinasa A, que se activa a través de la unión de 4 moléculas de AMPc. El mecanismo de unión es muy complicado puesto que los cuatro sitios de unión se regulan de forma cooperativa. Por lo tanto, los inventores usan un péptido quimérico que contiene un solo sitio de unión a AMPc como un sistema de FRET intramolecular. Básicamente, hay diferencias en el manejo y la aplicación de los dos tipos de ensayo mencionados

antes que llevan a ventajas del método de la presente invención. El péptido quimérico de la presente invención es biológicamente inactivo ya que se han delecionado los dominios reguladores de la proteína, excepto el dominio de unión a AMPc. Por lo tanto, el sensor de la invención se puede expresar en cada célula sin causar problemas, por ejemplo, no interfiere con la biología de la célula o la fisiología de la célula. De esta manera, es posible generar líneas celulares estables y organismos transgénicos. Además los mecanismos de retroalimentación, que tienen un efecto en la producción de AMPc, no se modifican de forma activa al contrario que en el método de la PKA-FRET descrito en la técnica. Además, la estequiometría de los fluoróforos es siempre 1:1 en el sistema de FRET intramolecular. Por el contrario, en el sistema de la PKA-FRET, la estequiometría de los fluoróforos es variable y, por lo tanto, no se puede regular.

La invención también se refiere a un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de activar o inhibir la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención, que comprende los pasos de:

- (a) transfectar el ácido nucleico o vector de la invención en una célula que expresa de este modo el péptido quimérico de la invención;
- (b) poner en contacto dicha célula con molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s); y
- (c) medir si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) lleva(n) a un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico como se ha definido anteriormente.

Como se ha mencionado aquí antes y como se ilustra en particular en los ejemplos adjuntos, los péptidos quiméricos definidos aquí son particularmente útiles en el cribado y métodos de identificación para moléculas o compuestos capaces de modificar, es decir activar o inhibir la unión de AMPc al sitio de unión de AMPc el péptido quimérico de la invención. Por ejemplo, se pueden transfectar células como se ha explicado anteriormente con el ácido nucleico o el vector de la invención que da como resultado la expresión del péptido quimérico de la invención. En un paso posterior, estas células se ponen en contacto con molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s). Midiendo si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) lleva(n) a un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico, es posible identificar moléculas o compuestos que son capaces de activar o inhibir la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención. Como muestran los ejemplos, la presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que se puede llevar a cabo el análisis de RET intramolecular en el péptido quimérico de la invención, en base a un cambio conformacional tras la unión de AMPc, lo que produce un cambio en la energía (que se puede medir mediante FRET o BRET). De acuerdo con esto, la presente invención proporciona por primera vez medios y métodos mediante los cuales se pueden observar la activación (así como la desactivación) o la inhibición de la unión a AMPc al péptido quimérico de la invención con alta resolución y dentro de cinética fisiológica. En particular, se proporcionan los ensayos de alta resolución para cambios/giros conformacionales de activación o inhibición del péptido quimérico de la invención en células vivas. Por lo tanto, la presente invención proporciona para un cribado distinto así como métodos de identificación para agonistas, agonistas parciales, agonistas inversos así como antagonistas del péptido quimérico de la invención. En el contexto de esta invención así como según las ciencias farmacológicas, el término “agonista” se puede limitar como una molécula o un compuesto que activa la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención. Como “agonistas parciales” la técnica define moléculas/compuestos que se comportan como agonistas, pero que, incluso a altas concentraciones, no pueden activar la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención al mismo nivel máximo que los agonistas totales. El término “antagonista” se refiere a moléculas/compuestos que inhiben la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención.

La identificación y/o caracterización de moléculas que son capaces de activar o inhibir la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención, se puede, entre otros, alcanzar transfectando un huésped adecuado con una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido quimérico de la invención. Dichos huéspedes comprenden, pero no están limitados a células CHO, HEK 293, HeLa, Cos 7, PC12 o células NIH3T3, cardiomiocitos (primarios), fibroblastos, células troncales endoteliales o embrionarias, células cultivadas de nervios (primarias), células de músculo u oocitos de rana, en donde dichas células no son células embrionarias humanas. La transfección puede ser en forma de una transfección transitoria. De forma alternativa, se pueden usar líneas celulares estables que expresan el péptido quimérico de la invención. Las células se ponen en contacto con molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) y se mide si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) lleva(n) a un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico como se ha definido antes. Como ilustran los ejemplos adjuntos, los métodos de medida particularmente preferidos comprenden las medidas de FRET o BRET.

La invención además se refiere a un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de activar, desactivar o inactivar la función biológica/farmacológica de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de:

- (a) transfectar el ácido nucleico o vector de la invención a una célula que expresa una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa;
- (b) poner en contacto dicha célula con molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s); y
- (c) medir si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) lleva(n) a un cambio en la energía emitida por dichas dos marcas detectables comprendidas en el péptido quimérico como se ha definido anteriormente.

Los péptidos quiméricos definidos aquí son particularmente útiles en el cribado y métodos de identificación para moléculas o compuestos que son capaces de modificar la acción biológica y/o farmacológica de adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Discutido brevemente, la unión de ligandos a ciertos receptores acoplados a proteínas Gs (por ejemplo adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$, de adenosina A2, prostaglandina E2) activa la adenilato ciclasa, una enzima que produce AMPc, que es un segundo mensajero ubicuo capaz de regular varios procesos celulares por medio de la activación de sus dianas proteína quinasa A, EPAC y canales de iones operados por nucleótidos cíclicos. Los niveles intracelulares de AMPc se regulan negativamente mediante fosfodiesterasas específicas que determinan la fuerza y la organización espacial de la señal. Los cambios patológicos y los inducidos por terapia en la señalización del AMPc podrían producir enfermedad crónicas graves o efectos secundarios (insuficiencia cardíaca, asma bronquial, enfermedades inflamatorias, cáncer) (Cooper DM. Regulation and organization of adenylyl cyclases and CAMP. *Biochem J.* 1 Nov 2003; 375(Pt 3): 517-29; Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 21 Feb 2003; 278(8): 5493-6).

Como muestran los ejemplos, la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento que se puede llevar a cabo análisis de RET intramolecular en el péptido quimérico de la invención, en base a un cambio conformacional tras la unión de AMPc, dando como resultado un cambio en la energía (que se puede medir por FRET o BRET). De acuerdo con esto, la presente invención proporciona por primera vez medios y métodos mediante los cuales se puede observar la activación (así como la desactivación) del péptido quimérico de la invención con alta resolución y dentro de la cinética fisiológica. En particular, se proporcionan ensayos de alta resolución para la regulación de adenilato ciclasas o fosfodiesterasas en células vivas.

Según los métodos proporcionados aquí, la invención proporciona para identificar, caracterizar, cribar compuestos o moléculas que son capaces de activar, desactivar o inactivar adenilato ciclasas o fosfodiesterasas por lo cual tal interacción puede llevar a una activación, una activación parcial, una inhibición o una inhibición parcial de la función biológica y/o farmacológica de dichas adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Por lo tanto, la presente invención proporciona cribados así como métodos de identificación diferentes para agonistas, agonistas parciales, agonistas inversos así como antagonistas de las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. En el contexto de esta invención así como según las ciencias farmacológicas, el término “agonista” se puede limitar como una molécula o un compuesto que se une y activa adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Como “agonistas parciales” la técnica define moléculas/compuestos que se comportan como agonistas, pero que, incluso a altas concentraciones, no pueden activar las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas al mismo nivel máximo que los agonistas totales. El término “agonista inverso” se refiere a moléculas/compuestos que se unen a e inhiben la actividad de las correspondientes adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Estos agonistas inversos son de particular importancia y visibles, cuando las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas muestran actividad intrínseca independiente de agonista. El término “antagonista” se refiere a moléculas/compuestos que se unen a las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas pero no cambian la actividad intrínseca de dichas enzimas. También pueden prevenir la unión del ligando correspondiente a las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas y pueden prevenir la unión y activación de las adenilato ciclasas y fosfodiesterasas por sus agonistas o agonistas parciales.

Según la presente invención, el término “antagonista” se refiere a moléculas/sustancias, que son capaces de inhibir y/o reducir un efecto agonista. El término “antagonista” comprende antagonistas competitivos, no competitivos, funcionales y químicos como se describe, entre otros, en Mutschler, “Arzneimittelwirkungen” (1986), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Alemania. El término “antagonista parcial” según la presente invención significa una molécula/sustancia que es capaz de bloquear de forma incompleta la acción de agonistas a través, entre otros, de un mecanismo no competitivo. Como “agonista”, según esta invención, se quiere decir moléculas/sustancias que tienen afinidad así como actividad intrínseca. Principalmente, se define dicha actividad intrínseca (α) como proporcional al cociente del efecto, desencadenado por dicho agonista (E_A) y el efecto que se puede obtener como máximo en un sistema biológico dado (E_{max}): por lo tanto, la actividad intrínseca se puede definir como

$$\alpha \sim \frac{E_A}{E_{max}}$$

La mayor actividad intrínseca relativa viene de $E_A/E_{max}=1$. Los agonistas con una actividad intrínseca de 1 son agonistas totales, mientras que sustancias/moléculas con una actividad intrínseca >0 y <1 son agonistas parciales. Los agonistas parciales muestran un efecto dual, es decir, comprenden efectos agonistas así como antagonistas.

El experto en la materia puede, por lo tanto, emplear fácilmente los compuestos y los métodos de esta invención para elucidar los efectos y/o características agonistas y/o antagonistas de un compuesto/molécula/sustancia a ser identificada y/o caracterizada según cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

La identificación y/o caracterización de moléculas que son capaces de activar, desactivar o inactivar el péptido quimérico, puede ser, entre otros, alcanzada transfectando un huésped apropiado que expresa adenilato ciclasas o fosfodiesterasas de forma estable o transitoria con una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido quimérico de la invención. Dichos huéspedes comprenden, pero no están limitados a células CHO, HEK 293, HeLa, Cos 7, PC12 o células NIH3T3, oocitos de rana, o células primarias como cardiomiocitos, fibroblastos, músculo, células troncales endoteliales o embrionarias, en donde dichas células no son células embrionarias humanas. Por supuesto, también es posible usar líneas celulares transfectadas de forma estable con el ácido nucleico que codifica el péptido quimérico en las que se transfectan los ácidos nucleicos que codifican las adenilato ciclasas o fosfodiesterasas. Las células se ponen des-

pués en contacto con molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) y se mide si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s) lleva(n) a un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico como se ha definido antes. Como se ha explicado anteriormente, los métodos de medida particularmente preferidos comprenden medidas de FRET o BRET.

Además, la invención se refiere a un método de cribado para moléculas o compuestos que son activadores/agonistas, agonistas inversos o inhibidores/antagonistas de la función biológica/farmacológica de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de

- (a) transfectar el ácido nucleico o vector de la invención a una célula que expresa una adenilato ciclasa o fosfodiesterasa;
- (b) poner en contacto dicha célula con la(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s);
- (c) medir y/o detectar un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables en el péptido quimérico como se ha definido anteriormente; y
- (d) comparar dicho cambio en energía a una respuesta estándar medida en ausencia de dicho(s) molécula(s)/compuesto(s) candidato(s).

El término “respuesta estándar” como se usa aquí se refiere a una señal, es decir cambio en FRET, que se induce mediante activadores/inhibidores de la adenilato ciclasa o fosfodiesterasa usados de forma rutinaria o agonistas/agonistas parciales/agonistas reversos/antagonistas de receptores acoplados a proteínas G, usado como los así llamados compuestos de referencia. Para medidas *in vitro*, la “respuesta estándar” como se define aquí se refiere a una señal, es decir cambio en FRET, que se induce mediante la adición de una concentración conocida de AMPc, también denominada concentración estándar o concentración de referencia.

Además, la invención se refiere a un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de provocar una respuesta biológica/farmacológica de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de:

- (a) transfectar el ácido nucleico o vector de la invención a una célula que expresa una adenilato ciclasa o fosfodiesterasa;
- (b) poner en contacto dicha célula con la(s) molécula(s) o compuesto(s) a ser ensayado(s); y
- (c) identificar entre estas moléculas/compuestos las moléculas/compuestos que son capaces de provocar un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico de la invención.

Las moléculas candidatas potenciales o mezclas de moléculas candidatas pueden ser, entre otras, sustancias, compuestos o composiciones que son de origen químico o biológico, que son naturales y/o que se producen de forma sintética, recombinante y/o química. De esta manera, las moléculas candidatas pueden ser anticuerpos, proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, aminoácidos y/o derivados de los mismos u otros compuestos, tales como iones, que se unen a y/o interaccionan con, entre otros, el péptido quimérico de la invención, adenilato ciclasas o fosfodiesterasas.

El experto en la materia apreciará inmediatamente que los métodos de la invención pueden presentar una contribución importante a la investigación farmacológica, en particular en el campo del cribado de drogas. De esta manera, las técnicas correspondientes para el cribado de drogas descritas en la bibliografía incluyen por ejemplo Kyranos (Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. 4 (2001), 719-728), Pochapsky (Curr. Top. Med. Chem. 1(2001), 427-441) y Bohets (Curr. Top. Med. Chem. 1 (2001), 367-383).

Según la presente forma de realización, en principio se puede usar cualquier tipo de célula, membrana, preparación de membrana o liposoma para el presente método que es susceptible de detección óptica. Se puede transformar la célula que se va a usar de modo que exprese el péptido quimérico de la invención. De esta manera, las células pueden ser células individuales tal como bacterias, levaduras, protozoos o células en cultivo, por ejemplo de vertebrado, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de origen humano. Para ciertas aplicaciones, puede ser útil tomar células patológicamente afectadas tales como células tumorales o células infectadas por un agente infeccioso, por ejemplo un virus, en donde preferentemente se realizan las medidas en comparación con las células sanas correspondientes. Asimismo, las células pueden ser parte de un tejido, órgano u organismo, en particular de un animal transgénico no humano definido anteriormente.

Los compuestos candidatos o compuestos a ensayar en principio se pueden tomar de cualquier fuente. Pueden ser sustancias naturales, sustancias naturales modificadas, sustancias sintetizadas de forma química o sustancias producidas por un organismo transgénico y opcionalmente purificadas hasta un cierto grado y/o además modificadas. Prácticamente, el compuesto candidato se puede tomar de una librería de compuestos tal como se aplican de forma rutinaria para procesos de cribado.

El término “poner en contacto” se refiere a la adición de un compuesto candidato/compuestos a ensayar a la célula analizada de modo que el compuesto pueda ser eficaz en la célula en la superficie celular o tras la captación por la célula. Típicamente, se pueden añadir el compuesto candidato o una solución que lo contiene a la mezcla de ensayo. El paso (a) de los métodos de la presente invención, es decir el “paso de poner en contacto” se puede cumplir asimismo añadiendo una muestra que contenga dicho compuesto candidato o una pluralidad de compuestos candidatos a la mezcla de ensayo. Si se identifica mediante el método presente que tal muestra o pluralidad de compuestos contiene un compuesto de interés, entonces es posible aislar el compuesto a partir de la muestra original o subdividir más la muestra original, por ejemplo, si consiste en una pluralidad de compuestos diferentes, de modo que se reduzca el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el método con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de la muestra, los pasos descritos aquí se pueden realizar varias veces, preferiblemente hasta que la muestra identificada según el método de la invención sólo comprende un número limitado de o solamente una sustancia(s). Preferiblemente dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y lo más preferiblemente dichas sustancias son idénticas.

El paso (b), es decir el “paso de medida o identificación” se puede llevar a cabo según las explicaciones respecto a medir un cambio en la emisión de energía de las proteínas de fusión, es decir el péptido quimérico de la invención como se ha dado anteriormente. Particularmente preferidas son las técnicas de medida ópticas que permiten una resolución de la fluorescencia a nivel de células individuales, preferiblemente a nivel subcelular. Las técnicas de imagen adecuadas se describen en la bibliografía tal como en Periasamy A., *Methods in Cellular Imaging*, 2001, Oxford University Press o en *Fluorescent Imaging Spectroscopy and Microscopy*, 1996, editado por: X.F. Wang; Brian Herman. John Wiley and Sons. Pueden implicar microscopía de fluorescencia, preferiblemente confocal, registro digital de imágenes, por ejemplo por medio de una cámara CCD, y software de análisis de imágenes adecuado. Los ejemplos adjuntos también proporcionan marcos adecuados para medir los compuestos candidatos. Preferentemente, el paso (b) se lleva a cabo corriendo en paralelo experimentos control. Por ejemplo, se puede observar una célula correspondiente que expresa el mismo péptido quimérico en las condiciones correspondientes como en los pasos (a) y (b), sin embargo, sin ponerla en contacto con el compuesto candidato.

De acuerdo con esto, las potenciales moléculas candidatas se pueden poner en contacto con una célula como se ha referido antes que expresan un péptido quimérico de la invención o un parche de membrana, una preparación de membrana, que comprenden un péptido quimérico de la invención y medir una respuesta correspondiente (entre otras, respuesta a dosis, una respuesta a corriente, o una respuesta a concentración) para elucidar cualquier efecto que dicha molécula candidata produzca. Dicha respuesta se mide lo más preferiblemente mediante métodos proporcionados aquí y en particular mediante tecnología FRET o BRET.

También están dentro del ámbito de la presente invención métodos para identificar, caracterizar y para el cribado de moléculas que son capaces de interactuar con adenilato ciclasas o fosfodiesterasas que comprenden los así llamados métodos de cribado de alto rendimiento y aproximaciones similares que se conocen en la técnica (Spencer, *Biotechnol. Bioeng.* 61 (1998), 61-67; Oldenburg, *Annu. Rep. Med. Chem.* 33 (1998), 301 -311; Milligan, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999), 118-124) llevados a cabo usando placas de 96 pocillos, 384 pocillos, 1536 pocillos (y otras) comercialmente disponibles. Los métodos adicionales a ser utilizados según la presente invención comprenden, pero no están limitados a, lecturas de fluorescencia homogéneas en cribados de alto rendimiento (como se describe, entre otros, en Pope, *Drug Discovery Today* 4 (1999), 350-362). El método de la presente invención para la identificación, caracterización y/o cribado de moléculas capaces de interactuar con adenilato ciclasas o fosfodiesterasas, puede, entre otros, utilizar huéspedes como se han definido aquí que expresan el péptido quimérico de la presente invención. Los ensayos basados en células, la instrumentación para dichos ensayos y/o medidas son bien conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en Gonzalez, *Drug Discovery Today* 4 (1999), 431 -439 o Ramm, *Drug Discovery Today* 4 (1999) 401-410.

En una forma de realización preferida de los métodos de cribado de la invención, dicho cambio de energía es un aumento o disminución de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o de la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

En una forma de realización preferida, la respuesta o cambios de energía a ser medidos en los métodos que se proporcionan aquí corresponden a un aumento o un descenso de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En FRET, tanto donante como aceptor, es decir, ambas partes de detección, son partes de proteínas fluorescentes y, para medir FRET, se suministra energía a la proteína de fusión, es decir, radiación, apropiada para excitar la emisión de energía por la primera parte de detección.

De acuerdo con esto, es una forma de realización preferida del péptido quimérico de la presente invención, que el primer marcador de detección es una parte de proteína fluorescente.

La eficacia de la FRET depende de la distancia entre las dos partes fluorescentes. La fórmula matemática que describe FRET es la siguiente $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, donde E es la eficacia de FRET, r es la distancia real entre las partes fluorescentes, y R_0 es la distancia de Förster a la que la FRET es el 50% del valor máximo de FRET que es posible para un par determinado de partes de FRET. R_0 , que se puede determinar experimentalmente, depende de la orientación relativa entre las partes fluorescentes (κ), el índice refractor de la media (η), la superposición integral de la emisión del donante con la excitación de la parte aceptora ($J(\lambda)$), y el rendimiento cuántico de la parte donante fluorescente (Q_D) ($R_0^6 = 8,79 \times 10^{-25} [\kappa^2 \eta^{-4} Q_D J(\lambda)]$ (en cm^6)). En aplicaciones basadas en FRET clásica se asume que el factor de

orientación κ^2 es igual a 2/3, que es valor para donantes y aceptores que aleatorizan mediante difusión rotacional antes de la transferencia de energía (Lakovicz, Principles of Fluorescence spectroscopy, segunda edición, página 370). De esta manera, a difusión rotacional aleatoria, se asume que el cambio en la razón es debido sólo a un cambio en la distancia entre los cromóforos. Para dipolos perpendiculares κ^2 es 0.

Según los ejemplos adjuntos, se puede determinar un descenso en la señal FRET mediante la siguiente ecuación: $r(t) = A \times (1 - e^{-t/\tau})$, donde τ es la(s) constante(s) de tiempo y A es la magnitud de la señal. Cuando es necesario para calcular τ , se sustraen los cambios de FRET independientes de agonista debidos a fotoblanqueamiento.

Para aplicar FRET para la detección de agonistas, antagonistas, agonistas parciales y antagonistas parciales así como para agonistas inversos, el experto en la materia es capaz de seleccionar marcadores de detección adecuados (definidos anteriormente) para la proteína quimérica de la invención que muestra FRET detectable y un cambio de FRET detectable tras un cambio conformacional en su estructura. Preferiblemente, la eficacia máxima de FRET es al menos el 5%, más preferiblemente el 50% y lo más preferiblemente el 80% de la energía liberada mediante el primer marcador de detección tras la excitación. Adicionalmente, los dos marcadores de detección necesitan tener una superposición espectral. Cuanto mayor sea la superposición del espectro de emisión del donante con el espectro de absorción del aceptor, mayor es valor de R_0 . Los aceptores con coeficientes de extinción molar grandes producen valores de R_0 mayores. Por el contrario, la superposición en los espectros de excitación de ambas partes de detección debería ser lo suficientemente pequeña para prevenir la coexcitación del cromóforo aceptor. Asimismo, los espectros de ambas partes de detección deberían solo superponerse en tal grado que la discriminación de las dos señales de emisión sea aún posible.

Como se detalla en los ejemplos adjuntos, en una forma de realización particularmente preferida, la primera parte de detección es la proteína fluorescente cian (CFP) y la segunda parte de detección es la proteína fluorescente amarilla mejorada (eYFP).

Se ha mostrado que CFP e YFP son particularmente adecuadas para el péptido quimérico de la presente invención ya que muestran un cambio eficaz en FRET. CFP y eYFP son bien conocidas en la técnica y las moléculas de ácido nucleico que contienen las secuencias codificantes correspondientes están disponibles comercialmente por ejemplo de Clontech. Dichas secuencias de ácido nucleico también se muestran en las SEQ ID NOS: 23 y 24 adjuntas, mientras que las secuencias correspondientes de aminoácidos se muestran en SEQ ID NOS: 21 y 22, respectivamente.

En una forma de realización preferida más de la presente invención los métodos proporcionados aquí se basan en la detección de respuestas o cambios de energía que comprenden un aumento o un descenso de la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). La tecnología BRET es muy bien conocida en la técnica y, entre otros se describe en Angars (2000) PNAS 97, 3684-3689; en Mercier (2002), JBC 277, 44925-44931; en Barcock, (2003), JBC 278, 3378-3385 o en WO 99/66324. Como se ha señalado antes aquí una proteína bioluminiscente preferida es la luciferasa de renilla pero también se puede usar la luciferasa de la luciérnaga. Como parte de proteína fluorescente en el péptido quimérico de la presente invención que comprende la luciferasa de renilla como un primer sistema de detección, se pueden emplear la proteína fluorescente amarilla mejorada o la proteína fluorescente amarilla.

Según los métodos proporcionados aquí en una forma de realización más preferida, el péptido quimérico de la presente invención se localiza, respectivamente insertado, en una membrana biológica. Lo más preferiblemente, dicha membrana biológica es una membrana plasmática de un célula cultivada o es una membrana en (una) célula(s) de un órgano o tejido de un animal transgénico no humano que expresa el péptido quimérico de la presente invención. Se dan y se ilustran más formas de realización de los métodos restantes y/o de identificación de la presente invención en los ejemplos adjuntos. Se debe notar que en el contexto de la presente invención se pueden utilizar varios controles como ya se ha discutido brevemente anteriormente aquí. Por ejemplo, se pueden usar como controles péptidos quiméricos que comprenden sólo un marcador detectable. Tales péptidos quiméricos no proporcionarán ningún cambio en la energía emitida o una respuesta detectable que se pueda medir. De acuerdo con esto, las moléculas a ensayar o compuestos a ensayar o muestras comprendidas bien solas o en combinación, tales moléculas o compuestos se pueden ensayar en experimentos paralelos en péptidos quiméricos de la presente invención, capaces de provocar una respuesta distinta tras el cambio conformacional y péptidos quiméricos que sólo comprenden uno de los marcadores detectables identificadas anteriormente y no son, según esto, capaces de provocar una señal correspondiente, en particular de provocar una transferencia de energía por resonancia. Otra proteína control a emplear según el método de la presente invención es el péptido quimérico que comprende ambos marcadores detectables en el extremo C.

La invención también proporciona una composición de diagnóstico que comprende el péptido quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o los órganos o células del animal transgénico no humano de la invención. Tal composición de diagnóstico es particularmente útil en los métodos de la presente invención.

La invención también se refiere a un kit que comprende el péptido quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector o la célula huésped de la invención u órganos o células del animal transgénico no humano como se ha caracterizado anteriormente.

Las formas de realización divulgadas en relación con el método de la presente invención se aplican, mutatis mutandis, al kit de la presente invención.

De forma ventajosa, el kit de la presente invención comprende además, opcionalmente (un) tampón(es) de reacción, soluciones de almacenamiento, soluciones de lavado y/o reactivos restantes o materiales requeridos para la conducción de ensayos científicos, farmacológicos y de cribado de drogas o similares como se ha descrito aquí. Además, se pueden empaquetar partes del kit de la invención de forma individual en viales o botellas o en combinación en envases o unidades multienvase.

El kit de la presente invención se puede usar de forma ventajosa, entre otros, para llevar a cabo el método para detectar concentraciones de AMPc, distribuciones espacio-temporales de AMPc como se ha descrito aquí y/o se podría emplear en varias aplicaciones a las que se hace referencia aquí, por ejemplo reactivos de cribado para compuestos capaces de activar o inhibir unión a AMPc, así como métodos de cribado para compuestos capaces de influenciar moléculas biológicas, como la adenilato ciclasa o la fosfodiesterasa. Adicionalmente, el kit de la invención puede contener medios para la detección adecuada para fines científicos, médicos y/o diagnósticos. La fabricación de los kits sigue preferiblemente procedimientos estándar que son conocidos para el experto en la materia. El kit de la presente invención es preferiblemente útil en un ensayo de detección como se proporciona aquí.

