



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 316 173**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **98954038 .0**
⑨⑥ Fecha de presentación : **29.10.1998**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1029046**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2000**

⑤④ Título: **Genes inducibles por *Wnt-1*.**

③⑩ Prioridad: **29.10.1997 US 63704 P**
04.02.1998 US 73612 P

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

⑦③ Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

⑦② Inventor/es: **Levine, Arnold, J. y**
Pennica, Diane

⑦④ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 316 173 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes inducibles por *Wnt-1*.

5 La presente invención se realizó con la ayuda del gobierno bajo la subvención nº 5P01 CA41086, otorgada por el National Institutes of Health, National Cancer Institute. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a la identificación y el aislamiento de ADN nuevo y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos útiles en el tratamiento de tumores.

Antecedentes de la invención

15 Los Wnts son codificados por una gran familia de genes cuyos miembros se han encontrado en gusanos redondos, insectos, pez cartilaginoso, y vertebrados. Holland *et al.*, Dev. Suppl., 125-133 (1994). Se piensa que los Wnts funcionan en una serie de procesos de desarrollo y fisiológicos, ya que muchas especies diversas tienen múltiples genes de *Wnt* conservados. McMahon, Trends Genet., 8: 236-242 (1992); Nusse y Varmus, Cell, 69: 1073-1087 (1992). Los genes de *Wnt* codifican glicoproteínas secretadas que se piensa que funcionan como señales paracrinas o autocrinas activas en varios tipos de células primitivas. McMahon, *supra*; Nusse y Varmus, *supra*. La familia del factor de crecimiento *Wnt* incluye más de diez genes identificados en el ratón (*Wnt-1*, -2, -3A, -3B, -4, -5A, -5B, -6, -7A, -7B, -8A, -8B, -10B, -11, -12, y 13) (ver, por ejemplo, Gavin *et al.*, Genes Dev., 4: 2319-2332 (1990); Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2268-2272 (1995); Christiansen *et al.*, Mech. Dev., 51: 341-350 (1995)) y por lo menos nueve genes identificados en el humano (*Wnt-1*, -2, -3, -5A, -7A, -7B, -8B, -10B, y -11) mediante clonación de ADNc. Ver, por ejemplo, Vant Veer *et al.*, Mol.Cell.Biol., 4: 2532-2534 (1984).

Originalmente se identificó el proto-oncogén de *Wnt-1* (*int-1*) a partir de tumores mamarios inducidos por el virus de tumor mamario de ratón (MMTV) debido a la inserción de secuencia de ADN viral. Nusse y Varmus, Cell, 31: 99-109 (1982). En ratones adultos, se detecta el nivel de expresión de ARNm de *Wnt-1* sólo en los testículos durante los estadios tardíos del desarrollo de esperma. La proteína *Wnt-1* es de aproximadamente 42 KDa y contiene una región hidrofóbica amino-terminal, la cual puede funcionar como secuencia señal para la secreción. Nusse y Varmus, *supra*, 1992. Se detecta la expresión de *Wnt-2/irp* en tejidos fetales y adultos de ratón y su distribución no se solapa con el patrón de expresión para *Wnt-1*. Se asocia *Wnt-3* con la tumorigénesis mamaria de ratón. Se detecta la expresión de *Wnt-3* en embriones de ratón en los tubos neurales y en las yemas de las patas. Se detectan transcripciones de *Wnt-5a* en las patas delanteras y traseras en desarrollo en los días del 9,5 al 14,5 y se concentran los niveles más altos en ectodermo apical en el extremo distal de las patas. Nusse y Varmus, *supra* (1992). Recientemente, se describió (WO95/17416) un factor de crecimiento de *Wnt*, llamado *Wnt-x*, junto con la detección de la expresión de *Wnt-x* en los tejidos óseos y en células derivadas de hueso. También se describió el papel de *Wnt-x* en el mantenimiento de osteoblastos maduros y el uso del factor de crecimiento de *Wnt-x* como agente terapéutico o en el desarrollo de otros agentes terapéuticos para tratar enfermedades relacionadas con los huesos.