De forma similar, se proporcionan kits que comprenden los compuestos de la invención, en particular, el péptido quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o los órganos o células del animal transgénico no humano de la invención. Estos kits como se proporcionan aquí son particularmente útiles en los métodos de la presente invención y en particular en la determinación de las concentraciones de AMPc *in vivo* y/o *in vitro*. Estos kits así como los métodos proporcionados aquí también son útiles en cribados farmacéuticos, que también comprenden cribado de "alto rendimiento". La ventaja técnica del péptido quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o los órganos o células del animal transgénico no humano, los kits y métodos de la presente invención es el uso de las construcciones/péptidos quiméricos de la invención como biosensores funcionales. De acuerdo con esto, los compuestos y métodos de la presente invención también son útiles en investigación científica básica, preferiblemente biomédica y/o bioquímica, y en cribados de drogas. La invención también permite el uso de dispositivos específicos que se pueden utilizar para determinar la concentración de AMPc en células vivas y/o organismos. Estos dispositivos son útiles para medir el AMPc con ayuda de los péptidos/construcciones quiméricas de la invención. Los dispositivos comprenden, entre otros, fuentes de luz, sistemas de filtros, sistemas de detección de luz, en particular detectores de emisión.

Además, la invención se refiere al uso del péptido quimérico, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o los órganos o células del animal transgénico no humano como se ha definido anteriormente para la detección de (un) modificador(es) de la actividad biológica de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa *in vitro*.

La invención también se refiere al uso del péptido quimérico o de la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula huésped o los órganos o células del animal transgénico no humano de la invención para la detección de (un) modificador(es) de la unión de AMPc al péptido quimérico de la invención o la actividad biológica de adenilato ciclasas o fosfodiesterasas *in vitro*.

Además, la presente invención se refiere a un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende los pasos del método de la invención para la identificación, caracterización y/o cribado de moléculas que son capaces de interactuar con el péptido quimérico de la invención, adenilato ciclasas o fosfodiesterasas, y que comprende además un paso, en donde se genera un derivado de dicha molécula identificada, caracterizada y/o cribada. Tal derivado se puede generar mediante, entre otros, peptidomiméticos.

La invención se refiere además a un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende los pasos del método de la invención para identificar, caracterizar, cribar y/o derivar moléculas que son capaces de interactuar con el péptido quimérico de la invención, adenilato ciclasas o fosfodiesterasas y la formulación de moléculas identificadas, caracterizadas, cribadas y/o derivadas en una forma farmacéuticamente aceptable.

Las figuras muestran:

Fig. 1. Construcción de proteínas que unen AMPc con etiqueta GFP. Se amplificaron las secuencias que codifican para 1 ó 2 dominios de unión de PKA o EPAC usando PCR y se fusionaron con las de EYFP y ECFP con posterior subclonación y expresión en pcDNA3 (expresión en mamíferos) ó pVL1393 (expresión en células de insecto sf9) como se describe en el ejemplo 1. Se indica una señal FRET relativa para cada proteína quimérica. Las quimeras que contienen ambos dominios de unión a AMPc de la PKA y de EPAC2 o un dominio A de baja afinidad de EPAC2 eran inactivas, mientras que las construcciones con un dominio único de unión a AMPc de alta afinidad resultaron en proteínas sensoras potentes.

Fig. 2. Estructura cristalina de dominio B de unión a AMPc de la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) y EPAC2. Los casetes de unión a AMPc se muestran en amarillo. Se insertaron los fluoróforos (variantes de GFP) en las posiciones marcadas de las hélices alfa adyacentes para producir proteínas sensoras de AMPc funcionales. Tras la unión del agonista se asume un cambio conformacional en el dominio B, que lleva a un cambio en la distancia entre GFPs y en señal de FRET.

Fig. 3. Estructura cristalina de EPAC2 que contiene ambos dominios de unión a AMPc. El dominio A (aminoácidos 12-151) se une al ligando con una afinidad muy baja que no permite que una proteína sensora con GFPs insertada

en las posiciones marcadas en azul (EYFP-E29-K149-ECFP) cambie su conformación en presencia de cantidades fisiológicamente relevantes de AMPc, produciendo una señal de FRET. Las diferentes posiciones marcadas en verde del dominio B de alta afinidad, sin embargo, son adecuadas para obtener un sensor de AMPc muy sensible, que muestra un cambio fuerte en la señal de FRET tras la unión del ligando.

Fig. 4. Cinética de activación de varias proteínas sensoras de AMPc que contienen un único dominio de unión de EPAC2. Se transfectaron de forma transitoria células CHO que expresaban de forma estable el receptor de adenosina A2B, que se acopla a la proteína Gs y activa la producción de AMPc a través de la adenilato ciclasa, con plásmidos que codifican para las diferentes proteínas sensoras, que llevan variantes de GFP en las posiciones señaladas del dominio B de unión a AMPc de EPAC2. 24 horas después de la transfección se midió la FRET en células vivas individuales como se describe la sección de Materiales y Métodos y se evaluó la influencia del agonista (adenosina) a tiempo real. La adición de adenosina a las células dio como resultado un descenso de FRET entre YFP y CFP, lo que implica un cambio conformacional inducido por AMPc que lleva a un aumento de la distancia entre CFP e YFP. Dependiendo de la estructura de la proteína la amplitud y velocidad de la señal eran diferentes, permitiendo optimizar el sensor buscando las posiciones de aminoácidos que producen la señal más prominente.

Fig. 5. A: Cinética de activación de proteínas sensoras de AMPc basadas en un dominio de unión único de EPAC2 (EYFP-E285-E443-ECFP) en células CHO2B comparada con la del sensor de PKA previamente descrito (Zaccolo *et al.*, Nat. cell. Biol. 2000). El nuevo sensor de EPAC2 muestra una señal de activación más rápida que podría ser debido a la presencia de sólo 1 dominio de unión a AMPc de alta afinidad y la ausencia de actividad catalítica (inducción de la desensibilización a través de la activación de la fosfodiesterasa) en contraste con la PKA, que tiene 4 sitios de unión que actúan de forma cooperativa y poseen propiedades de activación de la fosfodiesterasa. B. Fotos mediante imágenes celulares de células CHO a tiempos diferentes después de la adición de agonista. El descenso en la razón determinada (pérdida del color rojo) representa un aumento en la concentración intracelular de AMPc. Los experimentos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos y la leyenda de la Fig. 3.

Fig. 6. Medidas de AMPc *in vitro*. A. Espectros de emisión de fluorescencia de lisados de células TSA-HEK293. Las células se transfectaron de forma transitoria con un plásmido que codifica un sensor basado en EPAC2 (EYFP-E285-E443-ECFP). 24 horas después de la transfección se prepararon lisados celulares y se tomaron los espectros de emisión después de la adición de diferentes concentraciones de agonistas como se describe en Materiales y Métodos. El descenso en la intensidad a 525 nm con su aumento 475 nm representa una pérdida de la señal FRET entre CFP e YFP. B. Se pudo representar la relación de la intensidad de señal a 475 nm/intensidad a 525 nm frente a concentraciones de AMPc en una curva de saturación para medidas posteriores precisas de la concentración de AMPc en diferentes muestras desconocidas.

Fig. 7. Desarrollo de un sensor de AMPc anclado a la membrana basado en la construcción de EPAC2 (E285-E443). A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO2B transfectadas con diferentes construcciones que codifican proteínas sensoras de AMPc. Se representan la emisión de fluorescencia a 583 ± 15 nm (YFP) y 480 ± 20 nm (CFP). La introducción de una secuencia corta en el N-terminal de la quinasa Lyn mostrada en la figura 7C produce que la proteína fluorescente sensora vaya a diferentes localizaciones de la membrana plasmática como se revela por microscopía confocal (Fig. 7B).

Fig. 8. A. Cinética de activación de proteínas sensoras de AMPc basadas en un dominio de unión único de EPAC1 (EYFP-E157-E316-ECFP) y PKA (EYFP-M264-A403-ECFP) en células CHO2B comparada con la de la construcción de EPAC2 (EYFP-E285-E443-ECFP). Las secuencias homólogas de EPAC1 y PKA muestran propiedades cinéticas similares al dominio de unión de EPAC2, lo que permite usarlas para producir una proteína sensora de AMPc. B. Poner EYFP en la posición G390 del dominio de unión de EPAC2 produce una proteína sensora con mayor amplitud que los mutantes previamente descritos. Los experimentos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos y en la leyenda de la Fig. 3.

Fig. 9. No se observaron cambios en FRET dependientes de agonista en células CHO2B que expresan una proteína de fusión que contiene dos sitios de unión de AMPc de las subunidades RII de la PKA (construcción de PKA 1: EYFP-E103-II-A+B-A416-etiqueta HA-ECFP) determinado mediante detección fotométrica de FRET en células individuales.

Fig. 10. Se observaron cambios en FRET dependientes de agonista en células CHO2B que expresan una proteína de fusión que contiene un solo sitio de unión de AMPc (sitio B; construcción de PKA 2: EYFP-M264-II B-A416-etiqueta HA-ECFP) de las subunidades RII de la PKA determinado mediante detección fotométrica de FRET en células individuales

Fig. 11. Construcción de sensores de AMPc basados en un único dominio de unión del canal de iones HCN2 regulado por AMPc. Las clonaciones se realizaron como se describe en la leyenda de la Fig. 1. Se indica el cambio relativo en FRET tras la estimulación del agonista.

Fig. 12. Medidas de AMPc usando la construcción basada en el HCN2 murino (A467-K638). A. estructura cristalina del dominio de unión de HCN2 con AMPc unido (Zagotta, Nature, 2003; 425: 200-205). Las posiciones de inserciones de GFP mostradas en azul produjeron construcciones funcionales (Fig. 11). B. Medidas de FRET en células HEK 293 vivas estimuladas con isoprotrenol $10 \mu\text{M}$ a través de los receptores beta2-adrenérgicos endógenos. Las

células se transfectaron con el sensor basado en HCN2 (A467-K638). Se demuestra un descenso en FRET dependiente de AMPc.

Fig. 13. Dependencias de repuesta a concentración (medidas como se describe en la leyenda de la Fig. 6) para los sensores basados en los diferentes dominios de unión a AMPc. Las diferentes construcciones mostraron diferentes afinidades por AMPc, permitiendo de esta manera medidas de este segundo mensajero en un amplio intervalo de concentraciones fisiológicamente relevante: desde 20 nM hasta 100 μ M.

Fig. 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de unión a AMPc de Epac1, Epac2, subunidad reguladora II β de la PKA y canal de iones HCN2. Se muestran en negrita los residuos muy conservados incluyendo glicinas (G) y arginina (R) que participan en la unión a AMPc. Como se ha documentado, un “dominio de unión a AMPc” (un esqueleto mínimo para un sensor inventivo, *subrayado*) es una parte de una secuencia que comprende residuos implicados directamente en una interacción con AMPc y estabiliza la arquitectura del sitios de unión. Sin estar unido mediante teorías, estos incluyen todas las láminas β que empiezan por una L conservada para Epac1, 2 y HCN2 (bajo β 1) o con un motivo IGT para PKA y una parte C-terminal de la hélice α -B que incluye el residuo muy conservado F, que se supone interacciona con el muy conservado L (mostrado en paréntesis) para estabilizar la arquitectura del dominio (como se describe en Rehmann *et al.*, Nat. Struct. Biol. 2003, 10: 26-32). En el caso de HCN el dominio de unión a AMPc se extiende hasta el residuo I636, ya que dicho residuo está implicado en la unión al ligando (Zagotta, Nature, 2003; 425: 200-205). Además la Fig. 14 muestra los sitios de unión a AMPc definidos según esta invención. Estos se muestran en cursiva (14 aminoácidos desde “FG” hasta “A”) y comprenden, preferiblemente, 14 aminoácidos.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción y expresión de indicadores fluorescentes

Las construcciones de ADN que codifican las proteínas sensoras de AMPc se generaron mediante PCR usando los ADNc de EPAC1 humano, EPAC2 murino o la subunidad reguladora II de la PKA murina como molde. Las variantes de GFP (EYFP y ECFP) se amplificaron con cebadores estándar a partir de los plásmidos pEYFP-Tub y pECFP (Clontech). Las secuencias para los dominios de unión a AMPc se clonaron junto con las de EYFP y ECFP en el vector pcDNA3 (Invitrogen) para expresión transitoria en células de mamífero (ver la Fig. 1 para detalles estructurales). Para dirigir las construcciones EPAC a la membrana plasmática se insertó la secuencia adicional N-terminal MBCINSKRKD que codifica para sitios de miristilación y palmitoilación usando los oligonucleótidos

5'-GATCCGATATCATGGGATGTATCAATAGCAAGCGCAAAGATG-3' y

5'-CTAGCATCTTTGCGCTTGCTATTGATACATCCCATGATATCG-3'.

Ejemplo 2

Cultivo de células

Las células CHO que expresaban de forma estable el receptor de adenosina A2B y las células TSA-HEK 293 se mantuvieron en medio DMEM/F12 (37%, CO₂ al 5%) o DMEM (37%, CO₂ al 7%), respectivamente, se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 24 mm para experimentos de obtención de imágenes o en placas Petri de 90 mm para medidas fluorimétricas en cubeta y se transfectaron con 3 μ g o 30 μ g de ADN para cada construcción usando el método del fosfato de calcio. Las células transfectadas se analizaron 24 h después.

Ejemplo 3

Medidas de FRET e imágenes celulares

Para la microscopía de fluorescencia se transfirieron cubreobjetos de vidrio con células adherentes a la cámara experimental en tampón, que contenía NaCl 144 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM pH 7,3, a temperatura ambiente y se colocaron en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 63x Plan-Neofluoran, sistema fotométrico de emisión dual (Till Photonics) y cámara CCD “CoolSNAP Photometrics”. Las muestras se excitaron con una luz de Polychrom IV (Till Photonics). La FRET se determinó usando software MetaFluor 5.0r6 (Universal Imaging Corp.) como la razón de emisión a 535 $\pm$ 15 nm y 480 $\pm$ 20 nm tras excitación a 436 $\pm$ 10 nm. Los datos de imágenes se analizaron mediante software Metamorph 5.0r6 (Universal Imaging Corp.) y se corrigieron para contaminación de CFP en el canal de 535 nm, así como para fotoblanqueado del aceptor para dar una razón corregida F535nm/F480nm. Para estudiar cambios en FRET inducidos por agonista, las células se sometieron a superfusión continua en una solución con tampón de medida y adenosina (Sigma).

Ejemplo 4

Medidas de fluorescencia in vitro

- 5 Se lavaron células TSA-HEK 293 con PBS frío 24 horas después de la transfección, se recogieron de la placa y se resuspendieron en tampón Tris 5 mM, EDTA 2 mM a pH 7,3. Después de 40 s en Turrax en hielo y centrifugación de 20 minutos a 80000 rpm se midieron los espectros de emisión de fluorescencia del sobrenadante (excitación a 436 nm, intervalo de emisión 460-550 nm) con espectrómetro de luminiscencia LS50B (Perkin Elmer) antes y después de
 10 añadir concentraciones variables de AMPc, GMPc y ATP (Sigma). Se representaron las curvas de saturación de AMPc usando software KaleidaGraph 3.0.5 (Abelback) y se ajustaron a la ecuación $100 \cdot m_0 / m_3 + m_0$ ($m_3=50$, media EC_{50}).

Ejemplo 5

Medida de las concentraciones de AMPc

- 15 Las medidas de AMPc se pueden realizar usando un método óptico basado en la FRET entre dos fluoróforos (por ejemplo ECFP y EYFP), directamente fusionados a un dominio de unión a AMPc único de proteínas reguladas por AMPc. Como se muestra en la Fig. 1 y la Fig. 11, se podrían construir sensores funcionales a partir de Epac1, Epac2, la subunidad reguladora de la PKA o el canal de iones HCN2. Estas proteínas tienen una secuencia de unión a AMPc, caracterizada por varios aminoácidos muy conservados, que participan en la unión a AMPc (Fig. 14, residuos en
 20 negrita). Las medidas de AMPc basadas en FRET usando dichas construcciones inventivas son posibles debido a un cambio conformacional en el dominio de unión a AMPc, que produce un descenso en la distancia entre los fluoróforos que da como resultado un pérdida de FRET que se podría ver en células vivas individuales (Fig. 5, Fig. 8. Fig. 12B) o *in vitro* (Fig. 6). La pérdida de FRET se mide como un descenso en la razón de la intensidad YFP/CFP, la unión de
 25 AMPc al sensor produce un descenso en la intensidad de YFP con un aumento simultáneo en CFP, dando un descenso en la razón YFP/CFP. Usando construcciones basadas en dominios únicos de unión a AMPc (que sólo comprenden un sitio de unión a AMPc), se puede medir la concentración de AMPc en un intervalo fisiológico amplio desde 1 nM a 100 μ M, en particular de 200 nM a 50 μ M; ver, por ejemplo, la Figura 13.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un péptido quimérico, que comprende:

- (a) un grupo de unión a AMPc que tiene un solo sitio de unión a AMPc; y
- (b) al menos dos marcadores detectables, donde un primer de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo carboxi y un segundo de dichos dos marcadores detectables está situado en el extremo amino del grupo de unión a AMPc de (a).

2. El péptido quimérico de la reivindicación 1, en donde el sitio de unión a AMPc del grupo de unión a AMPc se une a AMPc con alta afinidad.

3. El péptido quimérico de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho sitio de unión a AMPc del grupo de unión a AMPc se une a AMPc con una Kd en el intervalo de 1 nM a 50 mM.

4. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el grupo de unión a AMPc se selecciona del grupo que consiste en la subunidad reguladora (R) de una proteína quinasa dependiente de AMPc, factor de intercambio de nucleótidos de guanina, proteína activadora de gen catabólico, canal de iones operado por AMPc, esterasa diana de neuropatía (NTE) y receptor de AMPc.

5. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el grupo de unión a AMPc es de PKA, EPAC1, EPAC2, el canal de iones HCN2, proteína activadora de gen catabólico de *E. coli*, canales de iones operados por AMPc, esterasa diana de neuropatía (NTE) o receptor de AMPc de Dictyostelium.

6. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha PKA, EPAC1, EPAC2 o canal de iones HCN2 es de origen humano, de ratón o de rata.

7. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los marcadores detectables son marcadores fluorescentes o bioluminiscentes.

8. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos marcadores fluorescentes se seleccionan del grupo que consiste en GFP, YFP, CFP, BFP, citrina, zafiro y dsRed, o en donde dichos marcadores bioluminiscentes es luciferasa (como luciferasa de renilla o luciferasa de luciérnaga).

9. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el grupo de unión a AMPc se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un grupo de unión a AMPc de un polipéptido como se muestra en SEQ ID Nos: 1 a 7 y 74;
- (b) un grupo de unión a AMPc como se muestra o comprende en cualquiera de las SEQ ID Nos: 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36 y 37;
- (c) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de las SEQ ID Nos: 8 a 20;
- (d) un grupo de unión a AMPc comprendido en cualquiera de las SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73; y
- (e) un grupo de unión a AMPc que es al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% idéntico a un grupo de unión a AMPc según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el grupo de unión a AMPc de (a) a (d).

10. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho péptido quimérico se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 70 y 72;
- (b) un péptido quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID Nos: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71 y 73;
- (c) un péptido quimérico codificado por una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos el 70% idéntico a un polipéptido definido en (a) o (b) y que se puede usar para la determinación directa de la concentración de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*; y
- (e) un péptido quimérico que está codificado por una molécula de ácido nucleico que es degenerada de una secuencia de ADN como se define en (a) y (c).

ES 2 305 906 T3

11. El péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la determinación directa de la concentración de AMPc *in vitro* y/o *in vivo*.

12. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

14. El vector de la reivindicación 13, que es un vector de expresión.

15. Un huésped no humano transformado con el vector de la reivindicación 13 ó 14 con la molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

16. El huésped de la reivindicación 15 que es una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, un célula fúngica, una célula vegetal o una célula bacteriana, o un animal transgénico no humano, en donde dicha célula de mamífero no es una célula embrionaria humana.

17. El huésped de la reivindicación 16, en donde dicha célula de mamífero es una célula CHO, célula HEK 293, HeLa, Cos 7, PC12 ó NIH3T3.

18. El huésped de la reivindicación 16, en donde dicha célula de anfibio es un oocito, preferiblemente un oocito de xenopus.

19. Un método para producir un péptido quimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende cultivar/crecer el huésped de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 y, opcionalmente, aislar y/o purificar el péptido quimérico producido.

20. Un método para determinar la concentración de AMPc en una muestra, que comprende:

(a) añadir el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 u obtenible mediante el método de la reivindicación 19 o una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 a la muestra; y

(b) medir/registrar FRET o BRET y determinar la concentración de AMPc en la muestra comparando los valores de la emisión de fluorescencia con una curva patrón obtenida con concentraciones definidas de AMPc.

21. Un método para seguir a lo largo del espacio y tiempo la cantidad/distribución/localización/fluctuación de AMPc en una célula viva o un tejido, que comprende:

(a) transformar una células o tejido con el ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o con el vector de la reivindicación 13 ó 14; y

(b) medir/registrar FRET o BRET en la célula viva o tejido.

22. Un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de activar o inhibir la unión de AMPc al péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende los pasos de:

(a) transfectar el ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o el vector de la reivindicación 13 ó 14 en una célula;

(b) poner en contacto dicha célula con (una) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar; y

(c) medir si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar produce(n) un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

23. Un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de activar, desactivar o inactivar la función (biológica/farmacológica) de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de:

(a) transfectar el ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o el vector de la reivindicación 13 ó 14 a una célula que expresa una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa;

(b) poner en contacto dicha célula con (una) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar; y

(c) medir si dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar produce(n) un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

24. Un método de cribado para moléculas o compuestos que son activadores (agonistas) o inhibidores (antagonistas) de la función (biológica/farmacológica) de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de:

- (a) transfectar el ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o el vector de la reivindicación 13 ó 14 a una célula que expresa una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa;
- (b) poner en contacto dicha célula con (una) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar;
- (c) medir y/o detectar un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y
- (d) comparar dicho cambio en energía a una respuesta estándar medida en ausencia de dicha(s) molécula(s)/compuesto(s) candidato(s).

25. Un método para identificar moléculas o compuestos que son capaces de provocar una respuesta (biológica/farmacológica) de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa, que comprende los pasos de:

- (a) transfectar el ácido nucleico definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 o el vector de la reivindicación 13 ó 14 a una célula que expresa una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa;
- (b) poner en contacto dicha célula con (una) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar; y
- (c) identificar entre estas moléculas/compuestos las moléculas/compuestos que son capaces de provocar un cambio en la energía emitida por dichos dos marcadores detectables comprendidos en el péptido quimérico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, aminoácidos y/o derivados de los mismos o iones.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, donde dicha(s) molécula(s) o compuesto(s) a ensayar es(son) (un) anticuerpo(s).

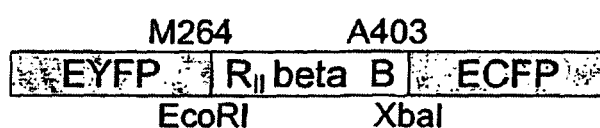
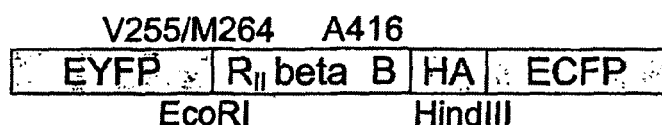
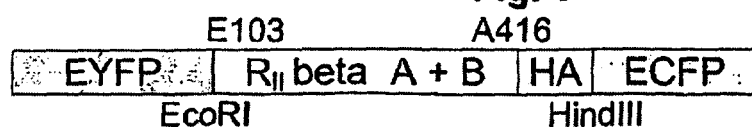
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, donde dicho cambio en energía es un aumento o descenso de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, donde dicho cambio en energía es un aumento o descenso de la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

30. Un kit que comprende el péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la molécula de ácido nucleico definida en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, el vector de la reivindicación 13 ó 14, la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 u órganos o células del animal transgénico no humano de la reivindicación 16.

31. Uso del péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la molécula de ácido nucleico definida en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, el vector de la reivindicación 13 ó 14, la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 u órganos o células del animal transgénico no humano de la reivindicación 16 para la detección de (un) modificador(es) de la actividad biológica de una adenilato ciclasa o una fosfodiesterasa *in vitro*.

32. Uso del péptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, la molécula de ácido nucleico definida en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, el vector de la reivindicación 13 ó 14, la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para la preparación de un kit para su uso en ensayos biológicos, farmacológicos, y/o de cribado de drogas.