Los Wnts pueden jugar un papel en la señalización celular local. Estudios bioquímicos han demostrado que la mayor parte de proteína *Wnt* secretada puede encontrarse asociada con la superficie celular o la matriz extracelular más que en difusión libre por el medio. Papkoff y Schryver, Mol. Cell. Biol., 10: 2723-2730 (1990); Bradley y Brown, EMBO J., 9: 1569-1575 (1990).

Estudios de mutaciones en los genes de *Wnt* han indicado una función para *Wnts* en el control de crecimiento y en el diseño tisular. En *Drosophila*, *wingless* (*wg*) codifica un gen relacionado con *Wnt* (Rijsewicz *et al.*, Cell, 50: 649-657 (1987)) y mutaciones de *wg* modifican el patrón de ectodermo embrionario, la neurogénesis, y el crecimiento externo de discos imaginales. Morata y Lawrence, Dev. Biol., 56: 227-240 (1977); Baker, Dev. Biol., 125: 96-108 (1988); Klingensmith y Nusse, Dev. Biol., 166: 396-414 (1994). En *Caenorhabditis elegans*, *lin-44* codifica un homólogo de *Wnt* que se requiere para divisiones celulares asimétricas. Herman y Horvitz, Development, 120: 1035-1047 (1994). Las mutaciones knock-out en ratones han demostrado que las *Wnts* son esenciales para el desarrollo del cerebro (McMahon y Bradley, Cell, 62: 1073-1085 (1990); Thomas y Cappechi, Nature, 346: 847-850 (1990)), y el crecimiento extremo de primordios embrionarios de riñón (Stark *et al.*, Nature, 372: 679-683 (1994)), el brote de la cola (Takada *et al.*, Genes Dev., 8: 174-189 (1994)), y el brote de las patas. Parr y McMahon, Nature, 374: 350-353 (1995). La sobreexpresión de *Wnts* en la glándula mamaria puede dar lugar a una hiperplasia mamaria (McMahon, *supra* (1992); Nusse y Varmus, *supra* (1992)), y desarrollo alveolar precoz. Bradbury *et al.*, Dev.Biol., 170: 553-563 (1995). Zheng *et al.* (1996) Oncogene 12, 555-562 describen un gen, *ret*, cuyo nivel de ARNm en células PC12 se incrementó mediante la expresión de *Wnt-1*.

Wnt-5a y *Wnt-5b* se expresan en el mesodermo lateral y posterior y el mesodermo extraembrionario del embrión de murino de 7-8 días. Gavin *et al.*, *supra*. Estos dominios embrionarios contribuyen a la región AGM y tejidos de saco vitelino a partir de los cuales se derivan los precursores hematopoyéticos multipotentes y HSCs. Dzierzak y Medvinsky, Trends Genet., 11: 359-366 (1995); Zon *et al.*, en Gluckman y Coulombel, ed., Colloque, INSERM, 235:17-22 (1995), presentado en el Joint International. Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, Paris Francia, Abril 3-6, 1995; Kanatsuy Nichikawa, Development, 122: 823-830 (1996). Se han detectado *Wnt-5a*, *Wnt-10b*, y otras *Wnts* en yemas de las patas, indicando posibles funciones en el desarrollo y el

diseño de microambiente de hueso temprano tal y como se muestra para *Wnt-7b*. Gavin *et al.*, *supra*; Christiansen *et al.*, *Mech. Devel.*, 51: 341-350 (1995); Parr y McMahon, *supra*.

El mecanismo de transducción de señal de Wnt/Wg juega un papel importante en el desarrollo biológico del organismo y se ha implicado en diversos cánceres humanos. Este mecanismo también incluye el gen supresor de tumor, APC. Las mutaciones en el gen de APC están asociadas con el desarrollo de formas heredadas y esporádicas de cáncer colorrectal humano. La señal Wnt/Wg conduce a la acumulación de beta-catenina/Armado en la célula, dando lugar a la formación de un complejo de transcripción bipartido que consiste en beta-catenina y un miembro de la familia del factor de transcripción de caja HMG de factor de unión al potenciador linfoide/factor de célula T (LEF/TCF). Este complejo se transloca al núcleo donde puede activar la expresión de genes “downstream” de la señal de Wnt/Wg, tales como los genes de *Engrailed* y *Ultrathorax* en *Drosophila*. No obstante, actualmente se desconocen los genes diana “downstream” de la señalización de Wnt-1 en vertebrados que presumiblemente funcionan en la tumorigénesis.