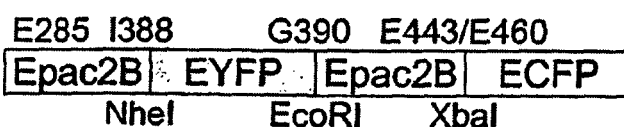
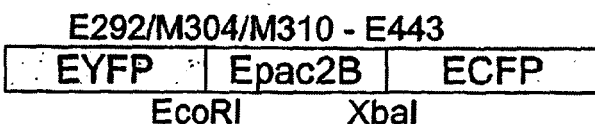
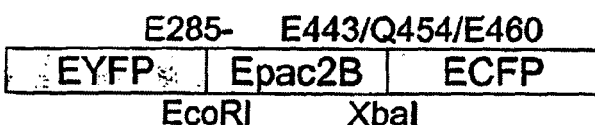
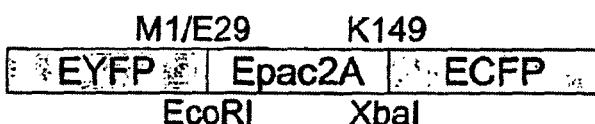
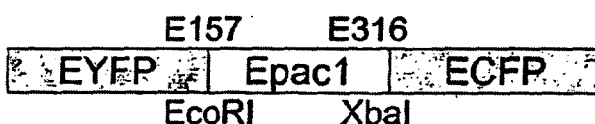
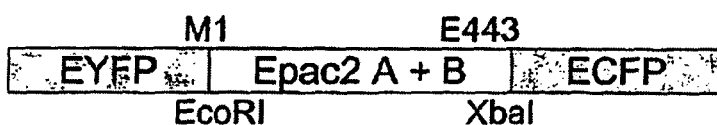
Construcciones de PKA Fig. 1**Señal de FRET**

—

+

+++

++

Construcciones de Epac

—

+++

—

+++//+

++++/+++//+++

+++//+

Fig. 2

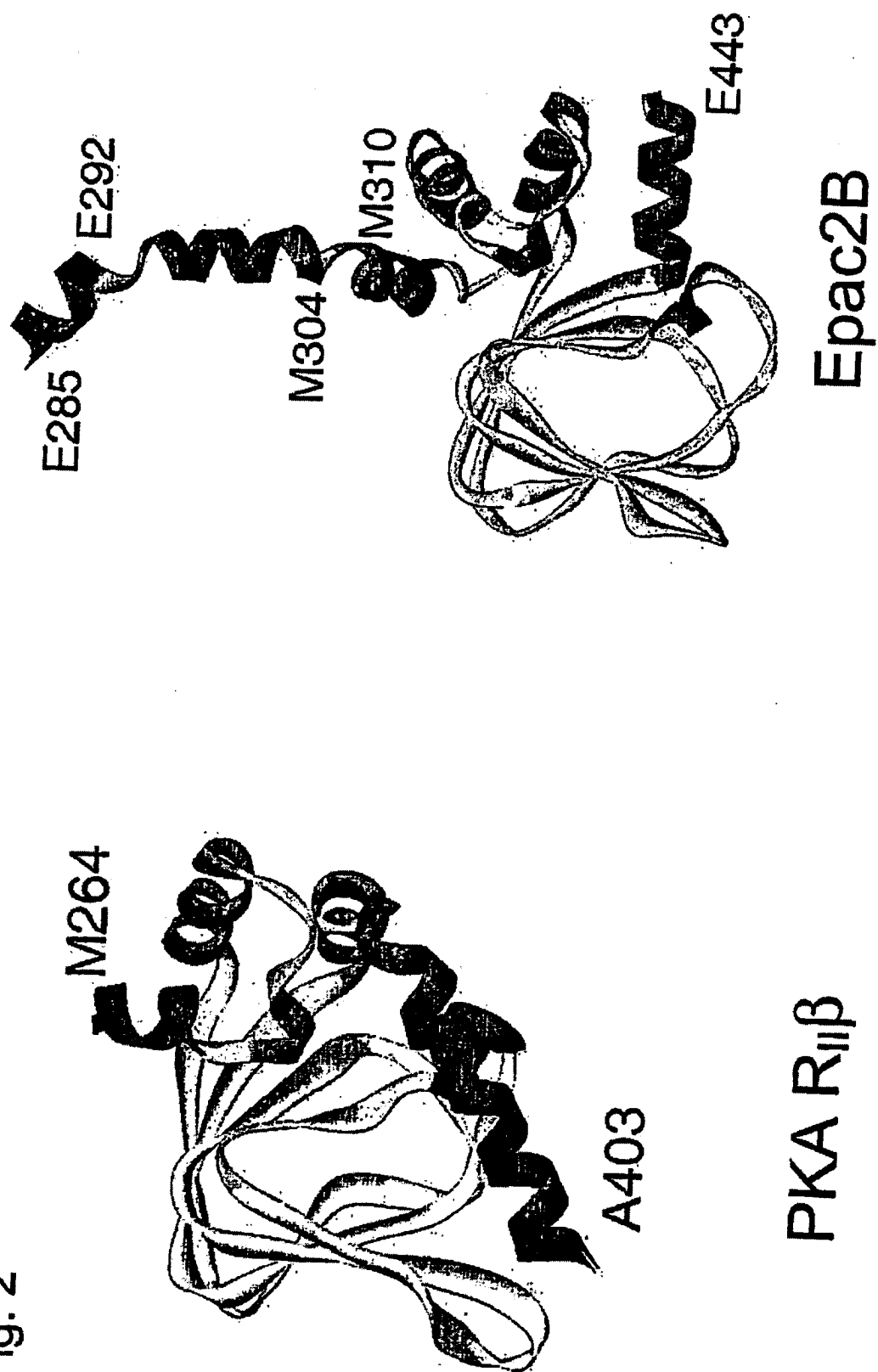


Fig. 3

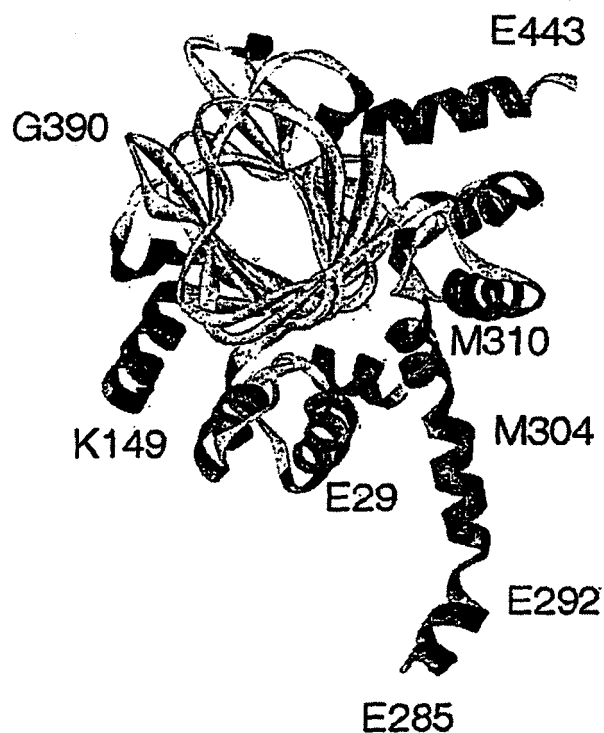


Fig. 4

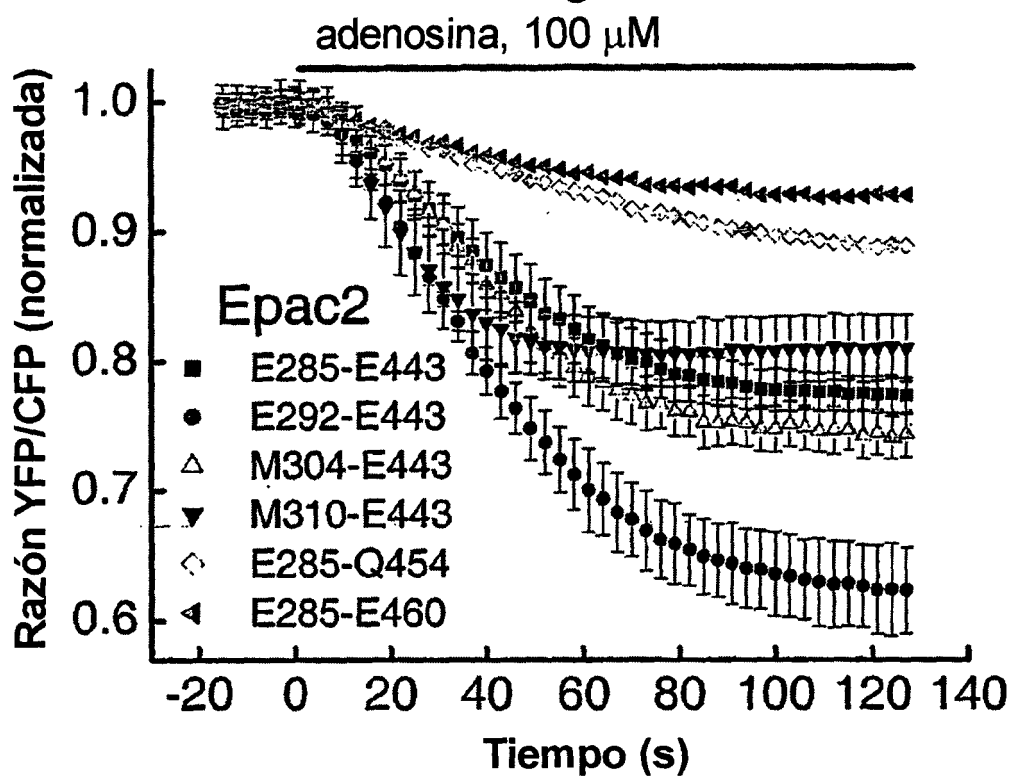


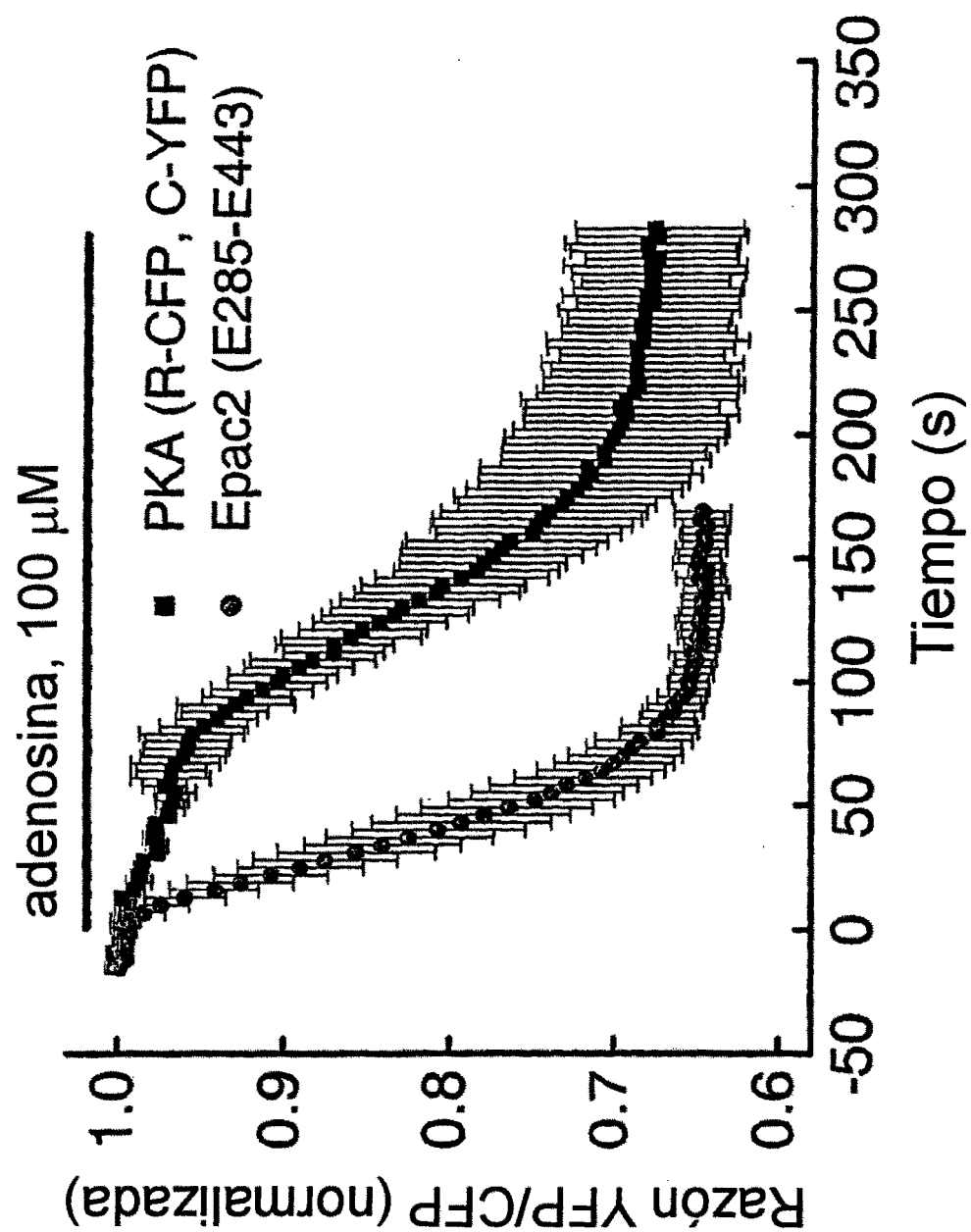
Fig. 5
A

Fig. 5
B

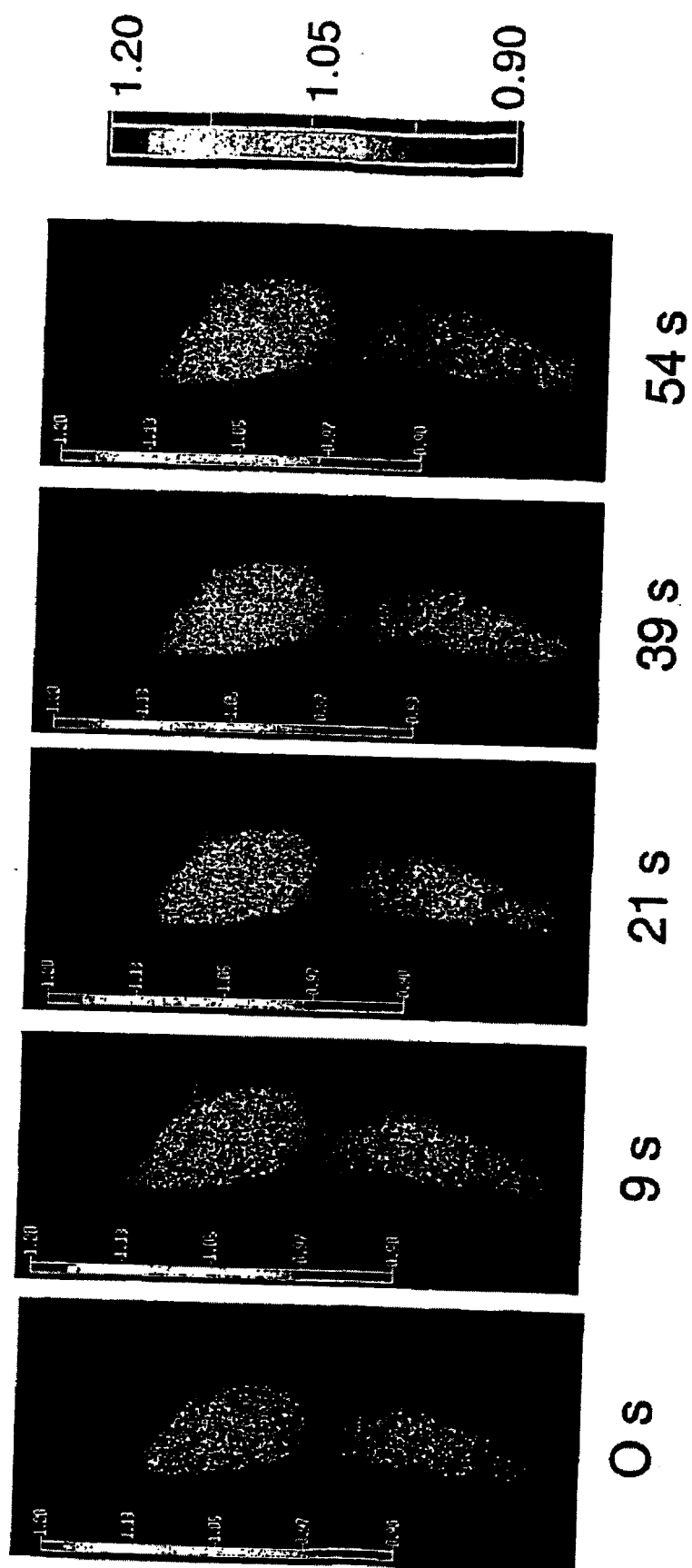
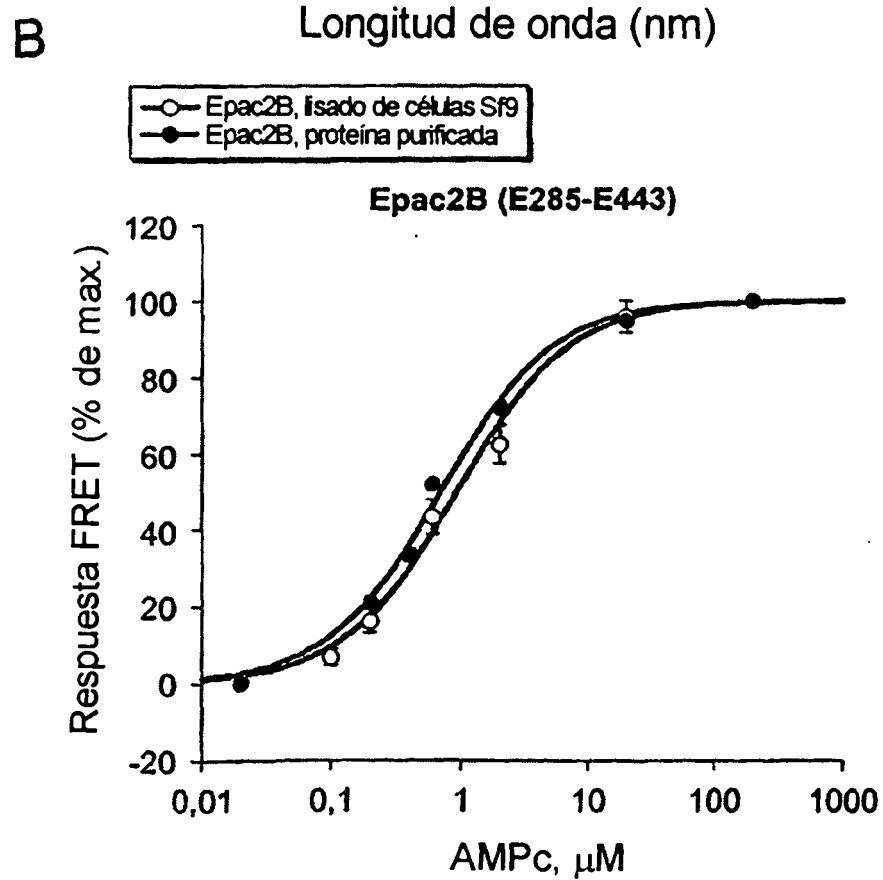
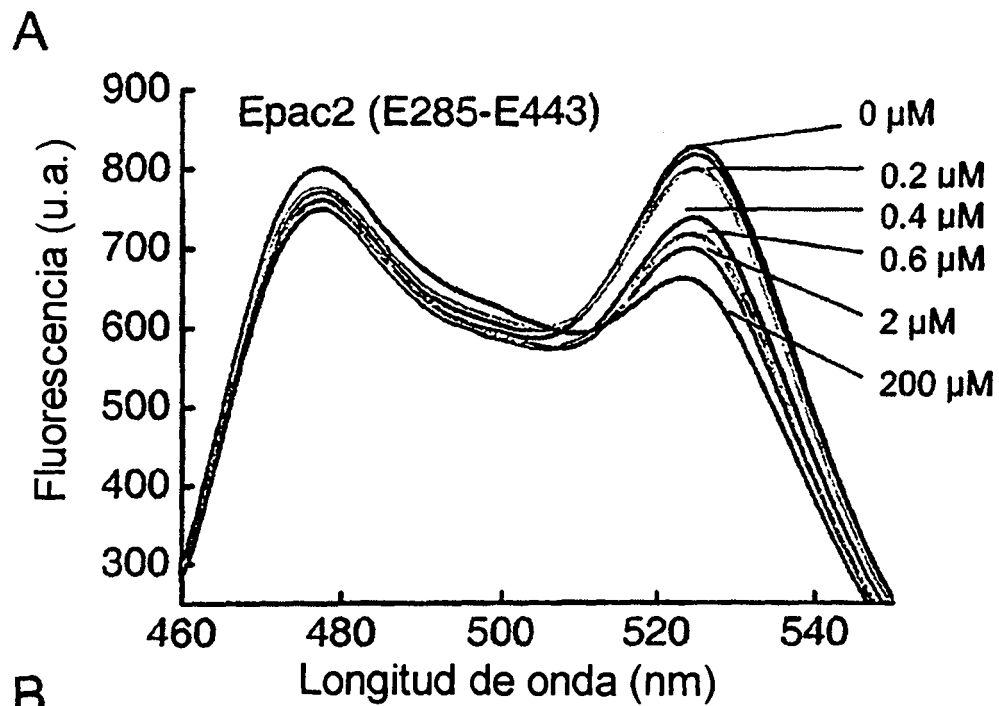


Fig. 6



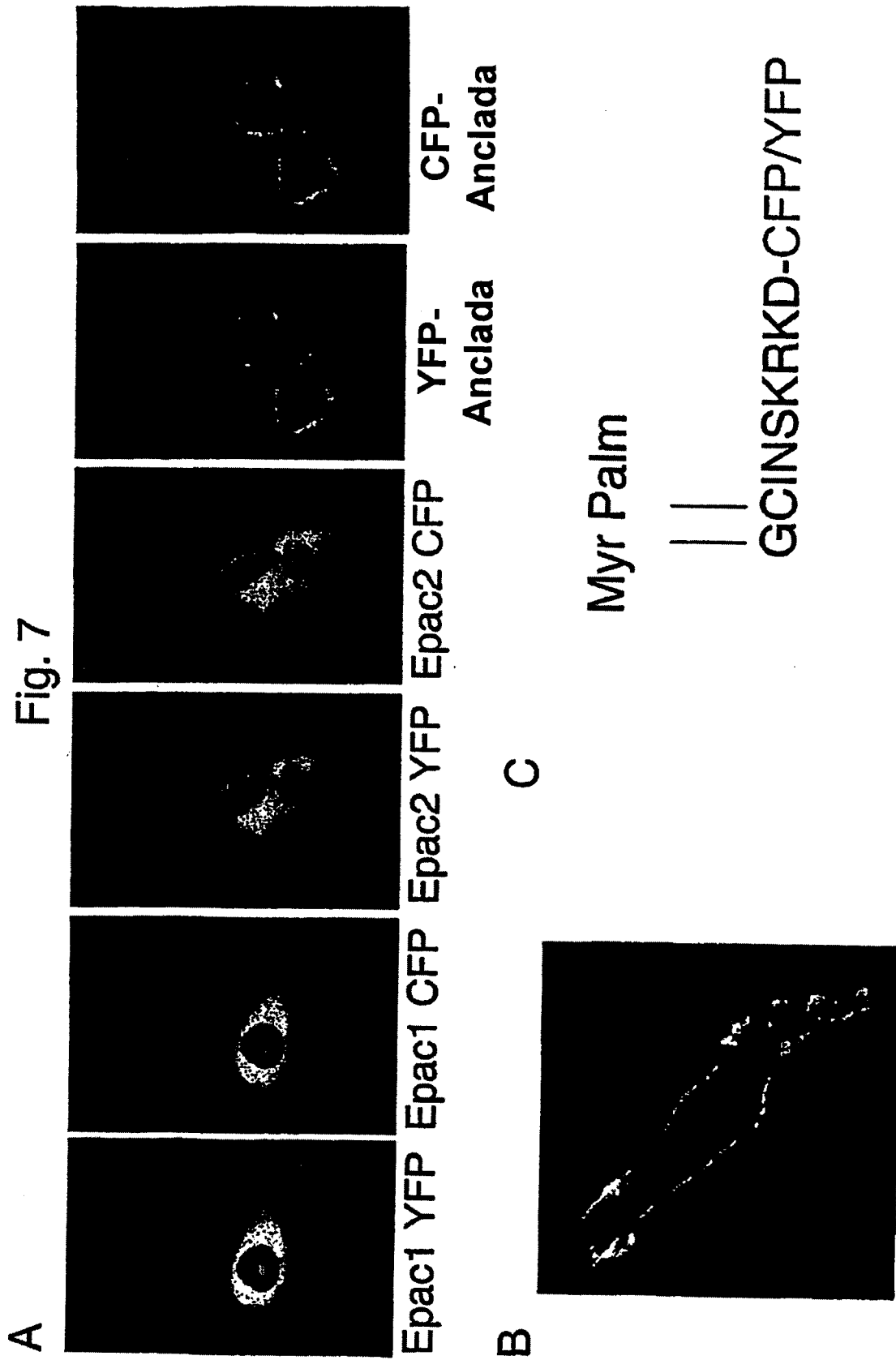
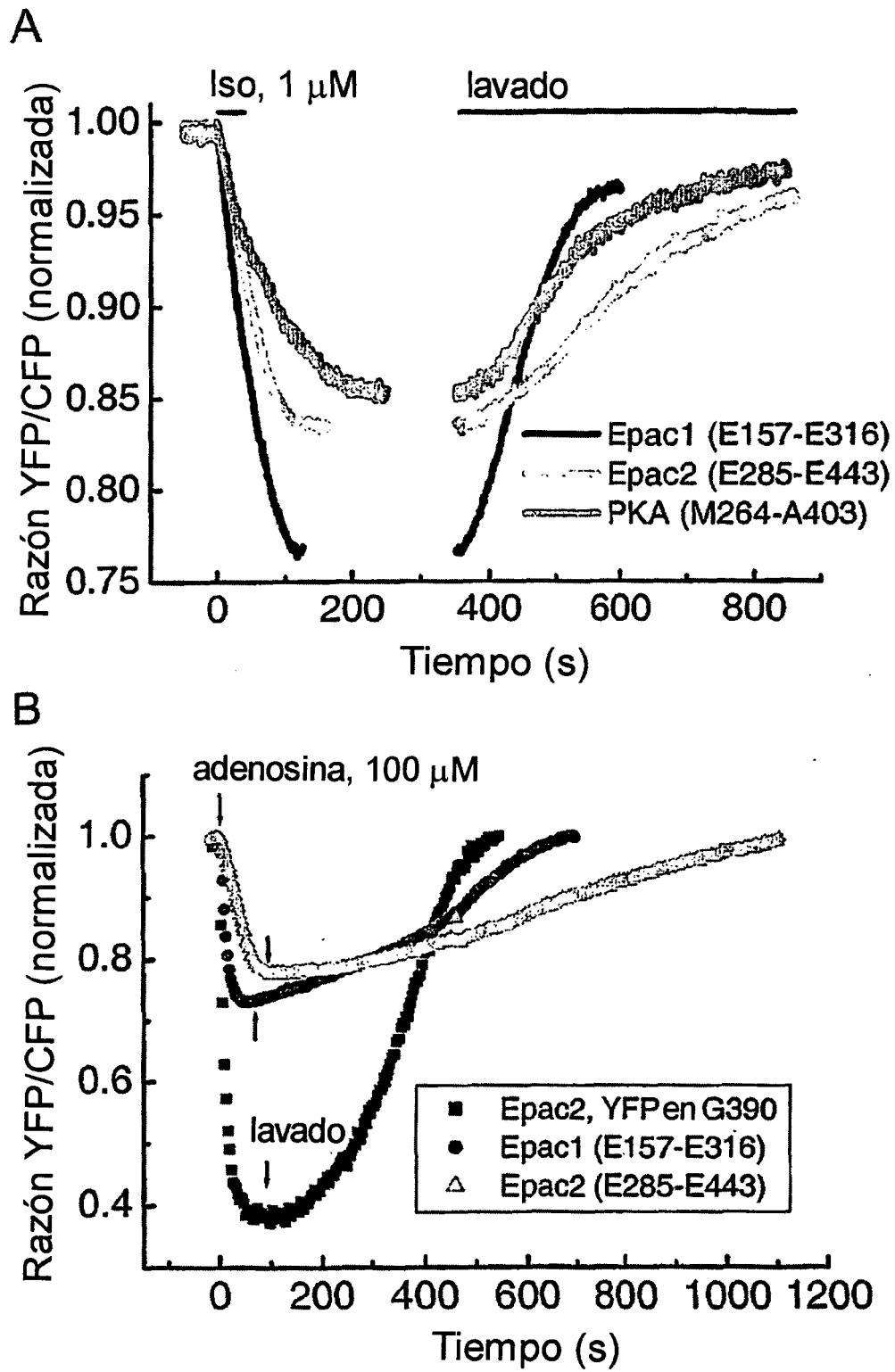
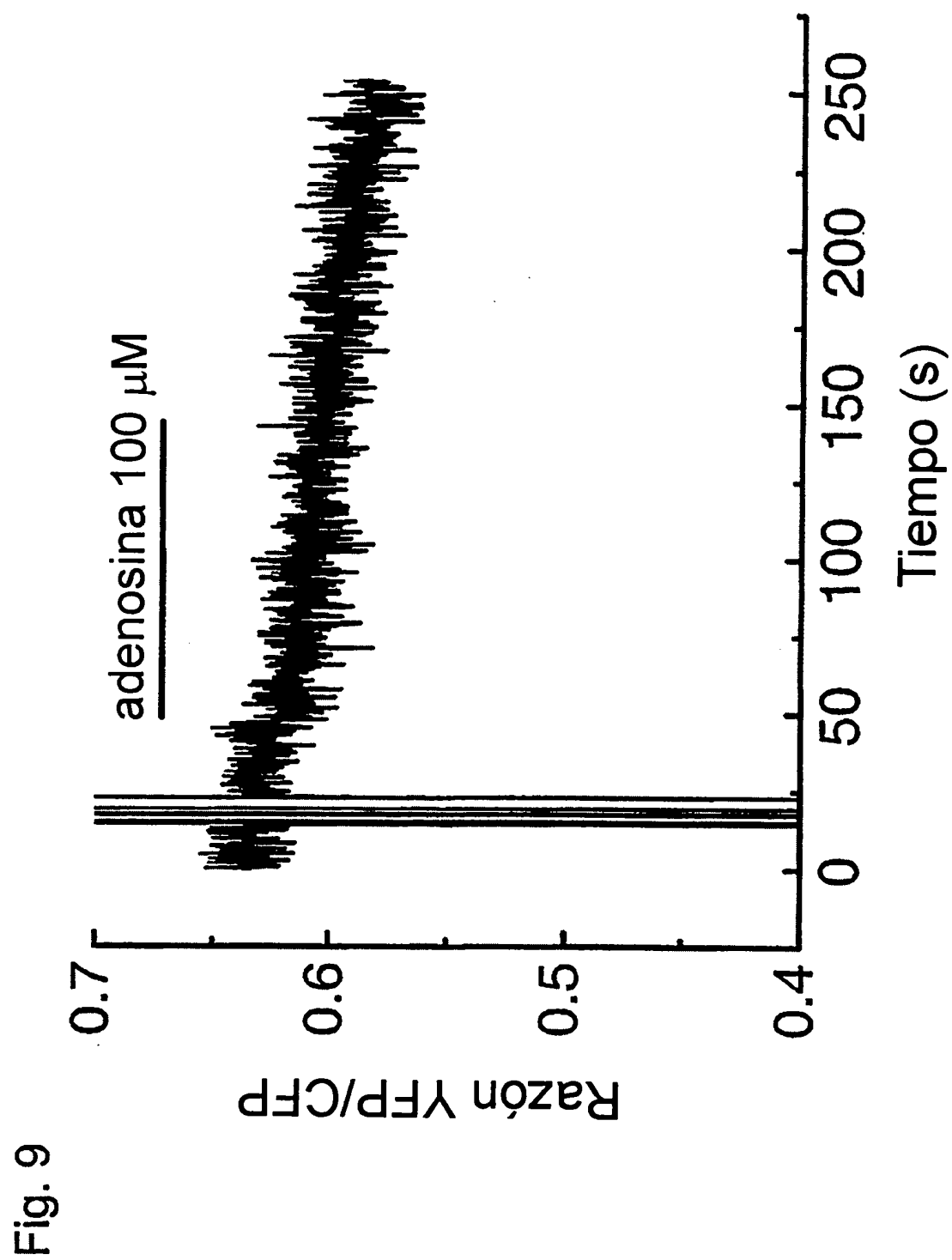


Fig. 8





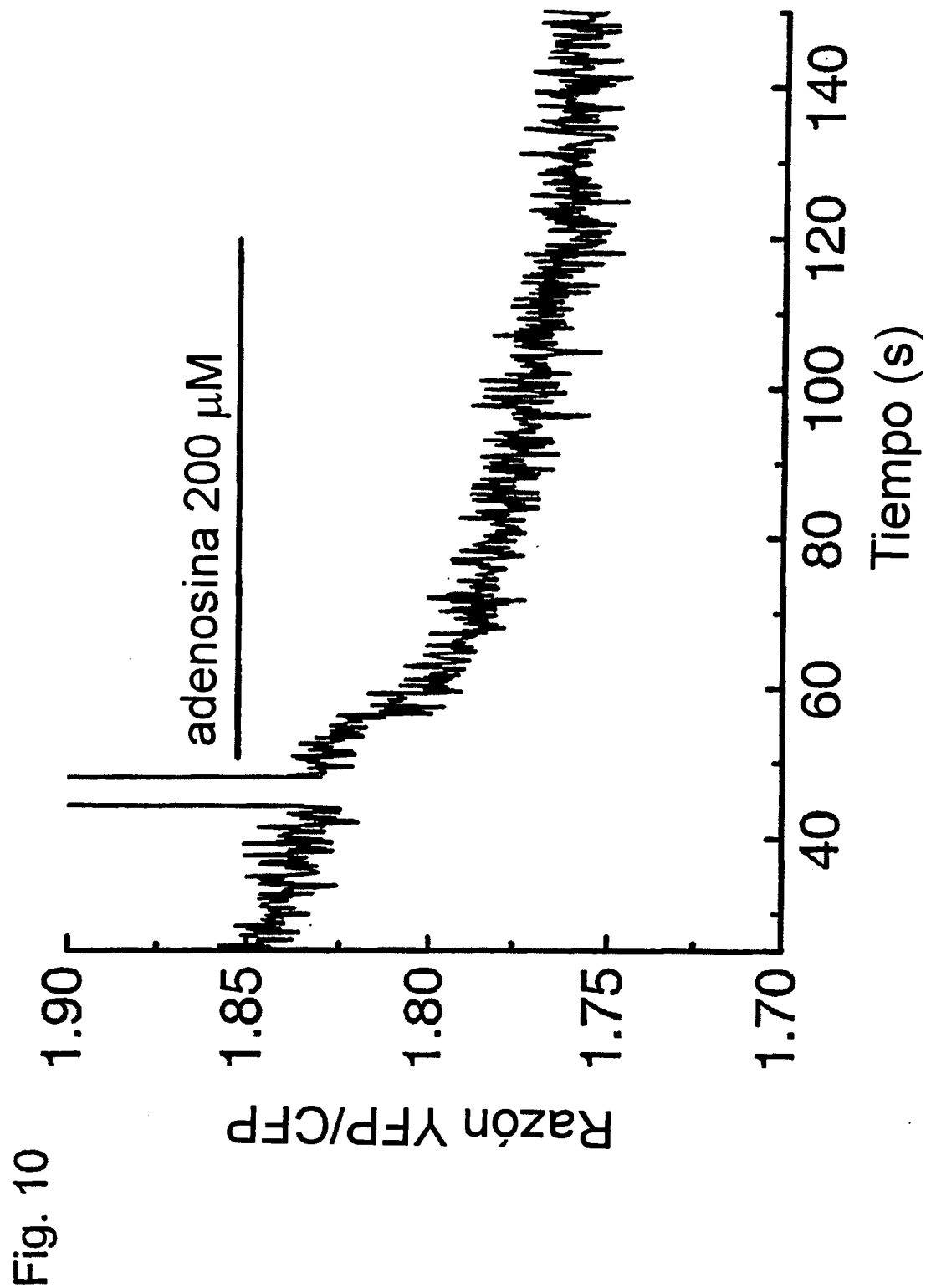
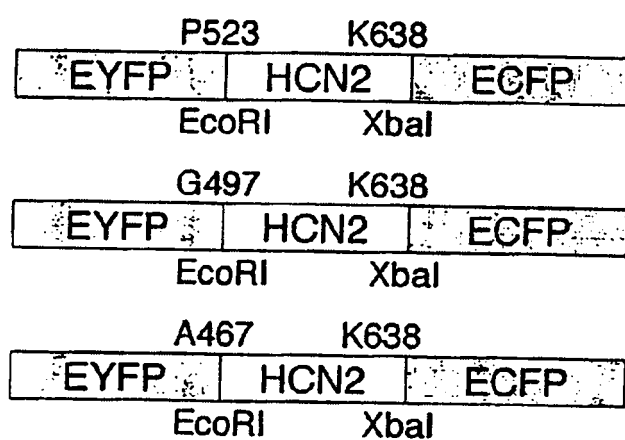


Fig. 11

Construcciones HCN2



**Señal de
FRET**

+

++

+++

Fig. 12

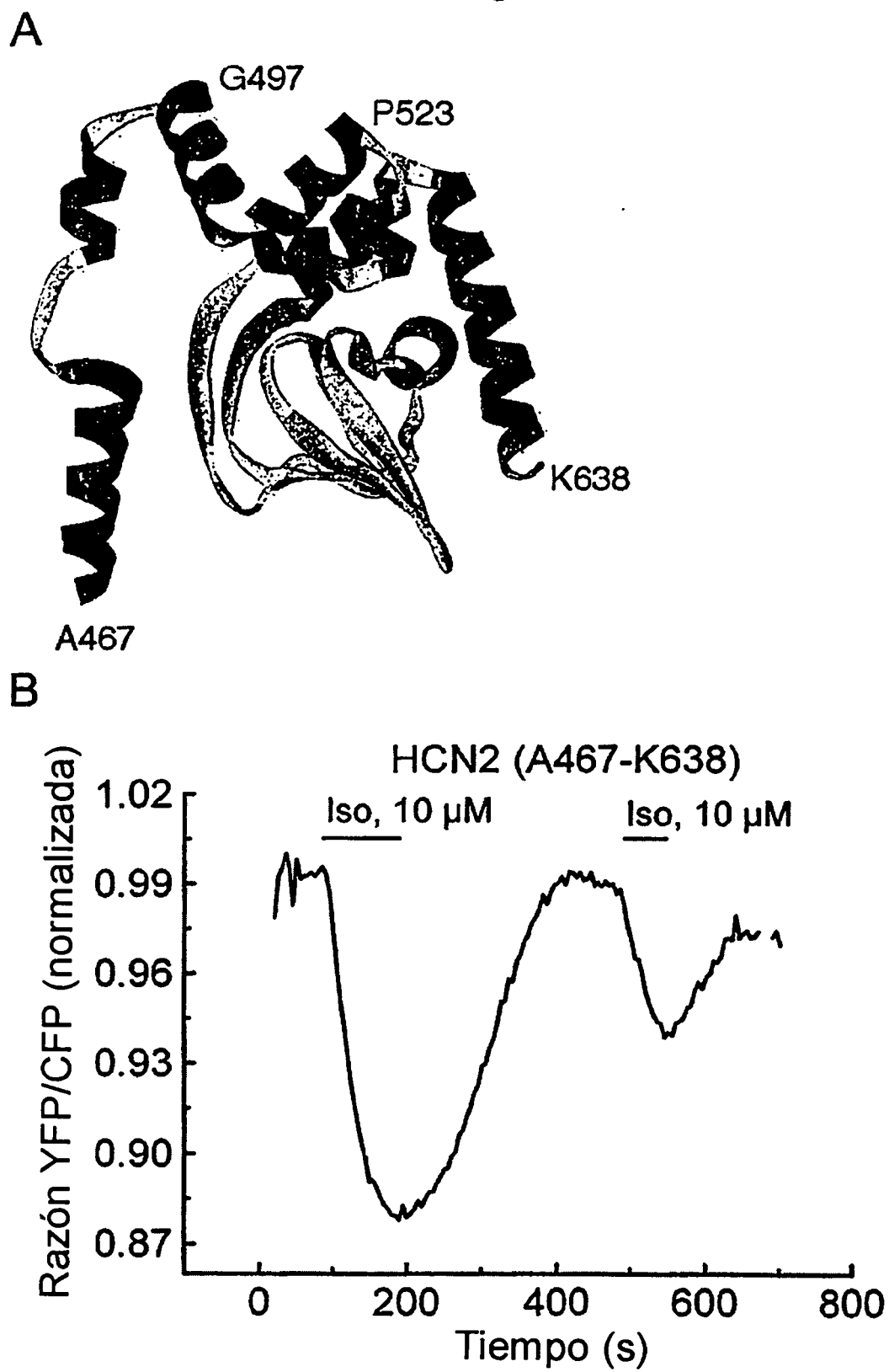


Fig. 13

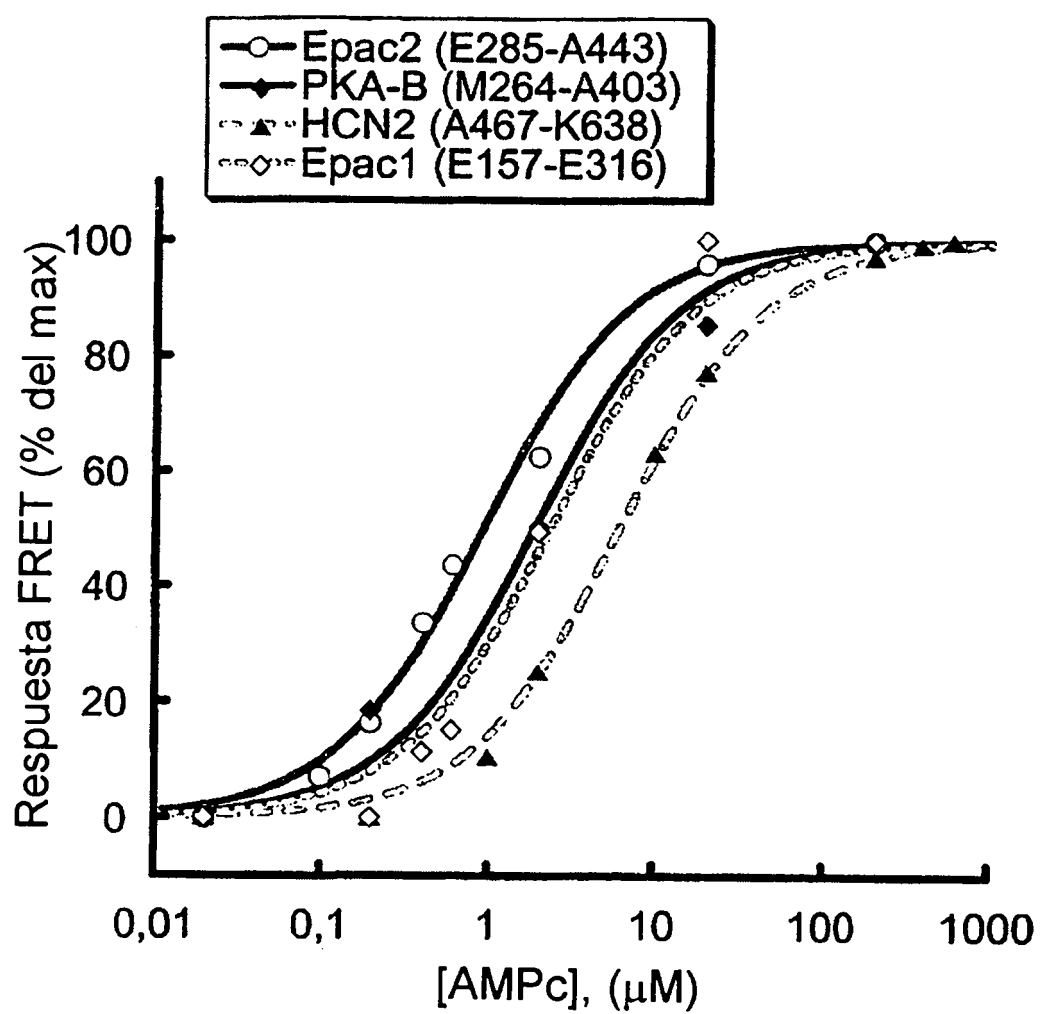


Fig. 14

EPAC1	-----EELAEAVALLSQRGPDALLTVALRKPPGQRTDEELDLIFEELLHIKAVAHLSN
EPAC2	EKKCEDEELQDTMLLLSQMGPDAMRMILRKPPGQRTVDDLEIIYDELLHIKALSHLST
PKA Iiβ	-----MYESFIESLPFLKS-----LEVSE-----LKVVDVIGT
HCN2	---ADFRQKIHDYIEHRYQGKMFDEDSILGELNGPLREEIVNFNCRKLVASMPPLFANADP
	<i>αα β1</i>
EPAC1	SVKRELAAVLLFEPPHAKAGTVLFSQDGKGTWYIIWKGSVNVVTHGKGLVTTLHEGDDDFG
EPAC2	TVKRELAGVLIIFESHAKGGTVLFNQEEGTWYIIWKGSVNVVVIYKGVVCTLHEGDDDFG
PKA Iiβ	KVYND-GEQIIAOGDSADSFIVESGE--VRITMKRRKGKSDIEENGAVEIARCLRGQYFG
HCN2	NFVTAMLT TKLKFVFPQ -DYIIREGTIGKKMYFIOHGVS VLTKGN-KEMKLS SGSYFG
	<i>α-B</i>
EPAC1	<u>OLALVNDAPRAATIILREDNCHFLRV</u> DKQDFNRII-----KDVEAKTMRLEE-----
EPAC2	<u>KLALVNDAPRAASIVLREDNCHFLRV</u> DKEDFNRI-----RDVE-----
PKA Iiβ	<u>ELALVTNKPRAASAHAIG-TVKCLAMDVOA</u> FERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVA-----
HCN2	<u>EICLLTRGRRTASVRADT-YCRLYSLSVDN</u> FNFEVLEEYP-MMRRAFETVAIDRLDRIGK

ES 2 305 906 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayrische Julius-Maximilians Universität Würzburg

5 <120> Medios y métodos para la determinación de AMPc *in vitro* e *in vivo*

<130> H2946 PCT S3

10 <160> 74

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 416

<212> PRT

20 <213> ratón

<400> 1

```

25      Met Ser Ile Glu Ile Pro Ala Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Phe
        1           5           10           15

        Thr Val Glu Val Leu Arg His Gln Pro Ala Asp Leu Leu Glu Phe Ala
30              20           25           30

        Leu Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg Lys Gly Ala
35              35           40           45

        Ala Arg Phe Gly His Glu Gly Arg Thr Trp Gly Asp Ala Gly Ala Ala
40              50           55           60

        Ala Gly Gly Gly Thr Pro Ser Lys Gly Val Asn Phe Ala Glu Glu Pro
45              65           70           75           80

        Met Arg Ser Asp Ser Glu Asn Gly Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu Ala
              85           90           95

        Gly Ala Phe Asn Ala Pro Val Ile Asn Arg Phe Thr Arg Arg Ala Ser
50              100          105          110

        Val Cys Ala Glu Ala Tyr Asn Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Ala Glu
55              115          120          125

```

60

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Val Lys Cys Leu Ala Met Asp Val Gln Ala Phe Glu Arg Leu Leu Gly
 370 375 380

5 Pro Cys Met Glu Ile Met Lys Arg Asn Ile Ala Thr Tyr Glu Glu Gln
 385 390 395 400

10 Leu Val Ala Leu Phe Gly Thr Asn Met Asp Ile Val Glu Pro Thr Ala
 405 410 415

<210> 2
 15 <211> 881
 <212> PRT
 <213> *homo sapiens*

20 <400> 2

25 Met Val Leu Arg Arg Met His Arg Pro Arg Ser Cys Ser Tyr Gln Leu
 1 5 10 15

30 Leu Leu Glu His Gln Arg Pro Ser Cys Ile Gln Gly Leu Arg Trp Thr
 20 25 30

35 Pro Leu Thr Asn Ser Glu Glu Ser Leu Asp Phe Ser Glu Ser Leu Glu
 35 40 45

40 Gln Ala Ser Thr Glu Arg Val Leu Arg Ala Gly Arg Gln Leu His Arg
 50 55 60

45 His Leu Leu Ala Thr Cys Pro Asn Leu Ile Arg Asp Arg Lys Tyr His
 65 70 75 80

50 Leu Arg Leu Tyr Arg Gln Cys Cys Ser Gly Arg Glu Leu Val Asp Gly
 85 90 95

55 Ile Leu Ala Leu Gly Leu Gly Val His Ser Arg Ser Gln Val Val Gly
 100 105 110

60 Ile Cys Gln Val Leu Leu Asp Glu Gly Ala Leu Cys His Val Lys His
 115 120 125

65 Asp Trp Ala Phe Gln Asp Arg Asp Ala Gln Phe Tyr Arg Phe Pro Gly
 130 135 140

70 Pro Glu Pro Glu Pro Val Gly Thr His Glu Met Glu Glu Glu Leu Ala
 145 150 155 160

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

His Val Glu Pro Ala Gly Gly Ser Glu Gln Glu Arg Ser Thr Tyr Val
 405 410 415
 5
 Cys Asn Lys Arg Gln Gln Ile Leu Arg Leu Val Ser Gln Trp Val Ala
 420 425 430
 10
 Leu Tyr Gly Ser Met Leu His Thr Asp Pro Val Ala Thr Ser Phe Leu
 435 440 445
 15
 Gln Lys Leu Ser Asp Leu Val Gly Arg Asp Thr Arg Leu Ser Asn Leu
 450 455 460
 20
 Leu Arg Glu Gln Trp Pro Glu Arg Arg Arg Cys His Arg Leu Glu Asn
 465 470 475 480
 25
 Gly Cys Gly Asn Ala Ser Pro Gln Met Lys Ala Arg Asn Leu Pro Val
 485 490 495
 30
 Trp Leu Pro Asn Gln Asp Glu Pro Leu Pro Gly Ser Ser Cys Ala Ile
 500 505 510
 35
 Gln Val Gly Asp Lys Val Pro Tyr Asp Ile Cys Arg Pro Asp His Ser
 515 520 525
 40
 Val Leu Thr Leu Gln Leu Pro Val Thr Ala Ser Val Arg Glu Val Met
 530 535 540
 45
 Ala Ala Leu Ala Gln Glu Asp Gly Trp Thr Lys Gly Gln Val Leu Val
 545 550 555 560
 50
 Lys Val Asn Ser Ala Gly Asp Ala Ile Gly Leu Gln Pro Asp Ala Arg
 565 570 575
 Gly Val Ala Thr Ser Leu Gly Leu Asn Glu Arg Leu Phe Val Val Asn
 580 585 590
 55
 Pro Gln Glu Val His Glu Leu Ile Pro His Pro Asp Gln Leu Gly Pro
 595 600 605
 60
 Thr Val Gly Ser Ala Glu Gly Leu Asp Leu Val Ser Ala Lys Asp Leu
 610 615 620
 65
 Ala Gly Gln Leu Thr Asp His Asp Trp Ser Leu Phe Asn Ser Ile His
 625 630 635 640
 Gln Val Glu Leu Ile His Tyr Val Leu Gly Pro Gln His Leu Arg Asp
 645 650 655

ES 2 305 906 T3

5 Val Thr Thr Ala Asn Leu Glu Arg Phe Met Arg Arg Phe Asn Glu Leu
 660 665 670
 Gln Tyr Trp Val Ala Thr Glu Leu Cys Leu Cys Pro Val Pro Gly Pro
 675 680 685
 10 Arg Ala Gln Leu Leu Arg Lys Phe Ile Lys Leu Ala Ala His Leu Lys
 690 695 700
 15 Glu Gln Lys Asn Leu Asn Ser Phe Phe Ala Val Met Phe Gly Leu Ser
 705 710 715 720
 20 Asn Ser Ala Ile Ser Arg Leu Ala His Thr Trp Glu Arg Leu Pro His
 725 730 735
 25 Lys Val Arg Lys Leu Tyr Ser Ala Leu Glu Arg Leu Leu Asp Pro Ser
 740 745 750
 Trp Asn His Arg Val Tyr Arg Leu Ala Leu Ala Lys Leu Ser Pro Pro
 755 760 765
 30 Val Ile Pro Phe Met Pro Leu Leu Leu Lys Asp Met Thr Phe Ile His
 770 775 780
 35 Glu Gly Asn His Thr Leu Val Glu Asn Leu Ile Asn Phe Glu Lys Met
 785 790 795 800
 40 Arg Met Met Ala Arg Ala Ala Arg Met Leu His His Cys Arg Ser His
 805 810 815
 45 Asn Pro Val Pro Leu Ser Pro Leu Arg Ser Arg Val Ser His Leu His
 820 825 830
 Glu Asp Ser Gln Val Ala Arg Ile Ser Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
 835 840 845
 50 Ser Thr Arg Ser Pro Ala Ser Thr Trp Ala Tyr Val Gln Gln Leu Lys
 850 855 860
 55 Val Ile Asp Asn Gln Arg Glu Leu Ser Arg Leu Ser Arg Glu Leu Glu
 865 870 875 880
 60 Pro

<210> 3

<211> 993

65 <212> PRT

<213> ratón

ES 2 305 906 T3

<400> 3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Gly Asn Arg Ala Ala Asn Gln Gly Asn Ser Gln Pro Gln Gln Lys Tyr
 465 470 475 480
 5
 Thr Val Met Ser Gly Thr Pro Glu Lys Ile Leu Glu His Phe Leu Glu
 485 490 495
 10
 Thr Ile Arg Leu Glu Pro Ser Leu Asn Glu Ala Thr Asp Ser Val Leu
 500 505 510
 15
 Asn Asp Phe Val Met Met His Cys Val Phe Met Pro Asn Thr Gln Leu
 515 520 525
 20
 Cys Pro Ala Leu Val Ala His Tyr His Ala Gln Pro Ser Gln Gly Thr
 530 535 540
 25
 Glu Gln Glu Arg Met Asp Tyr Ala Leu Asn Asn Lys Arg Arg Val Ile
 545 550 555 560
 30
 Arg Leu Val Leu Gln Trp Ala Ala Met Tyr Gly Asp Leu Leu Gln Glu
 565 570 575
 35
 Asp Asp Val Ala Met Ala Phe Leu Glu Glu Phe Tyr Val Ser Val Ser
 580 585 590
 40
 Asp Asp Ala Arg Met Met Ala Ala Phe Lys Glu Gln Leu Pro Glu Leu
 595 600 605
 45
 Glu Lys Ile Val Lys Gln Ile Ser Glu Asp Ala Lys Ala Pro Gln Lys
 610 615 620
 50
 Lys His Lys Val Leu Leu Gln Gln Phe Asn Thr Gly Asp Glu Arg Ala
 625 630 635 640
 55
 Gln Lys Arg Gln Pro Ile Arg Gly Ser Asp Glu Val Leu Phe Lys Val
 645 650 655
 60
 Tyr Cys Ile Asp His Thr Tyr Thr Thr Ile Arg Val Pro Val Ala Ala
 660 665 670
 65
 Ser Val Lys Glu Val Ile Ser Ala Val Ala Asp Lys Leu Gly Ser Gly
 675 680 685
 70
 Glu Gly Leu Ile Ile Val Lys Met Asn Ser Gly Gly Glu Lys Val Val
 690 695 700

ES 2 305 906 T3

Arg Leu Phe Ala Cys Pro Arg Glu Gln Phe Asp Ser Leu Thr Pro Leu
 725 730 735
 5
 Pro Glu Gln Glu Gly Pro Thr Thr Gly Thr Val Gly Thr Phe Glu Leu
 740 745 750
 10
 Met Ser Ser Lys Asp Leu Ala Tyr Gln Met Thr Thr Tyr Asp Trp Glu
 755 760 765
 15
 Leu Phe Asn Cys Val His Glu Leu Glu Leu Ile Tyr His Thr Phe Gly
 770 775 780
 20
 Arg His Asn Phe Lys Lys Thr Thr Ala Asn Leu Asp Leu Phe Leu Arg
 785 790 795 800
 25
 Arg Phe Asn Glu Ile Gln Phe Trp Val Val Thr Glu Val Cys Leu Cys
 805 810 815
 30
 Ser Gln Leu Ser Lys Arg Val Gln Leu Leu Lys Lys Phe Ile Lys Ile
 820 825 830
 35
 Ala Ala His Cys Lys Glu Tyr Lys Asn Leu Asn Ser Phe Phe Ala Ile
 835 840 845
 40
 Val Met Gly Leu Ser Asn Val Ala Val Ser Arg Leu Ala Leu Thr Trp
 850 855 860
 45
 Glu Lys Leu Pro Ser Lys Phe Lys Lys Phe Tyr Ala Glu Phe Glu Ser
 865 870 875 880
 50
 Leu Met Asp Pro Ser Arg Asn His Arg Ala Tyr Arg Leu Thr Ala Ala
 885 890 895
 55
 Lys Leu Glu Pro Pro Leu Ile Pro Phe Met Pro Leu Leu Ile Lys Asp
 900 905 910
 60
 Met Thr Phe Thr His Glu Gly Asn Lys Thr Phe Ile Asp Asn Leu Val
 915 920 925
 65
 Asn Phe Glu Lys Met Arg Met Ile Ala Asn Thr Ala Arg Thr Val Arg
 930 935 940
 Tyr Tyr Arg Ser Gln Pro Phe Asn Pro Asp Ala Ala Gln Ala Asn Lys
 945 950 955 960

ES 2 305 906 T3

Asn His Gln Asp Val Arg Ser Tyr Val Arg Gln Leu Asn Val Ile Asp
965 970 975

5 Asn Gln Arg Thr Leu Ser Gln Met Ser His Arg Leu Glu Pro Arg Arg
980 985 990

10 Pro

<210> 4

<211> 889

15 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

20 <400> 4

Met Asp Ala Arg Gly Gly Gly Gly Arg Pro Gly Glu Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15

25 Thr Pro Ala Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Gln
20 25 30

30 Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Gly Pro Gly
35 40 45

35 Pro Ala Pro Pro Gln His Pro Pro Arg Ala Glu Ala Leu Pro Pro Glu
50 55 60

40 Ala Ala Asp Glu Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Arg Ser Arg Asp Ser
65 70 75 80

45 Ser Cys Gly Arg Pro Gly Thr Pro Gly Ala Ala Ser Thr Ala Lys Gly
85 90 95

50 Ser Pro Asn Gly Glu Cys Gly Arg Gly Glu Pro Gln Cys Ser Pro Ala
100 105 110

55 Gly Pro Glu Gly Pro Ala Arg Gly Pro Lys Val Ser Phe Ser Cys Arg
115 120 125

Gly Ala Ala Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Gly Pro Ala Glu Glu Ala
130 135 140

60 Gly Ser Glu Glu Ala Gly Pro Ala Gly Glu Pro Arg Gly Ser Gln Ala
145 150 155 160

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Ser Ile Asn Gly Met Val Asn His Ser Trp Ser Glu Leu Tyr Ser Phe
 405 410 415
 5
 Ala Leu Phe Lys Ala Met Ser His Met Leu Cys Ile Gly Tyr Gly Arg
 420 425 430
 10
 Gln Ala Pro Glu Ser Met Thr Asp Ile Trp Leu Thr Met Leu Ser Met
 435 440 445
 15
 Ile Val Gly Ala Thr Cys Tyr Ala Met Phe Ile Gly His Ala Thr Ala
 450 455 460
 20
 Leu Ile Gln Ser Leu Asp Ser Ser Arg Arg Gln Tyr Gln Glu Lys Tyr
 465 470 475 480
 25
 Lys Gln Val Glu Gln Tyr Met Ser Phe His Lys Leu Pro Ala Asp Phe
 485 490 495
 30
 Arg Gln Lys Ile His Asp Tyr Tyr Glu His Arg Tyr Gln Gly Lys Met
 500 505 510
 35
 Phe Asp Glu Asp Ser Ile Leu Gly Glu Leu Asn Gly Pro Leu Arg Glu
 515 520 525
 40
 Glu Ile Val Asn Phe Asn Cys Arg Lys Leu Val Ala Ser Met Pro Leu
 530 535 540
 45
 Phe Ala Asn Ala Asp Pro Asn Phe Val Thr Ala Met Leu Thr Lys Leu
 545 550 555 560
 50
 Lys Phe Glu Val Phe Gln Pro Gly Asp Tyr Ile Ile Arg Glu Gly Thr
 565 570 575
 55
 Ile Gly Lys Lys Met Tyr Phe Ile Gln His Gly Val Val Ser Val Leu
 580 585 590
 60
 Thr Lys Gly Asn Lys Glu Met Lys Leu Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Gly
 595 600 605
 65
 Glu Ile Cys Leu Leu Thr Arg Gly Arg Arg Thr Ala Ser Val Arg Ala
 610 615 620
 60
 Asp Thr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ser Leu Ser Val Asp Asn Phe Asn Glu
 625 630 635 640

ES 2 305 906 T3

Val Leu Glu Glu Tyr Pro Met Met Arg Arg Ala Phe Glu Thr Val Ala
 645 650 655
 5
 Ile Asp Arg Leu Asp Arg Ile Gly Lys Lys Asn Ser Ile Leu Leu His
 660 665 670
 10
 Lys Val Gln His Asp Leu Asn Ser Gly Val Phe Asn Asn Gln Glu Asn
 675 680 685
 15
 Ala Ile Ile Gln Glu Ile Val Lys Tyr Asp Arg Glu Met Val Gln Gln
 690 695 700
 20
 Ala Glu Leu Gly Gln Arg Val Gly Leu Phe Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 705 710 715 720
 25
 Pro Gln Val Thr Ser Ala Ile Ala Thr Leu Gln Gln Ala Ala Ala Met
 725 730 735
 30
 Ser Phe Cys Pro Gln Val Ala Arg Pro Leu Val Gly Pro Leu Ala Leu
 740 745 750
 35
 Gly Ser Pro Arg Leu Val Arg Arg Pro Pro Pro Gly Pro Ala Pro Ala
 755 760 765
 40
 Ala Ala Ser Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ala Ser Pro Pro Gly Ala Pro
 770 775 780
 45
 Ala Ser Pro Arg Ala Pro Arg Thr Ser Pro Tyr Gly Gly Leu Pro Ala
 785 790 795 800
 50
 Ala Pro Leu Ala Gly Pro Ala Leu Pro Ala Arg Arg Leu Ser Arg Ala
 805 810 815
 55
 Ser Arg Pro Leu Ser Ala Ser Gln Pro Ser Leu Pro His Gly Ala Pro
 820 825 830
 60
 Gly Pro Ala Ala Ser Thr Arg Pro Ala Ser Ser Ser Thr Pro Arg Leu
 835 840 845
 65
 Arg Pro Thr Pro Ala Ala Arg Ala Ala Ala Pro Ser Pro Asp Arg Arg
 850 855 860
 70
 Asp Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ala Gly Gly Leu Asp Pro Gln Asp Ser
 865 870 875 880
 75
 Ala Arg Ser Arg Leu Ser Ser Asn Leu
 885

ES 2 305 906 T3

<211> 909

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

5

<400> 5

10

Met Pro Arg Glu Leu Ser Arg Ile Glu Glu Glu Lys Glu Asp Glu Glu
1 5 10 15

15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Thr Glu
20 25 30

20

Val Leu Leu Asp Ser Cys Val Val Ser Gln Val Gly Val Gly Gln Ser
35 40 45

25

Glu Glu Asp Gly Thr Arg Pro Gln Ser Thr Ser Asp Gln Lys Leu Trp
50 55 60

Glu Glu Val Gly Glu Glu Ala Lys Lys Glu Ala Glu Glu Lys Ala Lys
65 70 75 80

30

Glu Glu Ala Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Ala Glu Lys Glu Pro Gln
85 90 95

35

Asp Trp Ala Glu Thr Lys Glu Glu Pro Glu Ala Glu Ala Glu Ala Ala
100 105 110

40

Ser Ser Gly Val Pro Ala Thr Lys Gln His Pro Glu Val Gln Val Glu
115 120 125

Asp Thr Asp Ala Asp Ser Cys Pro Leu Met Ala Glu Glu Asn Pro Pro
130 135 140

45

Ser Thr Val Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ala Lys Ser Asp Thr Leu Ile
145 150 155 160

50

Val Pro Ser Ser Ala Ser Gly Thr His Arg Lys Lys Leu Pro Ser Glu
165 170 175

55

Asp Asp Glu Ala Glu Glu Leu Lys Ala Leu Ser Pro Ala Glu Ser Pro
180 185 190

60

Val Val Ala Trp Ser Asp Pro Thr Thr Pro Lys Asp Thr Asp Gly Gln
195 200 205

65

ES 2 305 906 T3

Asp Arg Ala Ala Ser Thr Ala Ser Thr Asn Ser Ala Ile Ile Asn Asp
 210 215 220

5

Arg Leu Gln Glu Leu Val Lys Leu Phe Lys Glu Arg Thr Glu Lys Val
 225 230 235 240

10

Lys Glu Lys Leu Ile Asp Pro Asp Val Thr Ser Asp Glu Glu Ser Pro
 245 250 255

15

Lys Pro Ser Pro Ala Lys Lys Ala Pro Glu Pro Ala Pro Asp Thr Lys
 260 265 270

20

Pro Ala Glu Ala Glu Pro Val Glu Glu Glu His Tyr Cys Asp Met Leu
 275 280 285

25

Cys Cys Lys Phe Lys His Arg Pro Trp Lys Lys Tyr Gln Phe Pro Gln
 290 295 300

30

Ser Ile Asp Pro Leu Thr Asn Leu Met Tyr Val Leu Trp Leu Phe Phe
 305 310 315 320

35

Val Val Met Ala Trp Asn Trp Asn Cys Trp Leu Ile Pro Val Arg Trp
 325 330 335

40

Ala Phe Pro Tyr Gln Thr Pro Asp Asn Ile His His Trp Leu Leu Met
 340 345 350

45

Asp Tyr Leu Cys Asp Leu Ile Tyr Phe Leu Asp Ile Thr Val Phe Gln
 355 360 365

50

Thr Arg Leu Gln Phe Val Arg Gly Gly Asp Ile Ile Thr Asp Lys Lys
 370 375 380

55

Asp Met Arg Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Arg Arg Phe Lys Met Asp Leu
 385 390 395 400

60

Leu Ser Leu Leu Pro Leu Asp Phe Leu Tyr Leu Lys Val Gly Val Asn
 405 410 415

65

Pro Leu Leu Arg Leu Pro Arg Cys Leu Lys Tyr Met Ala Phe Phe Glu
 420 425 430

Phe Asn Ser Arg Leu Glu Ser Ile Leu Ser Lys Ala Tyr Val Tyr Arg
 435 440 445

ES 2 305 906 T3

Val Ile Arg Thr Thr Ala Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu His Leu Asn Ser
 450 455 460
 5
 Cys Leu Tyr Tyr Trp Ala Ser Ala Tyr Gln Gly Leu Gly Ser Thr His
 465 470 475 480
 10
 Trp Val Tyr Asp Gly Val Gly Asn Ser Tyr Ile Arg Cys Tyr Tyr Phe
 485 490 495
 15
 Ala Val Lys Thr Leu Ile Thr Ile Gly Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr
 500 505 510
 20
 Leu Phe Glu Ile Val Phe Gln Leu Leu Asn Tyr Phe Thr Gly Val Phe
 515 520 525
 25
 Ala Phe Ser Val Met Ile Gly Gln Met Arg Asp Val Val Gly Ala Ala
 530 535 540
 30
 Thr Ala Gly Gln Thr Tyr Tyr Arg Ser Cys Met Asp Ser Thr Val Lys
 545 550 555 560
 35
 Tyr Met Asn Phe Tyr Lys Ile Pro Lys Ser Val Gln Asn Arg Val Lys
 565 570 575
 40
 Thr Trp Tyr Glu Tyr Thr Trp His Ser Gln Gly Met Leu Asp Glu Ser
 580 585 590
 45
 Glu Leu Met Val Gln Leu Pro Asp Lys Met Arg Leu Asp Leu Ala Ile
 595 600 605
 50
 Asp Val Asn Tyr Asn Ile Val Ser Lys Val Ala Leu Phe Gln Gly Cys
 610 615 620
 55
 Asp Arg Gln Met Ile Phe Asp Met Leu Lys Arg Leu Arg Ser Val Val
 625 630 635 640
 60
 Tyr Leu Pro Asn Asp Tyr Val Cys Lys Lys Gly Glu Ile Gly Arg Glu
 645 650 655
 65
 Met Tyr Ile Ile Gln Ala Gly Gln Val Gln Val Leu Gly Gly Pro Asp
 660 665 670
 Gly Lys Ser Val Leu Val Thr Leu Lys Ala Gly Ser Val Phe Gly Glu
 675 680 685

ES 2 305 906 T3

Ile Ser Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Asn Arg Arg Thr Ala Asn Val
 690 695 700
 5 Val Ala His Gly Phe Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asp Lys Lys Asp Leu
 705 710 715 720
 10 Asn Glu Ile Leu Val His Tyr Pro Glu Ser Gln Lys Leu Leu Arg Lys
 725 730 735
 15 Lys Ala Arg Arg Met Leu Arg Ser Asn Asn Lys Pro Lys Glu Glu Lys
 740 745 750
 20 Ser Val Leu Ile Leu Pro Pro Arg Ala Gly Thr Pro Lys Leu Phe Asn
 755 760 765
 25 Ala Ala Leu Ala Met Thr Gly Lys Met Gly Gly Lys Gly Ala Lys Gly
 770 775 780
 Gly Lys Leu Ala His Leu Arg Ala Arg Leu Lys Glu Leu Ala Ala Leu
 785 790 795 800
 30 Glu Ala Ala Ala Lys His Glu Glu Leu Val Glu Gln Ala Lys Ser Ser
 805 810 815
 35 Gln Asp Val Lys Gly Glu Glu Gly Ser Ala Ala Pro Asp Gln His Thr
 820 825 830
 40 His Pro Lys Glu Ala Ala Thr Asp Pro Pro Ala Pro Arg Thr Pro Pro
 835 840 845
 45 Glu Pro Pro Gly Ser Pro Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ala Ser Leu Gly
 850 855 860
 Ser Cys Glu Gly Glu Glu Glu Gly Pro Ala Glu Pro Glu Glu His Ser
 865 870 875 880
 50 Val Arg Ile Cys Met Ser Pro Gly Pro Glu Pro Gly Glu Gln Ile Leu
 885 890 895
 55 Ser Val Lys Met Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Ala Glu
 900 905
 60 <210> 6
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> *E. coli*
 65

ES 2 305 906 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> 1327

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

ES 2 305 906 T3

<400> 7

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

ES 2 305 906 T3

Ile Thr Gly His Gln His Pro Gln Arg Thr Val Ser Ala Arg Ala Ala
 225 230 235 240
 5
 Arg Asp Ser Thr Val Leu Arg Leu Pro Val Glu Ala Phe Ser Ala Val
 245 250 255
 10
 Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Ser Leu Val Arg Val Val Gln Ile Ile Met
 260 265 270
 15
 Val Arg Leu Gln Arg Val Thr Phe Leu Ala Leu His Asn Tyr Leu Gly
 275 280 285
 20
 Leu Thr Asn Glu Leu Phe Ser His Glu Ile Gln Pro Leu Arg Leu Phe
 290 295 300
 25
 Pro Ser Pro Gly Leu Pro Thr Arg Thr Ser Pro Val Arg Gly Ser Lys
 305 310 315 320
 30
 Arg Met Val Ser Thr Ser Ala Thr Asp Glu Pro Arg Glu Thr Pro Gly
 325 330 335
 35
 Arg Pro Pro Asp Pro Thr Gly Ala Pro Leu Pro Gly Pro Thr Gly Asp
 340 345 350
 40
 Pro Val Lys Pro Thr Ser Leu Glu Thr Pro Ser Ala Pro Leu Leu Ser
 355 360 365
 45
 Arg Cys Val Ser Met Pro Gly Asp Ile Ser Gly Leu Gln Gly Gly Pro
 370 375 380
 50
 Arg Ser Asp Phe Asp Met Ala Tyr Glu Arg Gly Arg Ile Ser Val Ser
 385 390 395 400
 55
 Leu Gln Glu Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ala Pro Ala Arg Thr
 405 410 415
 60
 Pro Thr Gln Glu Pro Arg Glu Gln Pro Ala Gly Ala Cys Glu Tyr Ser
 420 425 430
 65
 Tyr Cys Glu Asp Glu Ser Ala Thr Gly Gly Cys Pro Phe Gly Pro Tyr
 435 440 445
 70
 Gln Gly Arg Gln Thr Ser Ser Ile Phe Glu Ala Ala Lys Gln Glu Leu
 450 455 460
 75
 Ala Lys Leu Met Arg Ile Glu Asp Pro Ser Leu Leu Asn Ser Arg Val
 465 470 475 480

ES 2 305 906 T3

	Leu	Leu	His	His	Ala	Lys	Ala	Gly	Thr	Ile	Ile	Ala	Arg	Gln	Gly	Asp	
					485					490					495		
5	Gln	Asp	Val	Ser	Leu	His	Phe	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	His	Val	Tyr	
				500					505					510			
10	Gln	Arg	Met	Ile	Asp	Lys	Ala	Glu	Asp	Val	Cys	Leu	Phe	Val	Ala	Gln	
			515					520					525				
15	Pro	Gly	Glu	Leu	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Pro	Leu	
		530					535					540					
20	Ile	Phe	Thr	Leu	Arg	Ala	Gln	Arg	Asp	Cys	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Ser	
	545					550				555						560	
25	Lys	Ser	Asp	Phe	Tyr	Glu	Ile	Met	Arg	Ala	Gln	Pro	Ser	Val	Val	Leu	
				565					570						575		
30	Ser	Ala	Ala	His	Thr	Val	Ala	Ala	Arg	Met	Ser	Pro	Phe	Val	Arg	Gln	
				580					585					590			
35	Met	Asp	Phe	Ala	Ile	Asp	Trp	Thr	Ala	Val	Glu	Ala	Gly	Arg	Ala	Leu	
			595					600					605				
40	Tyr	Arg	Gln	Gly	Asp	Arg	Ser	Asp	Cys	Thr	Tyr	Ile	Val	Leu	Asn	Gly	
	610						615					620					
45	Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Ile	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	
	625					630				635					640		
50	Gly	Glu	Tyr	Gly	Arg	Gly	Asp	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Glu	Ala	Leu	Thr	
				645					650					655			
55	Arg	Gln	Pro	Arg	Ala	Thr	Thr	Val	His	Ala	Val	Arg	Asp	Thr	Glu	Leu	
			660					665					670				
60	Ala	Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	Thr	Leu	Gly	His	Ile	Lys	Arg	Arg	Tyr	Pro	
			675					680				685					
65	Gln	Val	Val	Thr	Arg	Leu	Ile	His	Leu	Leu	Ser	Gln	Lys	Ile	Leu	Gly	
	690					695					700						
70	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Gly	Pro	Phe	Pro	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	
	705					710				715					720		

ES 2 305 906 T3

	Val	Pro	Pro	His	Ser	Glu	Leu	Thr	Asn	Pro	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	
					725					730					735		
5	Val	Ala	Ile	Leu	Pro	Val	Cys	Ala	Glu	Val	Pro	Met	Val	Ala	Phe	Thr	
				740					745					750			
10	Leu	Glu	Leu	Gln	His	Ala	Leu	Gln	Ala	Ile	Gly	Pro	Thr	Leu	Leu	Leu	
			755					760					765				
15	Asn	Ser	Asp	Ile	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Ser	
		770					775					780					
20	Ile	Gln	Glu	Phe	Arg	Leu	Ser	Gly	Trp	Leu	Ala	Gln	Gln	Glu	Asp	Ala	
	785					790					795					800	
25	His	Arg	Ile	Val	Leu	Tyr	Gln	Thr	Asp	Ala	Ser	Leu	Thr	Pro	Trp	Thr	
					805					810					815		
30	Val	Arg	Cys	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Cys	Ile	Leu	Ile	Val	Gly	Leu	Gly	
				820					825					830			
35	Asp	Gln	Glu	Pro	Thr	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Met	Leu	Glu	Asn	Thr	
			835					840					845				
40	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Val	Leu	Leu	His	Arg	Glu	Glu	Gly	
		850					855					860					
45	Ala	Gly	Pro	Thr	Arg	Thr	Val	Glu	Trp	Leu	Asn	Met	Arg	Ser	Trp	Cys	
	865					870					875					880	
50	Ser	Gly	His	Leu	His	Leu	Arg	Cys	Pro	Arg	Arg	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	
					885					890					895		
55	Ser	Pro	Ala	Lys	Leu	His	Glu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Val	Phe	Ser	Arg	Arg	
				900					905					910			
60	Ala	Asp	Arg	His	Ser	Asp	Phe	Ser	Arg	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Thr	Gly	
			915					920					925				
65	Asn	Thr	Ile	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Arg	Gly	Cys	Ser	
		930					935					940					
70	His	Ile	Gly	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Val	Asp	
	945					950					955					960	

ES 2 305 906 T3

Leu Val Gly Gly Thr Ser Ile Gly Ser Phe Ile Gly Ala Leu Tyr Ala
 965 970 975
 5
 Glu Glu Arg Ser Ala Ser Arg Thr Lys Gln Arg Ala Arg Glu Trp Ala
 980 985 990
 10
 Lys Ser Met Thr Ser Val Leu Glu Pro Val Leu Asp Leu Thr Tyr Pro
 995 1000 1005
 15
 Val Thr Ser Met Phe Thr Gly Ser Ala Phe Asn Arg Ser Ile His
 1010 1015 1020
 Arg Val Phe Gln Asp Lys Gln Ile Glu Asp Leu Trp Leu Pro Tyr
 1025 1030 1035
 20
 Phe Asn Val Thr Thr Asp Ile Thr Ala Ser Ala Met Arg Val His
 1040 1045 1050
 25
 Lys Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Val Arg Ala Ser Met Thr Leu
 1055 1060 1065
 30
 Ser Gly Tyr Leu Pro Pro Leu Cys Asp Pro Lys Asp Gly His Leu
 1070 1075 1080
 35
 Leu Met Asp Gly Gly Tyr Ile Asn Asn Leu Pro Ala Asp Ile Ala
 1085 1090 1095
 40
 Arg Ser Met Gly Ala Lys Thr Val Ile Ala Ile Asp Val Gly Ser
 1100 1105 1110
 45
 Gln Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Tyr Gly Asp Ser Leu Ser Gly
 1115 1120 1125
 50
 Trp Trp Leu Leu Trp Lys Arg Leu Asn Pro Trp Ala Asp Lys Val
 1130 1135 1140
 55
 Lys Val Pro Asp Met Ala Glu Ile Gln Ser Arg Leu Ala Tyr Val
 1145 1150 1155
 60
 Ser Cys Val Arg Gln Leu Glu Val Val Lys Ser Ser Ser Tyr Cys
 1160 1165 1170
 65
 Glu Tyr Leu Arg Pro Pro Ile Asp Cys Phe Lys Thr Met Asp Phe
 1175 1180 1185

ES 2 305 906 T3

Gly Lys Phe Asp Gln Ile Tyr Asp Val Gly Tyr Gln Tyr Gly Lys
 1190 1195 1200
 5
 Ala Val Phe Gly Gly Trp Ser Arg Gly Asn Val Ile Glu Lys Met
 1205 1210 1215
 10
 Leu Thr Asp Arg Arg Ser Thr Asp Leu Asn Glu Ser Arg Arg Ala
 1220 1225 1230
 15
 Asp Val Leu Ala Phe Pro Ser Ser Gly Phe Thr Asp Leu Ala Glu
 1235 1240 1245
 20
 Ile Val Ser Arg Ile Glu Pro Pro Thr Ser Tyr Val Ser Asp Gly
 1250 1255 1260
 25
 Cys Ala Asp Gly Glu Glu Ser Asp Cys Leu Thr Glu Tyr Glu Glu
 1265 1270 1275
 30
 Asp Ala Gly Pro Asp Cys Ser Arg Asp Glu Gly Gly Ser Pro Glu
 1280 1285 1290
 35
 Gly Ala Ser Pro Ser Thr Ala Ser Glu Met Glu Glu Glu Lys Ser
 1295 1300 1305
 40
 Ile Leu Arg Gln Arg Arg Cys Leu Pro Gln Glu Pro Pro Gly Ser
 1310 1315 1320
 45
 Ala Thr Asp Ala
 1325
 50
 <210> 8
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> ratón
 55
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 60
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
 515 520 525
 5
 Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
 530 535 540
 10
 Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
 545 550 555 560
 15
 Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
 565 570 575
 20
 Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
 580 585 590
 25
 Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
 595 600 605
 30
 Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
 610 615 620
 35
 Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 625 630 635 640
 40
 <210> 9
 <211> 633
 <212> PRT
 <213> ratón
 45
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 50
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 55
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 60
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Ile Phe Glu Ser His Ala Lys Gly Gly Thr Val Leu Phe Asn Gln Gly
 305 310 315 320
 5
 Glu Glu Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Leu Lys Gly Ser Val Asn Val
 325 330 335
 10
 Val Ile Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys Thr Leu His Glu Gly Asp Asp
 340 345 350
 15
 Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala Pro Arg Ala Ala Ser Ile
 355 360 365
 20
 Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu Arg Val Asp Lys Glu Asp
 370 375 380
 25
 Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val Glu Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu
 385 390 395 400
 30
 Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
 405 410 415
 35
 Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 420 425 430
 40
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
 435 440 445
 45
 Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln
 450 455 460
 50
 Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
 465 470 475 480
 55
 Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
 485 490 495
 60
 Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
 500 505 510
 65
 Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
 515 520 525
 Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn
 530 535 540

ES 2 305 906 T3

Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe
545 550 555 560

5

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
565 570 575

10

Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
580 585 590

15

Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
595 600 605

20

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
610 615 620

Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
625 630

25

<210> 10

<211> 621

30

<212> PRT

<213> ratón

<400> 10

35

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

40

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

45

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

50

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

55

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

60

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
580 585 590

5

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
595 600 605

10

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
610 615 620

<210> 11

15

<211> 615

<212> PRT

<213> ratón

20

<400> 11

25

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

30

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

35

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

40

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

45

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

50

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

55

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

60

65

ES 2 305 906 T3

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

5

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

10

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

15

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

20

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

25

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu
225 230 235 240

Phe Met Arg Met Ile Leu Arg Lys Pro Pro Gly Gln Arg Thr Val Asp
245 250 255

30

Asp Leu Glu Ile Ile Tyr Glu Glu Leu Leu His Ile Lys Ala Leu Ser
260 265 270

35

His Leu Ser Thr Thr Val Lys Arg Glu Leu Ala Gly Val Leu Ile Phe
275 280 285

40

Glu Ser His Ala Lys Gly Gly Thr Val Leu Phe Asn Gln Gly Glu Glu
290 295 300

45

Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Leu Lys Gly Ser Val Asn Val Val Ile
305 310 315 320

50

Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys Thr Leu His Glu Gly Asp Asp Phe Gly
325 330 335

55

Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala Pro Arg Ala Ala Ser Ile Val Leu
340 345 350

60

Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu Arg Val Asp Lys Glu Asp Phe Asn
355 360 365

65

ES 2 305 906 T3

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 385 390 395 400
 5
 Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 405 410 415
 10
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 420 425 430
 15
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Thr Gly Val Gln Cys Phe
 435 440 445
 20
 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 450 455 460
 25
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 465 470 475 480
 30
 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 485 490 495
 35
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 500 505 510
 40
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
 515 520 525
 45
 Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
 530 535 540
 50
 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 545 550 555 560
 55
 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 565 570 575
 60
 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 580 585 590
 65
 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 595 600 605
 70
 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 610 615

<210> 12

65 <211> 653

<212> PRT

<213> ratón

ES 2 305 906 T3

<400> 12

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 435 440 445
 5
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
 450 455 460
 10
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
 465 470 475 480
 15
 Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
 485 490 495
 20
 Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
 500 505 510
 25
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
 515 520 525
 30
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
 530 535 540
 35
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 545 550 555 560
 40
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 565 570 575
 45
 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 580 585 590
 50
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
 595 600 605
 55
 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
 610 615 620
 60
 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 625 630 635 640
 65
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 645 650
 <210> 13
 <211> 657
 <212> PRT
 <213> ratón

ES 2 305 906 T3

<400> 13

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
 450 455 460
 5
 Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
 465 470 475 480
 10
 Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
 485 490 495
 15
 Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
 500 505 510
 20
 Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
 515 520 525
 25
 Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
 530 535 540
 30
 Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
 545 550 555 560
 35
 Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
 565 570 575
 40
 Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
 580 585 590
 45
 Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
 595 600 605
 50
 Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
 610 615 620
 55
 Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
 625 630 635 640
 60
 Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 645 650 655
 65
 Lys

60 <210> 14
 <211> 641
 <212> PRT
 65 <213> ratón

ES 2 305 906 T3

<400> 14

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
450 455 460

5

Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
465 470 475 480

10

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
485 490 495

15

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
500 505 510

20

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
515 520 525

25

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
530 535 540

30

Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
545 550 555 560

Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
565 570 575

35

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
580 585 590

40

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
595 600 605

45

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
610 615 620

50

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
625 630 635 640

Lys

55

<210> 15

<211> 658

<212> PRT

60

<213> ratón

65

ES 2 305 906 T3

<400> 15

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
465 470 475 480

5

Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
485 490 495

10

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
500 505 510

15

Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
515 520 525

20

Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
530 535 540

25

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
545 550 555 560

Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys
565 570 575

30

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
580 585 590

35

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
595 600 605

40

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
610 615 620

45

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
625 630 635 640

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
645 650 655

50

Tyr Lys

55 <210> 16

<211> 651

<212> PRT

<213> ratón

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 16

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly
465 470 475 480

5

Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
485 490 495

10

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
500 505 510

15

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
515 520 525

20

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
530 535 540

25

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser
545 550 555 560

30

His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala
565 570 575

35

His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
580 585 590

40

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
595 600 605

45

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
610 615 620

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
625 630 635 640

50

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
645 650

<210> 17

55

<211> 641

<212> PRT

<213> ratón

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 17

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
485 490 495

5

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
500 505 510

10

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
515 520 525

15

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
530 535 540

20

Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
545 550 555 560

25

Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
565 570 575

30

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
580 585 590

35

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
595 600 605

40

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
610 615 620

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
625 630 635 640

45

Lys

<210> 18

<211> 645

50

<212> PRT

<213> ratón

55

<400> 18

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

60

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly
 500 505 510
 5
 Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
 515 520 525
 10
 Asn Arg Ile Glu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 530 535 540
 15
 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr
 545 550 555 560
 20
 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His
 565 570 575
 25
 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 580 585 590
 30
 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 595 600 605
 35
 Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 610 615 620
 40
 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 625 630 635 640
 Asp Glu Leu Tyr Lys
 645
 <210> 19
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> ratón
 <400> 19
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 515 520 525
 5
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 530 535 540
 10
 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 545 550 555 560
 15
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
 565 570 575
 20
 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
 580 585 590
 25
 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 595 600 605
 30
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 610 615 620
 35
 <210> 20
 <211> 621
 <212> PRT
 <213> ratón
 40
 <400> 20
 45
 Met Tyr Glu Ser Phe Ile Glu Ser Leu Pro Phe Leu Lys Ser Leu Glu
 1 5 10 15
 50
 Val Ser Glu Arg Leu Lys Val Val Asp Val Ile Gly Thr Lys Val Tyr
 20 25 30
 55
 Asn Asp Gly Glu Gln Ile Ile Ala Gln Gly Asp Ser Ala Asp Ser Phe
 35 40 45
 60
 Phe Ile Val Glu Ser Gly Glu Val Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys Gly
 50 55 60
 65
 Lys Ser Asp Ile Ala Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 65 70 75 80

ES 2 305 906 T3

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
85 90 95

5 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
100 105 110

10 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
115 120 125

15 Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr
130 135 140

20 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
145 150 155 160

25 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
180 185 190

30 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
195 200 205

35 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
210 215 220

40 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
225 230 235 240

45 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
245 250 255

50 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
260 265 270

Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
275 280 285

55 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
290 295 300

60 Glu Leu Tyr Lys Glu Phe Glu Asn Gly Ala Val Glu Ile Ala Arg Cys
305 310 315 320

ES 2 305 906 T3

Leu Arg Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Leu Ala Leu Val Thr Asn Lys Pro
 325 330 335
 5
 Arg Ala Ala Ser Ala His Ala Ile Gly Thr Val Lys Cys Leu Ala Met
 340 345 350
 10
 Asp Val Gln Ala Phe Glu Arg Leu Leu Gly Pro Cys Met Glu Ile Met
 355 360 365
 15
 Lys Arg Asn Ile Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Leu Val Ala Ser Arg Val
 370 375 380
 20
 Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
 385 390 395 400
 25
 Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 405 410 415
 30
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
 420 425 430
 35
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
 435 440 445
 40
 Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
 450 455 460
 45
 Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
 465 470 475 480
 50
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
 485 490 495
 55
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
 500 505 510
 60
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 515 520 525
 65
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 530 535 540
 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 545 550 555 560

ES 2 305 906 T3

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
565 570 575

5

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
580 585 590

10

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
595 600 605

15

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
610 615 620

<210> 21

20 <211> 239

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> polipéptido

<400> 21

30

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

35

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

40

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

50

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

55

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

60

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

65

ES 2 305 906 T3

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 5
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 10
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 15
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 20
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 25
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 30
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 35
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235
 40
 <210> 22
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> polipéptido
 50
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 55
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 60
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 65

ES 2 305 906 T3

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

5 Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

10 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

15 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

20 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

25 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

30 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

35 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

40 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

45 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

50

<210> 23

<211> 717

55 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

60 <223> polipéptido

65

ES 2 305 906 T3

<400> 23

5	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
10	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
15	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
20	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
25	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag	717

30 <210> 24

<211> 717

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35

<220>

<223> polipéptido

40 <400> 24

45	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
50	ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
55	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac	480
60	ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
65	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag	717

ES 2 305 906 T3

<210> 25

<211> 2982

<212> ADN

5 <213> ratón

<400> 25

10	atggtcgctg cgcacgctgc acactctcag tcctcggccg agtggatcgc ctgcctggat	60
	aaaaggccgt tggagcgatc tagtgaagat gtggacataa ttttcacgcg gctgaaagga	120
15	gttaaagctt ttgagaaatt tcacccaaac ctccctcgtc agatttggtt atgcggttac	180
	tatgagaacc tggaaaaagg aatcacactg tttcgccaag gggatattgg aaccaactgg	240
	tatgctgtcc tggctgggtc tttggatggt aaagtgtctg agaccagcag tcaccaggat	300
20	gcggtgacca tctgcactct ggggaattggg acagcctttg gagagtccat tctggataac	360
	acccctcgcc atgcaacat cgttaccagg gagagcagcg aacttctccg cattgagcag	420
25	gaggacttca aggcactatg ggagaaatac cgacagtata tggccggact tctggctcct	480
	ccctatgggt ttatggaaac gggctctaac aatgacagga ttcctgacaa ggagaatgtc	540
	ccttcagaga agatcctcag agctggaaaa attttacgaa ttgccattct ctctcgagct	600
30	ccccacatga taagagacag aaagtaccac ctaaagacat acagacaatg ctgtgttggg	660
	actgagctgg tagactggat gatacagcag acatcctgtg ttcactcgcg gactcaagct	720
35	gttggcatgt ggcaagtctt gctggaagat ggtgtcctca accatgtgga ccaggagcgc	780
	catttccaag acaaatatct attttatcga tttctggatg acgagcgtga ggatgccct	840
	ttgcctactg aggaagagaa gaaggagtgt gatgaagaac ttcaggacac catgctgctg	900
40	ctctcacaga tgggccctga cgcacacatg agaatgatcc tgcgaaaacc acctggccag	960
	aggactgtgg atgacctaga gattatctac gacgagctcc ttcattattaa agccttatcc	1020
45	catctctcta ccacagtga acgggagtta gcaggtgttc tcatttttga gtctcacgcc	1080
	aaaggaggaa ctgtgttggt taaccagggg gaagaaggta cctcctggta catcattctg	1140
50	aaaggatccg tgaatgtagt catttatggc aagggtgtgg tctgcaccct gcacgaagga	1200

55

60

65

ES 2 305 906 T3

	gatgactttg gcaagttagc tctagtgaac gatgctccaa gagctgcctc cattgtttctt	1260
	cgggaagata attgtcactt cctaagagtc gacaaggaag acttcaatcg gattctgagg	1320
5	gacgttgagg cgaatacagt cagacttaaa gaacatgacc aagatgtctt ggtactggag	1380
	aagggtcccag caggaacag agctgctaata caaggaaact cacagcctca gcaaaagtat	1440
10	actgtgatgt caggaacacc tgaaaagatt ttagagcatt ttctagaaac aatacgcctt	1500
	gagccatcgt tgaatgaagc aacagattcg gttttaaatg actttgttat gatgcactgt	1560
15	gtttttatgc caaataocca gctttgccct gcccttgttg cccattacca cgcacagcct	1620
	tctcaaggta ccgagcagga gagaatggat tatgccctca acaacaagag gcgggtcatc	1680
	cgcttggtcc tgcagtgggc ggccatgtat ggcgatctcc tccaagaaga tgatgtggcc	1740
20	atggccttcc tggaggagtt ctatgtgtct gtatcagatg acgcacggat gatggctgcc	1800
	ttcaaggagc agctgccaga gctggagaag attgtcaagc aaatctcaga agacgcaaaa	1860
25	gctccacaga agaagcacia ggtgcttttg caacagttca acacagggtga cgagagggcc	1920
	cagaagcgtc agcctattcg tggtctgat gaggttttgt tcaaggctca ctgcatcgac	1980
	cacacctata ctaccattcg tgtgccggta gctgcctcgg tgaaggaaat catcagtcca	2040
30	gtagctgaca aactgggctc aggggaaggc ctgatcatcg tcaagatgaa ctctggagga	2100
	gaaaagggtg tgctgaaatc taatgatgtt tcagtattta cgacgctcac cattaatgga	2160
35	cgctgtttg cctgcccag agagcaattc gactcactga ctcccttgcc ggaacaggaa	2220
	ggcccgacca ctgggacagt gggaacattt gagctgatga gctcgaaaga cctggcgta	2280
40	cagatgacaa cctacgattg ggaactcttc aactgtgtgc atgagctgga gctaacttac	2340
	cacacatttg gaaggcataa ttttaaaaag accacggcaa acttggattt gttcctgagg	2400
	aggtttaatg aaattcagtt ttgggtgtgc actgaggtct gcctttgttc ccagctcagc	2460
45	aaacgtgttc agcttttgaa aaaattttatc aagatagcgg ctcaactgcaa ggagtacaaa	2520
	aatctaaatt cttttttcgc catcgatcatg ggactcagca acgtggccgt gagccgcttg	2580
50	gcactaacgt gggagaaact gccgagcaag ttaagaagt tctatgcgga gtttgagagc	2640
	ttgatggatc ctccagaaa ccacagggca tacaggctga cagcagccaa gctggagccc	2700
	cctctcatcc ctttcatgcc cttgcttatt aaagatatga catttactca tgaggggaac	2760
55	aagacgttca ttgacaatct agtaaaacttt gaaaaaatgc gcatgattgc aaacactgcc	2820
	agaacagtac ggtactacag gagccagccc ttcaatccgg atgccgctca agctaataag	2880
60	aaccatcagg atgtccggag ttatgtacgg caattaaatg tgattgacaa ccagagaact	2940
	ttatcacaga tgtcacacag attagagcct cgaaggccat ag	2982

65 <210> 26
<211> 246

ES 2 305 906 T3

<212> ADN

<213> *homo sapiens*

5 <400> 26

```

ctgctctttg aaccacacag caaggcaggg accgtgttgt tcagccaggg ggacaagggc      60
acttcgtggg acattatctg gaagggatct gtcaacgtgg tgacccatgg caaggggctg      120
gtgaccaccc tgcattgagg agatgatttt ggacagctgg ctctggtgaa tgatgcaccc      180
cgggcagcca ccatcatcct gcgagaagac aactgtcatt tcctgcgtgt ggacaagcag      240
gacttc                                           246

```

<210> 27

<211> 82

20 <212> PRT

<213> *homo sapiens*

<400> 27

```

Leu Leu Phe Glu Pro His Ser Lys Ala Gly Thr Val Leu Phe Ser Gln
1          5          10          15

Gly Asp Lys Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Trp Lys Gly Ser Val Asn
20          25          30

Val Val Thr His Gly Lys Gly Leu Val Thr Thr Leu His Glu Gly Asp
35          40          45

Asp Phe Gly Gln Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala Pro Arg Ala Ala Thr
50          55          60

Ile Ile Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu Arg Val Asp Lys Gln
65          70          75          80

Asp Phe

```

<210> 28

50 <211> 233

<212> ADN

<213> *mus musculus*

55 <400> 28

```

ctcacgcaa aggaggaact gtgttgttta accaggggga agaaggtacc tcctggtaca      60
tcattctgaa aggatccgtg aatgtagtca tttatggcaa ggggtgtggtc tgcaccctgc      120
acgaaggaga tgactttggc aagttagctc tagtgaacga tgctccaaga gctgcctcca      180
ttgttcttcg ggaagataat tgtcacttcc taagagtcga caaggaagac ttc           233

```

65 <210> 29

<211> 82

ES 2 305 906 T3

<212> PRT

<213> *mus musculus*

5 <400> 29

```

10      Leu Ile Phe Glu Ser His Ala Lys Gly Gly Thr Val Leu Phe Asn Gln
      1             5             10             15

      Gly Glu Glu Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Leu Lys Gly Ser Val Asn
      20             25             30

15      Val Val Ile Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys Thr Leu His Glu Gly Asp
      35             40             45

20      Asp Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala Pro Arg Ala Ala Ser
      50             55             60

25      Ile Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu Arg Val Asp Lys Glu
      65             70             75             80

      Asp Phe

```

30

<210> 30

<211> 270

<212> ADN

35

<213> *mus musculus*

<400> 30

40

```

      attggcacca aagtttaca c gatggagaa cagatcattg ctcagggaga ctcggcggat      60
      tcgttcttca ttgtagaatc tggagaagtg agaattacta tgaagagaaa gggtaaataca      120
45      gacatcgaag agaacggtgc tgtggaatc gctcgggtgc tccggggaca gtattttgga      180
      gagcttgccc tggtcactaa caagccaaga gcagcatctg cacacgccat tgggactgtc      240
50      aaatgcttag ccatggatgt gcaagcattt      270

```

50

<210> 31

<211> 90

55

<212> PRT

<213> *mus musculus*

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 31

5 Ile Gly Thr Lys Val Tyr Asn Asp Gly Glu Gln Ile Ile Ala Gln Gly
1 5 10 15

10 Asp Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ile Val Glu Ser Gly Glu Val Arg Ile
20 25 30

15 Thr Met Lys Arg Lys Gly Lys Ser Asp Ile Glu Glu Asn Gly Ala Val
35 40 45

20 Glu Ile Ala Arg Cys Leu Arg Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Leu Ala Leu
50 55 60

25 Val Thr Asn Lys Pro Arg Ala Ala Ser Ala His Ala Ile Gly Thr Val
65 70 75 80

30 Lys Cys Leu Ala Met Asp Val Gln Ala Phe
85 90

30 <210> 32

<211> 312

<212> ADN

35 <213> *mus musculus*

<400> 32

40 ctcaaatttg aggtcttcca gcctggagat tacatcatcc gagaggggac catcggaag 60

aagatgtact tcatccagca tggggtggtg agcgtgctca ccaagggcaa caaggagatg 120

aagctgtcgg atggctccta ttctggggag atctgcttgc tcacgagggg ccggcgtacg 180

45 gccagcgtgc gagctgacac ctactgtcgc ctctactcac tgagtgtgga caatttcaac 240

gaggtgctgg aggaataccc catgatgcgg cgtgcctttg agactgtggc tattgaccgg 300

50 ctagatcgca ta 312

<210> 33

55 <211> 104

<212> PRT

<213> *mus musculus*

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 33

5 Leu Lys Phe Glu Val Phe Gln Pro Gly Asp Tyr Ile Ile Arg Glu Gly
 1 5 10 15

10 Thr Ile Gly Lys Lys Met Tyr Phe Ile Gln His Gly Val Val Ser Val
 20 25 30

15 Leu Thr Lys Gly Asn Lys Glu Met Lys Leu Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 35 40 45

20 Gly Glu Ile Cys Leu Leu Thr Arg Gly Arg Arg Thr Ala Ser Val Arg
 50 55 60

25 Ala Asp Thr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ser Leu Ser Val Asp Asn Phe Asn
 65 70 75 80

30 Glu Val Leu Glu Glu Tyr Pro Met Met Arg Arg Ala Phe Glu Thr Val
 85 90 95

 Ala Ile Asp Arg Leu Asp Arg Ile
 100

<210> 34

35 <211> 160

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

40 <400> 34

45 Glu Glu Leu Ala Glu Ala Val Ala Leu Leu Ser Gln Arg Gly Pro Asp
 1 5 10 15

 Ala Leu Leu Thr Val Ala Leu Arg Lys Pro Pro Gly Gln Arg Thr Asp
 20 25 30

50 Glu Glu Leu Asp Leu Ile Phe Glu Glu Leu Leu His Ile Lys Ala Val
 35 40 45

55 Ala His Leu Ser Asn Ser Val Lys Arg Glu Leu Ala Ala Val Leu Leu
 50 55 60

60 Phe Glu Pro His Ser Lys Ala Gly Thr Val Leu Phe Ser Gln Gly Asp
 65 70 75 80

65

ES 2 305 906 T3

Lys Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Trp Lys Gly Ser Val Asn Val Val
85 90 95

5

Thr His Gly Lys Gly Leu Val Thr Thr Leu His Glu Gly Asp Asp Phe
100 105 110

10

Gly Gln Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala Pro Arg Ala Ala Thr Ile Ile
115 120 125

15

Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu Arg Val Asp Lys Gln Asp Phe
130 135 140

20

Asn Arg Ile Ile Lys Asp Val Glu Ala Lys Thr Met Arg Leu Glu Glu
145 150 155 160

<210> 35

25 <211> 159

<212> PRT

<213> *mus musculus*

30 <400> 35

35

Glu Glu Lys Lys Glu Cys Asp Glu Glu Leu Gln Asp Thr Met Leu Leu
1 5 10 15

40

Leu Ser Gln Met Gly Pro Asp Ala His Met Arg Met Ile Leu Arg Lys
20 25 30

45

Pro Pro Gly Gln Arg Thr Val Asp Asp Leu Glu Ile Ile Tyr Asp Glu
35 40 45

50

Leu Leu His Ile Lys Ala Leu Ser His Leu Ser Thr Thr Val Lys Arg
50 55 60

Glu Leu Ala Gly Val Leu Ile Phe Glu Ser His Ala Lys Gly Gly Thr
65 70 75 80

55

Val Leu Phe Asn Gln Gly Glu Glu Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile Leu
85 90 95

60

Lys Gly Ser Val Asn Val Val Ile Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys Thr
100 105 110

65

Leu His Glu Gly Asp Asp Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp Ala
115 120 125

ES 2 305 906 T3

Pro Arg Ala Ala Ser Ile Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe Leu
130 135 140

5 Arg Val Asp Lys Glu Asp Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val Glu
145 150 155

10 <210> 36
<211> 140
<212> PRT
<213> *mus musculus*
15
<400> 36

20 Met Tyr Glu Ser Phe Ile Glu Ser Leu Pro Phe Leu Lys Ser Leu Glu
1 5 10 15

25 Val Ser Glu Arg Leu Lys Val Val Asp Val Ile Gly Thr Lys Val Tyr
20 25 30

Asn Asp Gly Glu Gln Ile Ile Ala Gln Gly Asp Ser Ala Asp Ser Phe
35 40 45

30 Phe Ile Val Glu Ser Gly Glu Val Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys Gly
50 55 60

35 Lys Ser Asp Ile Glu Glu Asn Gly Ala Val Glu Ile Ala Arg Cys Leu
65 70 75 80

40 Arg Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Leu Ala Leu Val Thr Asn Lys Pro Arg
85 90 95

45 Ala Ala Ser Ala His Ala Ile Gly Thr Val Lys Cys Leu Ala Met Asp
100 105 110

Val Gln Ala Phe Glu Arg Leu Leu Gly Pro Cys Met Glu Ile Met Lys
115 120 125

50 Arg Asn Ile Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Leu Val Ala
130 135 140

55 <210> 37
<211> 172
<212> PRT
60 <213> *mus musculus*

65

ES 2 305 906 T3

<400> 37

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

<210> 38

<211> 1929

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcciones de fusión de Epac1 (E157-E316)

ES 2 305 906 T3

<400> 38

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
5	ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga cactgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
10	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tottcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
15	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
20	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
25	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcggca tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcgaggagt tggccgaagc tgtggccctg ctctccagc gggggcctga cgccctgctc	780
30	actgtggcac ttcgaaagcc cccaggtcag cgcacggatg aagagctgga cctcatcttt	840
	gaggagctgc tgcacatcaa ggctgtggcc cacctctcca actcgtgaa gcgagaatta	900
	gcggctgttc tgctctttga accacacagc aaggcaggga ccgtgttgtt cagccagggg	960
35	gacaagggca cttcgtggta cattatctgg aagggatctg tcaacgtggt gacctatggc	1020
	aaggggctgg tgaccacct gcattgagga gatgattttg gacagctggc tctggtgaat	1080
40	gatgcacccc gggcagccac catcatcctg cgagaagaca actgtcattt cctgcgtgtg	1140
	gacaagcagg acttcaaccg tatcatcaag gatgtggagg caaagaccat gcggctggaa	1200
45	gaatctagaa tggtagagca gggcgaggag ctgttcaccg gggtagtgcc catcctggtc	1260
	gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag tttagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat	1320
	gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gccctgccc	1380
50	tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctgg ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgc	1440
	cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc	1500
55	accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttagagggc	1560
	gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga cggcaacatc	1620
60	ctggggcaca agctggagta caactacatc agccacaacg tctatatcac cgccgacaag	1680
	cagaagaacg gcatcaaggc caacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg	1740
65	cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgcc	1800

ES 2 305 906 T3

gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat 1860
 cacatgggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcac ggacgagctg 1920
 5 tacaagtaa 1929

<210> 39

10 <211> 645

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción de fusión de Epac1 (E157-E316)

<400> 39

20

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

25

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

35

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

40

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

45

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

50

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

55

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

60

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His
 420 425 430
 5
 Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys
 435 440 445
 10
 Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
 450 455 460
 15
 Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg
 465 470 475 480
 20
 Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro
 485 490 495
 25
 Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 500 505 510
 30
 Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 515 520 525
 35
 Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 530 535 540
 40
 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr
 545 550 555 560
 45
 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His
 565 570 575
 50
 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 580 585 590
 55
 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 595 600 605
 60
 Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 610 615 620
 65
 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 625 630 635 640
 70
 Asp Glu Leu Tyr Lys
 645

<210> 40

<211> 1926

<212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 305 906 T3

<220>

<223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E443)

5 <400> 40

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
10	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccgga ccacatgaag	240
15	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
20	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
25	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
30	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcgga tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcgaagaga agaaggagtg tgatgaagaa cttcaggaca ccatgctgct gctctcacag	780
	atgggcccctg acggccacat gagaatgata ctgcgaaaac cacctggcca gaggactgtg	840
35	gatgacctag agattatcta cgacgagctc cttcatatta aagccttate ccatctctct	900
	accacagtga aacgggagtt agcaggtggt ctcatttttg agtctcacgc caaaggagga	960
40	actgtgttgt ttaaccaggg ggaagaaggt acctcctggt acatcattct gaaaggatcc	1020
	gtgaatgtag tcatttatgg caagggtgtg gtctgcaccc tgcacgaagg agatgacttt	1080
	ggcaagttag ctctagttaa cgatgctcca agagctgcct ccattgttct tcgggaagat	1140
45	aattgtcact tcctaagagt cgacaaggaa gacttcaatc ggattctgag ggacgttgag	1200
	tctagaatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tgggtgcccac cctggctgag	1260
50	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagtgc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc	1320
	acctacggca agctgaccct gaagttcatt tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	1380

55

60

65

ES 2 305 906 T3

```

cccaccctcg tgaccaccct gacctggggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 1440
atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 1500
5 atctttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 1560
acctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 1620
10 gggcacaagc tggagtacaa ctacatcagc cacaacgtct atatcaccgc cgacaagcag 1680
aagaacggca tcaaggccaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag 1740
15 ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccagc 1800
aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac 1860
atggtcctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac 1920
20 aagtaa 1926

```

```

<210> 41
25 <211> 640
    <212> PRT
    <213> secuencia artificial
30 <220>
    <223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E443)
35 <400> 41

```

```

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

```

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Leu Lys Gly Ser Val Asn Val Val Ile Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys
340 345 350

5

Thr Leu His Glu Gly Asp Asp Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp
355 360 365

10

Ala Pro Arg Ala Ala Ser Ile Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe
370 375 380

15

Leu Arg Val Asp Lys Glu Asp Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val Glu
385 390 395 400

20

Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile
405 410 415

25

Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser
420 425 430

Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe
435 440 445

30

Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr
450 455 460

35

Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met
465 470 475 480

40

Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln
485 490 495

Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
500 505 510

45

Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
515 520 525

50

Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
530 535 540

55

Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
545 550 555 560

60

Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
565 570 575

65

Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
580 585 590

ES 2 305 906 T3

Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
595 600 605

Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
610 615 620

Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
625 630 635 640

<210> 42

<211> 1905

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción de fusión de Epac2 (E292-E443)

<400> 42

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac      120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca ctttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag      240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc      300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaactacaa cagccacaa gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac      600
tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc      660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcggca tggacgagct gtacaaggaa      720
ttcgaagaac ttcaggacac catgctgctg ctctcacaga tgggcctga cggccacatg      780
agaatgatcc tgcgaaaacc acctggccag aggactgtgg atgacctaga gattatctac      840
gacgagctcc ttcattattaa agccttatcc catctctcta ccacagtga acgggagtta      900
gcaggtgttc tcatttttga gtctcacgcc aaaggaggaa ctgtgttgtt taaccagggg      960
gaagaaggta cctcctggta catcattctg aaaggatccg tgaatgtagt catttatggc     1020
aagggtgtgg tctgcaccct gcaogaagga gatgactttg gcaagtttag tctagtgaac     1080

```

ES 2 305 906 T3

```

gatgtccaa gagctgcctc cattgttctt cgggaagata attgtcactt cctaagagtc 1140
gacaaggaag acttcaatcg gattctgagg gacgttgagt ctagaatggt gagcaagggc 1200
gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccata ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc 1260
cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 1320
aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccttggc ccaccctcgt gaccaccctg 1380
acctggggcg tgcagtgctt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc 1440
aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc 1500
aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag 1560
ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac 1620
tacatcagcc acaacgtcta tatcaccgcc gacaagcaga agaacggcat caaggccaac 1680
ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 1740
aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccag 1800
tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggtcctgct ggagtctgtg 1860
accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 1905

```

<210> 43

<211> 633

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de Epac2 (E292-E443)

<400> 43

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1           5           10           15

```

```

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20           25           30

```

```

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35           40           45

```

```

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50           55           60

```

```

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65           70           75           80

```

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
565 570 575

5 Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
580 585 590

10 Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
595 600 605

15 Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
610 615 620

20 Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
625 630

<210> 44

<211> 1869

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> Construcción de fusión de Epac2 (M304-E443)

<400> 44

35 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
40 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca cttcgggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
45 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
50 aagetggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
55 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcgga tggacgagct gtacaaggaa 720

60

65

ES 2 305 906 T3

	ttcatggggcc	ctgacgcccc	catgagaatg	atcctgcgaa	aaccacctgg	ccagaggact	780
	gtggatgacc	tagagattat	ctacgacgag	ctccttcata	ttaaagcctt	atcccatctc	840
5	tctaccacag	tgaaacggga	gttagcaggt	gttctcattt	ttgagtctca	cgccaaagga	900
	ggaactgtgt	tgtttaacca	gggggaagaa	ggtacctcct	ggtacatcat	tctgaaagga	960
10	tccgtgaatg	tagtcattta	tggcaagggg	gtgggtctgca	ccctgcacga	aggagatgac	1020
	tttggcaagt	tagctctagt	gaacgatgct	ccaagagctg	cctccattgt	tcttcgggaa	1080
	gataattgtc	acttcctaag	agtcgacaag	gaagacttca	atcggattct	gagggacgtt	1140
15	gagtctagaa	tggtagcaaa	gggcgaggag	ctgttcaccg	gggtggtgcc	catcctggtc	1200
	gagctggacg	gcgacgtaaa	cggccacaag	ttcagcgtgt	cggcgagggg	cgagggcgat	1260
20	gccacctacg	gcaagctgac	cctgaagttc	atctgcacca	ccggcaagct	gcccgtgccc	1320
	tggcccaccc	tcgtgaccac	cctgacctgg	ggcgtgcagt	gcttcagccg	ctaccccgac	1380
	cacatgaagc	agcacgactt	cttcaagtcc	gccatgcccg	aaggctacgt	ccaggagcgc	1440
25	accatcttct	tcaaggacga	cggcaactac	aagaccgcg	ccgaggtgaa	gttcgagggc	1500
	gacaccttgg	tgaaccgcat	cgagctgaag	ggcatcgact	tcaaggagga	cggcaacatc	1560
30	ctggggcaca	agctggagta	caactacatc	agccacaacg	tctatatcac	cgccgacaag	1620
	cagaagaacg	gcatcaaggc	caacttcaag	atccgccaca	acatcgagga	cggcagcgtg	1680
	cagctcgccg	accactacca	gcagaacacc	cccatcgcg	acggccccgt	gctgctgccc	1740
35	gacaaccact	acctgagcac	ccagtcgcgc	ctgagcaaa	accccaacga	gaagcgcgat	1800
	cacatggtcc	tgctggagtt	cgtgaccgcc	gccgggatca	ctctcggcat	ggacgagctg	1860
40	tacaagtaa						1869

<210> 45

45 $\langle 211 \rangle$ 621

<212> PRT

<213> secuencia artificial

50 $\langle 220 \rangle$

<223> Construcción de fusión de Epac2 (M304-E443)

<400> 45

55

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

60

65

ES 2 305 906 T3

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

5

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

10

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

15

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

20

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

25

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

30

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

35

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

40

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

45

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

50

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

55

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

60

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

65

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu
 225 230 235 240

Phe Met Gly Pro Asp Ala His Met Arg Met Ile Leu Arg Lys Pro Pro
 245 250 255

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
 500 505 510
 5
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 515 520 525
 10
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 530 535 540
 15
 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 545 550 555 560
 20
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
 565 570 575
 25
 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
 580 585 590
 30
 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 595 600 605
 35
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 610 615 620
 40
 <210> 46
 <211> 1851
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Construcción de fusión de Epac2 (M310-E443)
 50
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 55
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggccccacc 180
 60
 ctcgtgacca cttcgggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 65
 ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

ES 2 305 906 T3

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 5 ggcatacaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgetgctgcc cgacaaccac 600
 10 tacctgagct accagtcgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tegtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaaggaa 720
 ttcatagaaa tgatcctgcg aaaaccacct ggccagagga ctgtggatga cctagagatt 780
 15 atctacgacg agctccttca tattaagcc ttatcccatc tctctaccac agtgaacgg 840
 gagttagcag gtgttctcat ttttgagtct cacgccaaag gaggaactgt gttgtttaac 900
 20 cagggggaag aaggtacctc ctggtacatc attctgaaag gatccgtgaa tgtagtcatt 960
 tatggcaagg gtgtggtctg caacctgcac gaaggagatg actttggcaa gttagctcta 1020
 gtgaacgatg ctccaagagc tgectccatt gttcttcggg aagataattg tcacttccta 1080
 25 agagtcgaca aggaagactt caatcggatt ctgagggacg ttgagtctag aatggtgagc 1140
 aagggcgagg agctgttcac cgggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta 1200
 30 aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg 1260
 accctgaagt tcctctgcac caacggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc 1320
 accctgacct ggggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac 1380
 35 ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac 1440
 gacggcaact acaagaccgc cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc 1500
 40 atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag 1560
 tacaactaca tcagccacaa cgtctatata accgccgaca agcagaagaa cggcatcaag 1620
 gccaaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac 1680
 45 cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc 1740
 acccagtcgc cctgagcaa agacccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag 1800
 50 ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta a 1851

<210> 47

<211> 615

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de Epac2 (M310-E443)

ES 2 305 906 T3

<400> 47

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
450 455 460

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
465 470 475 480

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
485 490 495

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
500 505 510

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
515 520 525

Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
530 535 540

Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
545 550 555 560

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
565 570 575

Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
580 585 590

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
595 600 605

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
610 615

<210> 48
<211> 1965

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-Q454)

<400> 48

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

65

ES 2 305 906 T3

	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
5	ctcgtgacca ccttoggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
10	ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgaca'ccctg	360
	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactataa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
15	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
20	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcg tccatggtc	660
	ctgctggagt tcgtgaccgc cgcggggtac actctcggca tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcgaagaga agaaggagtg tgatgaagaa cttcaggaca ccatgctgct gctctcacag	780
25	atgggccctg acgcccacat gagaatgatc ctgcgaaaac cacctggcca gaggactgtg	840
	gatgacctag agattatcta cgacgagctc cttcatatta aagcettatc ccatctctct	900
30	accacagtga aacgggagtt agcaggtgtt ctcatttttg agtctcacgc caaaggagga	960
	actgtgttgt ttaaccaggg ggaagaagg acctcctgg acatcattct gaaaggatcc	1020
	gtgaatgtag tcatttatgg caagggtgtg gtctgcaccc tgcacgaagg agatgacttt	1080
35	ggcaagttag ctctagttaa cgatgctcca agagctgcct ccattgttct tcgggaagat	1140
	aattgtcact tctaagagt cgacaaggaa gacttcaatc ggattctgag ggacgttgag	1200
40	gcgaatacag tcagacttaa agaacatgac caattctgtt ctagaatggt gagcaagggc	1260
	gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccata ctggtegagc tggacggcga cgtaaacggc	1320
	cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg	1380
45	aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg	1440
	acctggggcg tgcagtgctt cagccgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc	1500
50	aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc	1560
	aactacaaga cccgcgcga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag	1620
	ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac	1680
55	tacatcagcc acaacgtcta tatcaccgcc gacaagcaga agaacggcat caaggccaac	1740
	ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag	1800
60	aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccag	1860
	tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca tggctcctgct ggagttcgtg	1920
65	accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa	1965

ES 2 305 906 T3

<211> 666

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> Proteína de fusión de Epac2 (E285-Q454)

10 <400> 49

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Asp Lys Glu Asp Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val Glu Ala Asn Thr
 405 410 415
 5
 Val Arg Leu Lys Glu His Asp Gln Phe Cys Ser Arg Val Ser Lys Gly
 420 425 430
 10
 Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
 435 440 445
 15
 Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
 450 455 460
 20
 Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
 465 470 475 480
 25
 Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val
 485 490 495
 30
 Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
 500 505 510
 35
 Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 515 520 525
 40
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
 530 535 540
 45
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 545 550 555 560
 50
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His
 565 570 575
 55
 Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His
 580 585 590
 60
 Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 595 600 605
 65
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 610 615 620
 Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 625 630 635 640

ES 2 305 906 T3

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
645 650 655

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
660 665

5

10 <210> 50

<211> 1977

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E460)

20

<400> 50

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac      120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag      240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc      300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggcccog tgetgctgcc cgacaaccac      600
tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcg tccatggtc      660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcgga tggacgagct gtacaaggaa      720
ttcgaagaga agaaggagtg tgatgaagaa cttcaggaca ccatgctgct gctctcacag      780
atgggccctg acgcccacat gagaatgata ctgcgaaaac cacctggcca gaggactgtg      840
gatgacctag agattatcta cgacgagctc cttcatatta aagccttata ccatctctct      900
accacagtga aacgggagtt agcaggtgtt ctcatTTTT agtctcacgc caaaggagga      960
actgtgttgt ttaaccaggg ggaagaaggt acctcctggt acatcattct gaaaggatcc     1020
gtgaatgtag tcatttatgg caagggtgtg gtctgcaccc tgcacgaagg agatgacttt     1080

```

ES 2 305 906 T3

5 ggcaagttag ctctagttaa cgatgctcca agagctgcct ccattgttct tcgggaagat 1140
 aattgtcact tcctaagagt cgacaaggaa gacttcaatc ggattctgag ggacgttgag 1200
 10 gcgaatacag tcagacttaa agaacatgac caagatgtct tggtagtgga gtctagaatg 1260
 gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgcccc tcctggtcga gctggacggc 1320
 gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc caccacggc 1380
 aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc 1440
 15 gtgaccaccc tgacctgggg cgtgcagtgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag 1500
 cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc 1560
 aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcgc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 1620
 20 aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 1680
 ctggagtaca actacatcag ccacaacgtc tatatcaccg ccgacaagca gaagaacggc 1740
 atcaaggcca acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac 1800
 25 cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgccga caaccactac 1860
 ctgagcacc agtcgcgcct gagcaaagac ccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 1920
 30 ctggagttcg tgaccgcgc cgggatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtaa 1977

<210> 51
 <211> 657
 35 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E460)
 <400> 51

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

60

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Glu Leu Leu His Ile Lys Ala Leu Ser His Leu Ser Thr Thr Val Lys
 290 295 300
 5
 Arg Glu Leu Ala Gly Val Leu Ile Phe Glu Ser His Ala Lys Gly Gly
 305 310 315 320
 10
 Thr Val Leu Phe Asn Gln Gly Glu Glu Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile
 325 330 335
 15
 Leu Lys Gly Ser Val Asn Val Val Ile Tyr Gly Lys Gly Val Val Cys
 340 345 350
 20
 Thr Leu His Glu Gly Asp Asp Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn Asp
 355 360 365
 25
 Ala Pro Arg Ala Ala Ser Ile Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His Phe
 370 375 380
 30
 Leu Arg Val Asp Lys Glu Asp Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val Glu
 385 390 395 400
 35
 Ala Asn Thr Val Arg Leu Lys Glu His Asp Gln Asp Val Leu Val Leu
 405 410 415
 40
 Glu Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
 420 425 430
 45
 Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val
 435 440 445
 50
 Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
 450 455 460
 55
 Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
 465 470 475 480
 60
 Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
 485 490 495
 65
 Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
 500 505 510
 Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
 515 520 525

ES 2 305 906 T3

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
530 535 540

5 Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
545 550 555 560

10 Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln
565 570 575

15 Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
580 585 590

20 Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
595 600 605

25 Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
610 615 620

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
625 630 635 640

30 Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
645 650 655

35 <210> 52
<211> 1929
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> Construcción de fusión e Epac2 (E285-I388-EYFP-G390-E443-ECFP)

45 <400> 52

gaagagaaga aggagtgtga tgaagaactt caggacacca tgctgctgct ctcacagatg 60

50 ggccttgacg cccacatgag aatgatcctg cgaaaaccac ctggccagag gactgtggat 120

gacctagaga ttatctacga cgagctcctt catattaaag ccttatccca tctctctacc 180

55 acagtgaaac gggagtttagc aggtgttctc atttttgagt ctcacgcaa aggaggaact 240

gtgtttgttta accaggggga agaaggtacc tcctggtaca tcattctgaa aggatccgtg 300

60

65

ES 2 305 906 T3

	aatgtagtca ttgctagcat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgcc	360
	atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc	420
5	gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagtcca tctgcaccac cggcaagctg	480
	cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ttcggtctacg gcctgcagtg cttcgcccg	540
10	taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccgga aggctacgtc	600
	caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag	660
15	ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcac gagctgaagg gcctcgactt caaggaggac	720
	ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	780
	gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac	840
20	ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcgccga cggccccgtg	900
	ctgctgcccg acaaccacta cctgagctac cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag	960
25	aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcgtg	1020
	gacgagctgt acaaggaatt cggcaagggg gtggtctgca ccctgcacga aggagatgac	1080
	tttggaagt tagctctagt gaacgatgct ccaagagctg cctccattgt tcttcgggaa	1140
30	gataattgtc acttcctaag agtcgacaag gaagacttca atcggattct gagggacgtt	1200
	gagtctagaa tggtagcaa ggcgaggag ctgttcaccg ggtggtgcc catcctggtc	1260
35	gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat	1320
	gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccggtccc	1380
40	tggccacccc tcgtgaccac cctgacctgg ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac	1440
	cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc	1500
	accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc	1560
45	gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcctcgact tcaaggagga cggcaacatc	1620
	ctggggcaca agctggagta caactacatc agccacaacg tctatatcac cgccgacaag	1680
50	cagaagaacg gcaccaaggc caacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg	1740
	cagctcgccg accactacca gcagaacacc ccatcgccg acggccccgt gctgctgcc	1800
	gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat	1860
55	cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcgt ggacgagctg	1920
	tacaagtaa	1929

60
 <210> 53
 <211> 658
 <212> PRT
 65 <213> secuencia artificial
 <220>

ES 2 305 906 T3

<223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-I388-EYFP-G390-E443-ECFP)

<400> 53

5

Met Glu Glu Lys Lys Glu Cys Asp Glu Glu Leu Gln Asp Thr Met Leu
1 5 10 15

10

Leu Leu Ser Gln Met Gly Pro Asp Ala His Met Arg Met Ile Leu Arg
20 25 30

15

Lys Pro Pro Gly Gln Arg Thr Val Asp Asp Leu Glu Ile Ile Tyr Glu
35 40 45

20

Glu Leu Leu His Ile Lys Ala Leu Ser His Leu Ser Thr Thr Val Lys
50 55 60

25

Arg Glu Leu Ala Gly Val Leu Ile Phe Glu Ser His Ala Lys Gly Gly
65 70 75 80

30

Thr Val Leu Phe Asn Gln Gly Glu Glu Gly Thr Ser Trp Tyr Ile Ile
85 90 95

35

Leu Lys Gly Ser Val Asn Val Val Ile Ala Ser Val Ser Lys Gly Glu
100 105 110

40

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
115 120 125

45

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
130 135 140

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
145 150 155 160

50

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln
165 170 175

55

Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys
180 185 190

60

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser
435 440 445

5

Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
450 455 460

10

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
465 470 475 480

15

Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
485 490 495

20

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
500 505 510

Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
515 520 525

25

Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
530 535 540

30

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
545 550 555 560

35

Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys
565 570 575

40

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
580 585 590

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
595 600 605

45

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
610 615 620

50

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
625 630 635 640

55

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
645 650 655

Tyr Lys

60

<210> 54

<211> 1980

65

<212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 305 906 T3

<220>

<223> Construcción de fusión se Epac2 (E285-I388-EYFP-G390-E460-ECFP)

5 <400> 54

	gaagagaaga agggagtgtga tgaagaactt caggacacca tgctgctgct ctcacagatg	60
10	ggccctgacg cccacatgag aatgatcctg cgaaaaccac ctggccagag gactgtggat	120
	gacctagaga ttatctacga cgagctcctt catattaaag ccttatccca tctctctacc	180
15	acagtgaaac gggagttagc aggtgttctc atttttgagt ctcacgcca aggaggaact	240
	gtgttggtta accaggggga agaaggtacc tcctgggtaca tcattctgaa aggatccgtg	300
	aatgtagtca ttgctagcat ggtgagcaag ggcgaggagc tggtcaccgg ggtggtgccc	360
20	atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc	420
	gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg	480
25	cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ttcggtacg gcctgcagtg cttcgcccgc	540
	taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc	600
	caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag	660
30	ttcgagggcg acacctggt gaaccgcac gagctgaag gcacgactt caaggaggac	720
	ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	780
35	gccgacaagc agaagaacgg catcaagggtg aacttcaaga tccgccaca catcgaggac	840
	ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcgccga cggccccgtg	900
40	ctgctgcccg acaaccacta cctgagctac cagtcgccc tgagcaaaga cccaacgag	960
	aagcgcgatc acatggtcct gctggagtgc gtgaccgcc cggggatcac tctcgcatg	1020
	gacgagctgt acaaggaatt cggcaagggt gtggtctgca ccctgcacga aggagatgac	1080
45	tttggcaagt tagctctagt gaacgatgct ccaagagctg cctccattgt tcttcgggaa	1140
	gataattgtc acttcctaag agtcgacaag gaagacttca atcggattct gagggacgtt	1200
50	gaggcgaata cagtcagact taaagaacat gaccaagatg tcttggtact ggagtctaga	1260
	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	1320

55

60

65

ES 2 305 906 T3

	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga	tgccacctac	1380
	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc	ctggcccacc	1440
5	ctcgtgacca	ccctgacctg	gggcgtgcag	tgcttcagcc	gctaccccga	ccacatgaag	1500
	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	caccatcttc	1560
10	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcgaggg	cgacaccctg	1620
	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	cctggggcac	1680
	aagctggagt	acaactacat	cagccacaac	gtctatatca	ccgccgacaa	gcagaagaac	1740
15	ggcatcaagg	ccaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	1800
	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgctgctgcc	cgacaaccac	1860
20	tacctgagca	cccagtcgcg	cctgagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcga	tcacatggtc	1920
	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccggggatc	actctcggca	tggacgagct	gtacaagtaa	1980

25 <210> 55
 <211> 658
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Construcción de fusión se Epac2 (E285-I388-EYFP-G390-E460-ECFP)
 35 <400> 55

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
 325 330 335
 5 Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu Phe Gly Lys Gly Val Val
 340 345 350
 10 Cys Thr Leu His Glu Gly Asp Asp Phe Gly Lys Leu Ala Leu Val Asn
 355 360 365
 15 Asp Ala Pro Arg Ala Ala Ser Ile Val Leu Arg Glu Asp Asn Cys His
 370 375 380
 Phe Leu Arg Val Asp Lys Glu Asp Phe Asn Arg Ile Leu Arg Asp Val
 385 390 395 400
 20 Glu Ala Asn Thr Val Arg Leu Lys Glu His Asp Gln Asp Val Leu Val
 405 410 415
 25 Leu Glu Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
 420 425 430
 30 Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser
 435 440 445
 35 Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
 450 455 460
 Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
 465 470 475 480
 40 Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
 485 490 495
 45 His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
 500 505 510
 50 Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
 515 520 525
 55 Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
 530 535 540
 60 Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
 545 550 555 560
 65

ES 2 305 906 T3

Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys
565 570 575

5 Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
580 585 590

10 Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
595 600 605

15 Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
610 615 620

20 Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
625 630 635 640

25 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
645 650 655

<210> 56

<211> 1962

30 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E443 anclada a la membrana)

<400> 56

40 atgggatgta tcaatagcaa gcgcaaagat gctagcatgg tgagcaaggg cgaggagctg 60
ttcaccgggg tggtgccc atctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 120
45 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc 180
tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacett cggctacggc 240
ctgcagtgtc tcgcccgtca ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc 300
50 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag 360
acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 420
55 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc 480
cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc 540

60

65

ES 2 305 906 T3

```

cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgcgacc actaccagca gaacaccccc 600
atcggcgacg gccccgtgct gctgcccagc aaccactacc tgagctacca gtccgccctg 660
5 agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc 720
gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aaggaattcg aagagaagaa ggagtgtgat 780
10 gaagaacttc aggacaccat gctgctgctc tcacagatgg gccctgacgc ccacatgaga 840
atgatcctgc gaaaaccacc tggccagagg actgtggatg acctagagat tatctacgac 900
gagctccttc atattaaagc cttatcccat ctctctacca cagtgaacg ggagttagca 960
15 ggtgttctca tttttgagtc tcacgcaaaa ggaggaactg tgttgtttaa ccagggggaa 1020
gaaggtagct cctggtacat cattctgaaa ggatccgtga atgtagtcac ttatggcaag 1080
20 ggtgtggtct gcaccctgca cgaaggagat gactttggca agttagctct agtgaacgat 1140
gtccaagag ctgcctccat tgttcttcgg gaagataatt gtcacttcct aagagtcgac 1200
aaggaagact tcaatcggat tctgaggagc gttgagctca gaatggtgag caagggcgag 1260
25 gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 1320
aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag 1380
30 ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc 1440
tggggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag 1500
tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac 1560
35 tacaagacct gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggagaaccg catcgagctg 1620
aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 1680
40 atcagccaca acgtctatat caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa ggccaacttc 1740
aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 1800
acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc 1860
45 gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gtctctgacc 1920
gccgccggga tcactctcgg catggacgag ctgtacaagt aa 1962

```

<210> 57

<211> 652

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de Epac2 (E285-E443 anclada a la membrana)

ES 2 305 906 T3

<400> 57

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp
465 470 475 480

Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp
485 490 495

Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile
500 505 510

Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe
515 520 525

Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe
530 535 540

Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile
545 550 555 560

Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys
565 570 575

Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu
580 585 590

Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu
595 600 605

Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp
610 615 620

Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala
625 630 635 640

Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
645 650

<210> 58

<211> 1869

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de PKA (M264-A403)

ES 2 305 906 T3

<400> 58

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
5	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
10	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
15	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
20	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcg tcatatggtc	660
25	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcatgtacg agagctttat tgagtcactg ccattcctca agtctctgga ggtttctgaa	780
30	cgctgaagg tggtagatgt gattggcacc aaagtttaca acgatggaga acagatcatt	840
	gctcagggag actcggcgga ttctgtcttc attgtagaat ctggagaagt gagaattact	900
	atgaagagaa agggtaaadc agacatcgaa gagaacggtg ctgtggaaat cgctcggtgt	960
35	ctccggggac agtatttttg agagcttgcc ctggctacta acaagccaag agcagcatct	1020
	gcacacgcca ttgggactgt caaatgctta gccatggatg tgcaagcatt tgagaggctt	1080
40	ctgggacctt gcatggaaat tatgaagagg aatatcgcca cctatgagga gcaattagtt	1140
	gcatctagaa tggtagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc catcctggtc	1200
	gagctggacg gcgacgtaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat	1260
45	gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc	1320
	tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctgg ggctgcagt gcttcagccg ctaccccgac	1380
50	cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc	1440
	accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc	1500
	gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc	1560
55	ctggggcaca agctggagta caactacatc agccacaacg tctatatcac cgccgacaag	1620
	cagaagaacg gcatcaaggc caacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg	1680
60	cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc	1740
	gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaaag accccaacga gaagcgcgat	1800
65	cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcgcat ggacgagctg	1860
	tacaagtaa	1869

ES 2 305 906 T3

<210> 59

<211> 621

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de PKA (M264-A403)

10

<400> 59

15 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

20 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

25 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

30 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

35 Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

40 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

45 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

50 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

55 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

60

65

70

75

ES 2 305 906 T3

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu
 225 230 235 240
 Phe Met Tyr Glu Ser Phe Ile Glu Ser Leu Pro Phe Leu Lys Ser Leu
 245 250 255
 Glu Val Ser Glu Arg Leu Lys Val Val Asp Val Ile Gly Thr Lys Val
 260 265 270
 Tyr Asn Asp Gly Glu Gln Ile Ile Ala Gln Gly Asp Ser Ala Asp Ser
 275 280 285
 Phe Phe Ile Val Glu Ser Gly Glu Val Arg Ile Thr Met Lys Arg Lys
 290 295 300
 Gly Lys Ser Asp Ile Glu Glu Asn Gly Ala Val Glu Ile Ala Arg Cys
 305 310 315 320
 Leu Arg Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Leu Ala Leu Val Thr Asn Lys Pro
 325 330 335
 Arg Ala Ala Ser Ala His Ala Ile Gly Thr Val Lys Cys Leu Ala Met
 340 345 350
 Asp Val Gln Ala Phe Glu Arg Leu Leu Gly Pro Cys Met Glu Ile Met
 355 360 365
 Lys Arg Asn Ile Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Leu Val Ala Ser Arg Val
 370 375 380

ES 2 305 906 T3

Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
 385 390 395 400
 5
 Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 405 410 415
 10
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
 420 425 430
 15
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
 435 440 445
 20
 Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
 450 455 460
 25
 Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
 465 470 475 480
 30
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
 485 490 495
 35
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
 500 505 510
 40
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 515 520 525
 45
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 530 535 540
 50
 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 545 550 555 560
 55
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
 565 570 575
 60
 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
 580 585 590
 65
 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 595 600 605
 70
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 610 615 620

<210> 60

<211> 1954

65 <212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 305 906 T3

<220>

<223> Construcción de fusión de PKA (V255-A416-HA)

5 <400> 60

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
10	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
15	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
20	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
25	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
30	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcgtaaaaa acaatgccaa aaatgtacga gagctttatt gagtcactgc cattcctcaa	780
35	gtctctggag gtttctgaac gcctgaaggt ggtagatgtg attggcacca aagtttacia	840
	cgatggagaa cagatcattg ctcagggaga ctcggcggat tcgttcttca ttgtagaatc	900
	tggagaagtg agaattacta tgaagagaaa gggtaaatca gacatcgaag agaacgggtgc	960
40	tgtggaaatc gctcgggtgc tccggggaca gtattttggg gagcttgccc tggtcactaa	1020
	caagccaaga gcagcatctg cacacgccat tgggactgtc aaatgcttag ccatggatgt	1080
45	gcaagcattt gagaggcttc tgggaccttg catggaaatt atgaagagga atatcgccac	1140
	ctatgaggag caattagttg cactgtttgg gacaaacatg gatattgttg agcccactgc	1200
50	aaagctttat ccttatgatg ttcctgatta tgccatggtg agcaagggcg aggagctgtt	1260
	caccggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag	1320

55

60

65

ES 2 305 906 T3

5 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 1380
 caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctggggcgt 1440
 gcagtgtctc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat 1500
 gccgaaggc tacgtccagg agcgacccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 1560
 10 ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat 1620
 cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acatcagcca 1680
 caacgtctat atcaccgccg acaagcagaa gaacggcatc aaggccaact tcaagatccg 1740
 ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgcgaccac taccagcaga acaccccat 1800
 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccagc cgcacctgag 1860
 20 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gaggtcgtga ccgccgcgg 1920
 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaa 1954

25 <210> 61
 <211> 652
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> proteína de fusión de PKA (V255-A416-HA)
 35 <400> 61

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Asn Gly Ala Val Glu Ile Ala Arg Cys Leu Arg Gly Gln Tyr Phe Gly
 325 330 335
 5
 Glu Leu Ala Leu Val Thr Asn Lys Pro Arg Ala Ala Ser Ala His Ala
 340 345 350
 10
 Ile Gly Thr Val Lys Cys Leu Ala Met Asp Val Gln Ala Phe Glu Arg
 355 360 365
 15
 Leu Leu Gly Pro Cys Met Glu Ile Met Lys Arg Asn Ile Ala Thr Tyr
 370 375 380
 20
 Glu Glu Gln Leu Val Ala Leu Phe Gly Thr Asn Met Asp Ile Val Glu
 385 390 395 400
 25
 Pro Thr Ala Lys Leu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Val
 405 410 415
 30
 Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
 420 425 430
 35
 Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 435 440 445
 40
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
 450 455 460
 45
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
 465 470 475 480
 50
 Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
 485 490 495
 55
 Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
 500 505 510
 60
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
 515 520 525
 65
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Lys Gly Ile Asp Phe
 530 535 540
 70
 Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile
 545 550 555 560

ES 2 305 906 T3

Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys
565 570 575

Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu
580 585 590

Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu
595 600 605

Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp
610 615 620

Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala
625 630 635 640

Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
645 650

<210> 62

<211> 1935

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de PKA (M264-A-416-HA)

<400> 62

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac      120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag      240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctaag tccaggagcg caccatcttc      300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac      600
taectgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc      660

```

ES 2 305 906 T3

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcggca tggacgagct gtacaaggaa 720
 ttcatgtacg agagctttat tgagtcactg ccattcctca agtctctgga gggttctgaa 780
 5 cgctgaagg tggtagatgt gattggcacc aaagtttaca acgatggaga acagatcatt 840
 gctcaggag actcggcgga ttcgttcttc attgtagaat ctggagaagt gagaattact 900
 10 atgaagagaa agggtaaata agacatcgaa gagaacggtg ctgtggaaat cgctcgggtg 960
 ctccggggac agtatttttg agagcttgcc ctggtcacta acaagccaag agcagcatct 1020
 gcacacgcca ttgggactgt caaatgctta gccatggatg tgcaagcatt tgagaggctt 1080
 15 ctgggacctt gcatggaaat tatgaagagg aatatcgcca cctatgagga gcaattagtt 1140
 gcaactgttg ggacaaacat ggatattgtt gagccactg caaagcttta tccttatgat 1200
 20 gttcctgatt atgccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc 1260
 ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgaggcgag 1320
 ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc 1380
 25 gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg acctggggcg tgcaagtgtt cagccgctac 1440
 cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag 1500
 30 gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc 1560
 gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 1620
 aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacatcagcc acaacgtcta tatcacggcc 1680
 35 gacaagcaga agaacggcat caaggccaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 1740
 agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccggtctg 1800
 40 ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag 1860
 cgcgatcaca tggtcctgct ggagtctgtg accgccgccc ggatcactct cggcatggac 1920
 45 gagctgtaca agtaa 1935

<210> 63
 50 <211> 643
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Construcción de fusión de PKA (M264-A416-HA)

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 63

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 485 490 495
 5
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 500 505 510
 10
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 515 520 525
 15
 Ile Glu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His
 530 535 540
 20
 Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp
 545 550 555 560
 25
 Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile
 565 570 575
 30
 Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 580 585 590
 35
 Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr
 595 600 605
 40
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
 610 615 620
 45
 Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
 625 630 635 640
 50
 Leu Tyr Lys
 55
 <210> 64
 <211> 1902
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción de fusión de PKA (V255-I331-EYFP-E333-A403-ECFP)
 60
 65

ES 2 305 906 T3

<400> 64

	atggttaaaaa acaatgccaa aaagaggaag atgtacgaga gctttattga gtcactgcc	60
5	ttcctcaagt ctctggaggt ttctgaacgc ctgaagggtg tagatgtgat tggcaccaaa	120
	gtttacaacg atggagaaca gatcattgct caggagagact cggcggattc gttcttcatt	180
10	gtagaatctg gagaagttag aattactatg aagagaaagg gtaaatacaga catcgctagc	240
	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggc cgagctggac	300
	ggcgacgtaa acggccacaa gtccagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	360
15	ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	420
	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	480
20	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	540
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	600
	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	660
25	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	720
	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	780
30	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	840
	tacctgagct accagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	900
	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaaggaa	960
35	ttcgagaacg gtgctgtgga aatcgctcgg tgtctccggg gacagtattt tggagagctt	1020
	gccctggtca ctaacaagcc aagagcagca tctgcacacg ccattgggac tgtcaaattgc	1080
40	ttagccatgg atgtgcaagc atttgagagg cttctgggac cttgcatgga aattatgaag	1140
	aggaatatcg ccacctatga ggagcaatta gttgcatcta gaatggtgag caagggcgag	1200
	gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac	1260
45	aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag	1320
	ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccggt ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc	1380
50	tggggcggtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag	1440
	tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac	1500
	tacaagaccc gcgcccaggt gaagttcgag ggcgacaccc tgggtgaaccg catcgagctg	1560
55	aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac	1620
	atcagccaca acgtctatat caccgcccgc aagcagaaga acggcatcaa ggccaacttc	1680
60	aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac	1740
	accccatcgc gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc	1800
	gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc	1860
65	gccgcccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aa	1902

ES 2 305 906 T3

<210> 65

<211> 631

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de fusión de PKA (V255-I333-EYFP-E333-A403-ECFP)

10

<400> 65

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 405 410 415
 5 Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 420 425 430
 10 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 435 440 445
 15 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe
 450 455 460
 20 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 465 470 475 480
 25 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 485 490 495
 30 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 500 505 510
 35 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 515 520 525
 40 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
 530 535 540
 45 Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
 545 550 555 560
 50 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 565 570 575
 55 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 580 585 590
 60 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 595 600 605
 65 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 610 615 620
 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 625 630

<210> 66

<211> 1965

<212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 305 906 T3

<220>

<223> Construcción de fusión de HCN2 (A467-K638)

5 <400> 66

	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
10	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
15	ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccgga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
20	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
25	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
30	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggata actctcgcca tggacgagct gtacaaggaa	720
	ttcgctgact tccgccagaa gatccacgat tactatgaac accggtacca agggaagatg	780
35	tttgatgagg acagcatcct tggggaactc aacggggcac tgctgagga gattgtgaac	840
	ttcaactgcc ggaagctggt ggcttccatg ccgctgtttg ccaatgcaga cccaacttc	900
	gtcacagcca tgctgacaaa gctcaaattt gaggtcttcc agcctggaga ttacatcatc	960
40	cgagagggga ccatcgggaa gaagatgtac ttcattccagc atggggtggt gagcgtgctc	1020
	accaagggca acaaggagat gaagctgtcg gatggctcct atttcgggga gatctgcttg	1080
45	ctcacgaggg gccggcgtag ggccagcgtg cgagctgaca cctactgtcg cctctactca	1140
	ctgagtgtgg acaatttcaa cgaggtgctg gaggaatacc ccatgatgcg gcgtgccttt	1200
	gagactgtgg ctattgaccg gctagatcgc ataggcaagt ctagaatggt gagcaagggc	1260
50	gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccatc ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc	1320

55

60

65

ES 2 305 906 T3

cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcc cctacggcaa gctgaccctg 1380
 aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg 1440
 5 acctggggcg tgcagtgttt cagccgttac cccgaccaca tgaagcagca cgactttctt 1500
 aagtccgcca tgcgccgaagg ctacgtccag gagcgccacca tcttcttcaa ggacgacggc 1560
 10 aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag 1620
 ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac 1680
 15 tacatcagcc acaacgtcta tatcaccgcc gacaagcaga agaacggcat caaggccaac 1740
 ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 1800
 aacacccccca tcggcgacgg ccccggtgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccag 1860
 20 tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggtcctgct ggagttcgtg 1920
 accgccgcgg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 1965

25 <210> 67
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Construcción de fusión de HCN2 (A467-K638)
 35 <400> 67

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

60

65

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
565 570 575

5 Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
580 585 590

10 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
595 600 605

15 Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
610 615 620

20 Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
625 630 635 640

25 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
645 650

<210> 68

<211> 1875

30 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción de fusión de HCN2 (G497-K638)

<400> 68

40 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatactggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
45 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca ctttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
50 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
55 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
60 tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660

65

ES 2 305 906 T3

ctgctggagt tctgtaccgc cgcggggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggaa 720
 ttccggccac tgcgtgagga gattgtgaac ttcaactgcc ggaagctggt ggcttccatg 780
 5 ccgctgtttg ccaatgcaga ccccaacttc gtcacagcca tgctgacaaa gctcaaattt 840
 gaggtcttcc agcctggaga ttacatcatc cgagagggga ccatcgggaa gaagatgtac 900
 10 ttcatccagc atgggtggt gagcgtgctc accaagggca acaaggagat gaagctgtcg 960
 gatggctcct atttcgggga gatctgcttg ctacagaggg gccggcgtac ggccagcgtg 1020
 cgagctgaca cctactgtcg cctctactca ctgagtgtgg acaatttcaa cgaggtgctg 1080
 15 gaggaatacc ccatgatgcg gcgtgccttt gagactgtgg ctattgaccg gctagatcgc 1140
 ataggcaagt ctagaatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccac 1200
 20 ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag 1260
 ggcgatgcc a cctacggcaa gctgacctg aagttcatct gcaccaccg caagctgcc 1320
 gtgccctggc ccaccctcgt gaccacctg acctggggcg tgcagtgtt cagccgctac 1380
 25 cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgagg ctacgtccag 1440
 gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtcc 1500
 30 gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 1560
 aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacatcagcc acaacgtcta tatcaccgcc 1620
 35 gacaagcaga agaacggcat caaggccaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 1680
 agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgctg 1740
 ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagaccc caacgagaag 1800
 40 cgcgatcaca tggctcctgt ggagttcgtg accgcccgcg ggatcactct cggcatggac 1860
 gagctgtaca agtaa 1875

45 <210> 69
 <211> 623
 <212> PRT
 50 <213> secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Construcción de fusión de HCN2 (G497-K638)

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 69

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 485 490 495
 5 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 500 505 510
 10 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 515 520 525
 15 Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 530 535 540
 20 Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 545 550 555 560
 25 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 565 570 575
 30 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 580 585 590
 35 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 595 600 605
 40 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 610 615 620

<210> 70
 <211> 1796
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Construcción de fusión de HCN2 (P523-K638)
 50 <400> 70

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 55 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 60 ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccca ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ES 2 305 906 T3

5 ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcacatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 10 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcg tccatgggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgcggggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggaa 720
 15 ttcccaactt cgtcacagcc atgctgacaa agctcaaatt tgaggtcttc cagcctggag 780
 attacatcat ccgagagggg accatcggga agaagatgta cttcatccag catggggtgg 840
 20 tgagcgtgct caccaagggc aacaaggaga tgaagctgtc ggatggctcc tatttcgggg 900
 agatctgctt gctcacgagg ggccggcgta cggccagcgt gcgagctgac acctactgtc 960
 25 gcctctactc actgagtgtg gacaatttca acgaggtgct ggaggaatac cccatgatgc 1020
 ggcgtgcctt tgagactgtg gctattgacc ggctagatcg cataggcaag tctagaatgg 1080
 tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tgggtgcccac cctggctgag ctggacggcg 1140
 30 acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca 1200
 agctgacctt gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccacctcg 1260
 35 tgaccacctt gacctggggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc 1320
 acgacttctt caagtccgcc atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca 1380
 40 aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga 1440
 accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc 1500
 tggagtacaa ctacatcagc cacaacgtct atatcaccgc cgacaagcag aagaacggca 1560
 45 tcaaggccaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgcgacc 1620
 actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac aaccactacc 1680
 50 tgagcaccga gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggctcctgc 1740
 tggagttcgt gaccgcgcgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaa 1796

55 <210> 71
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Construcción de fusión de HCN2 (P523-K638)
 65

ES 2 305 906 T3

<400> 71

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn
 450 455 460
 5 Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn
 465 470 475 480
 10 Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu
 485 490 495
 15 Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr
 500 505 510
 20 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His
 515 520 525
 25 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn
 530 535 540
 30 Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu
 545 550 555 560
 35 Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His
 565 570 575
 40 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met
 580 585 590
 45 Asp Glu Leu Tyr Lys
 595
 <210> 72
 <211> 1896
 <212> ADN
 <213> *mus musculus*
 <400> 72
 50 atggtaaaaa acaatgccaa aaagaggaag atgtacgaga gctttattga gtcactgcca 60
 ttcctcaagt ctctggaggt ttctgaacgc ctgaagggtg tagatgtgat tggcaccaaa 120
 55 gtttacaacg atggagaaca gatcattgct caggagact cggcggattc gttcttcatt 180
 gtagaatctg gagaagttag aattactatg aagagaaagg gtaaatacaga catcgctagc 240
 60 gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcttggtcga gctggacggc 300

ES 2 305 906 T3

gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc 360
 aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc 420
 5 gtgaccacct tcggctacgg cctgcagtgc ttcgcccgt accccgacca catgaagcag 480
 cacgaattct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc 540
 10 aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 600
 aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 660
 ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 720
 15 atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac 780
 cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac 840
 20 ctgagctacc agtcgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 900
 ctggagtctg tgaccgcgc cgggatcact ctggcatgg acgagctgta caaggaattc 960
 gagaacggtg ctgtggaaat cgtcgggtgt ctccggggac agtattttgg agagcttgcc 1020
 25 ctggtcacta acaagccaag agcagcatct gcacacgcca ttgggactgt caaatgctta 1080
 gccatggatg tgcaagcatt tgagaggctt ctgggacctt gcatggaaat tatgaagagg 1140
 30 aatatcgcca cctatgagga gcaattagtt gcatctagag tgagcaaggg cgaggagctg 1200
 ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 1260
 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc 1320
 35 tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctggggc 1380
 gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgaattctt caagtccgcc 1440
 40 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag 1500
 acccgcccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 1560
 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacatcagc 1620
 45 cacaacgtct atatcaccgc cgacaagcag aagaacggca tcaaggccaa cttcaagatc 1680
 cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccgaacc actaccagca gaacaccccc 1740
 50 atcggcgacg gccccgtgct gctgcccga aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg 1800
 agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgcgcgc 1860
 55 gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaa 1896

<210> 73

<211> 631

<212> PRT

<213> *mus musculus*

ES 2 305 906 T3

<400> 73

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

ES 2 305 906 T3

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

ES 2 305 906 T3

Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe
 450 455 460
 5
 Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 465 470 475 480
 10
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 485 490 495
 15
 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 500 505 510
 20
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 515 520 525
 25
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr
 530 535 540
 30
 Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile
 545 550 555 560
 35
 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 565 570 575
 40
 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 580 585 590
 45
 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 595 600 605
 50
 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 610 615 620
 55
 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 625 630

<210> 74

<211> 863

55 <212> PRT

<213> *mus musculus*

60

65

ES 2 305 906 T3

<400> 74

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

ES 2 305 906 T3

Val Ile Glu Asp Asn Thr Glu Ile Ile Leu Asp Pro Glu Lys Ile Lys
 245 250 255
 5
 Lys Lys Tyr Leu Arg Thr Trp Phe Val Val Asp Phe Val Ser Ser Ile
 260 265 270
 10
 Pro Val Asp Tyr Ile Phe Leu Ile Val Glu Lys Gly Ile Asp Ser Glu
 275 280 285
 15
 Val Tyr Lys Thr Ala Arg Ala Leu Arg Ile Val Arg Phe Thr Lys Ile
 290 295 300
 20
 Leu Ser Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Ser Arg Leu Ile Arg Tyr Ile
 305 310 315 320
 25
 His Gln Trp Glu Glu Ile Phe His Met Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Ala
 325 330 335
 30
 Val Met Arg Ile Cys Asn Leu Ile Ser Met Met Leu Leu Leu Cys His
 340 345 350
 35
 Trp Asp Gly Cys Leu Gln Phe Leu Val Pro Met Leu Gln Asp Phe Pro
 355 360 365
 40
 Ser Asp Cys Trp Val Ser Ile Asn Asn Met Val Asn His Ser Trp Ser
 370 375 380
 45
 Glu Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Phe Lys Ala Met Ser His Met Leu Cys
 385 390 395 400
 50
 Ile Gly Tyr Gly Arg Gln Ala Pro Glu Ser Met Thr Asp Ile Trp Leu
 405 410 415
 55
 Thr Met Leu Ser Met Ile Val Gly Ala Thr Cys Tyr Ala Met Phe Ile
 420 425 430
 60
 Gly His Ala Thr Ala Leu Ile Gln Ser Leu Asp Ser Ser Arg Arg Gln
 435 440 445
 65
 Tyr Gln Glu Lys Tyr Lys Gln Val Glu Gln Tyr Met Ser Phe His Lys
 450 455 460
 70
 Leu Pro Ala Asp Phe Arg Gln Lys Ile His Asp Tyr Tyr Glu His Arg
 465 470 475 480

ES 2 305 906 T3

Tyr Gln Gly Lys Met Phe Asp Glu Asp Ser Ile Leu Gly Glu Leu Asn
 485 490 495
 5
 Gly Pro Leu Arg Glu Glu Ile Val Asn Phe Asn Cys Arg Lys Leu Val
 500 505 510
 10
 Ala Ser Met Pro Leu Phe Ala Asn Ala Asp Pro Asn Phe Val Thr Ala
 515 520 525
 15
 Met Leu Thr Lys Leu Lys Phe Glu Val Phe Gln Pro Gly Asp Tyr Ile
 530 535 540
 20
 Ile Arg Glu Gly Thr Ile Gly Lys Lys Met Tyr Phe Ile Gln His Gly
 545 550 555 560
 25
 Val Val Ser Val Leu Thr Lys Gly Asn Lys Glu Met Lys Leu Ser Asp
 565 570 575
 30
 Gly Ser Tyr Phe Gly Glu Ile Cys Leu Leu Thr Arg Gly Arg Arg Thr
 580 585 590
 35
 Ala Ser Val Arg Ala Asp Thr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ser Leu Ser Val
 595 600 605
 40
 Asp Asn Phe Asn Glu Val Leu Glu Glu Tyr Pro Met Met Arg Arg Ala
 610 615 620
 45
 Phe Glu Thr Val Ala Ile Asp Arg Leu Asp Arg Ile Gly Lys Lys Asn
 625 630 635 640
 50
 Ser Ile Leu Leu His Lys Val Gln His Asp Leu Ser Ser Gly Val Phe
 645 650 655
 55
 Asn Asn Gln Glu Asn Ala Ile Ile Gln Glu Ile Val Lys Tyr Asp Arg
 660 665 670
 60
 Glu Met Val Gln Gln Ala Glu Leu Gly Gln Arg Val Gly Leu Phe Pro
 675 680 685
 65
 Pro Pro Pro Pro Pro Gln Val Thr Ser Ala Ile Ala Thr Leu Gln Gln
 690 695 700
 Ala Val Ala Met Ser Phe Cys Pro Gln Val Ala Arg Pro Leu Val Gly
 705 710 715 720

ES 2 305 906 T3

	Pro	Leu	Ala	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Gly	
					725					730					735		
5	Pro	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	
					740				745					750			
10	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Thr	Ser	Pro	Tyr	Gly	Val	
					755				760					765			
15	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Thr	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	
		770					775					780					
20	Leu	Ser	Arg	Ala	Ser	Arg	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	
	785					790					795					800	
25	His	Gly	Val	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Pro	Ala	Ser	
					805					810					815		
30	Ser	Ser	Thr	Pro	Arg	Leu	Gly	Pro	Ala	Pro	Thr	Ala	Arg	Thr	Ala	Ala	
					820				825					830			
35	Pro	Ser	Pro	Asp	Arg	Arg	Asp	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	
				835				840					845				
40	Leu	Asp	Pro	Leu	Asp	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu		
	850						855					860					
45																	
50																	
55																	
60																	
65																	