Para una revisión más reciente de Wnt, ver Cadigan y Nusse, *Genes & Dev.*, 11: 3286-3305 (1997).

Se ha implicado otra familia de proteínas, las subfamilias Rho y Rac de proteínas Ras, en la transformación mediante ras oncogénico. Hasta ahora, se ha observado que para la transformación de Ras es necesaria la activación de los mecanismos gobernados por tres miembros de la familia Rho de proteínas de unión de GTP, CDC42, Rac, y Rho. La activación de las mutaciones de Ras suceden en aproximadamente un 30% de todos los tumores humanos, indicando que los elementos de los mecanismos de señalización de CDC42, Rac, y Rho son dianas de fármacos para la terapia del cáncer. Estos tres miembros juegan un papel central en la organización del citoesqueleto de actina y regulan la transcripción. Como las Ras, las proteínas Rho interactúan directamente con proteínas quinasas, que es probable que sirvan como dianas de efectores “downstream” de la GTPasa activada. Las funciones de las diferentes proteínas Rho en la transformación de Ras parecen ser distintas: CDC42 controla específicamente el crecimiento independiente del anclaje, mientras que Rac controla la mitogenicidad inducida por Rac. Las proteínas G pequeñas Rac1, Rac2 y Rac3 están muy relacionadas con las GTPasas. Didsbury *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 16378-16382 (1989); Moll *et al.*, *Oncogene*, 6: 863-866 (1991); Shirsat *et al.*, *Oncogene*, 5: 769-772 (1990); Haataja *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272: 20384-20388 (1997). *RAC3* se localiza en el cromosoma 17q23-25, una región frecuentemente eliminada en el cáncer de mama. Cropp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7737-7741 (1990); Cornelis *et al.*, *Oncogene*, 8: 781-785 (1993). Datos recientes han proporcionado pruebas de que la actividad constitutiva de las GTPasas de la familia Rho está relacionada con la reorganización de citoesqueleto y el crecimiento desorganizado, la motilidad y la invasividad de las células, todos sellos distintivos de la neoplasia.

Existe la necesidad de elucidar los miembros adicionales de las anteriores familias, incluyendo las moléculas de la superficie celular que pueden ser antígenos específicos de tumores o proteínas que cumplen una función reguladora en la iniciación del mecanismo de Wnt de tumorigénesis. Esto también incluiría componentes “downstream” del mecanismo de señalización de Wnt que son importantes para el fenotipo transformado y el desarrollo del cáncer. También existe la necesidad de identificar otras proteínas que, quizá en conjunción con beta-catenina, regulen los genes downstream de Wnt-1, además de las GTPasas.

Descripción resumida de la invención

Se han identificado varios genes inducidos por Wnt-1 putativos a nivel de ARNm en un experimento de sustracción de ADNc de alto rendimiento. De este modo, los solicitantes han identificado nuevos clones de ADN (clon 65 y clon 320) que codifican nuevos polipéptidos que son inducidos por Wnt, designados como clon 65 y clon 320, respectivamente. La molécula clon 65 tiene homología con la subfamilia Rac y Rho indicada anteriormente.

En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende ADN que tiene por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos una identidad en la secuencia del 70% con (a) la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1 o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). Preferiblemente, este ácido nucleico tiene por lo menos una actividad biológica de clon 65.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende ADN que tiene por lo menos 700 nucleótidos y por lo menos una identidad en la secuencia del 95% determinada sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan con la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). Preferiblemente, este ácido nucleico comprende ADN que codifica el polipéptido del clon 65 humano que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 258 de figuras 5A y 5B (SEC ID No. 3), o el complemento del mismo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona ácido nucleico aislado que comprende ADN que tiene por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos una identidad en la secuencia del 70% con la secuencia de ácidos nucleicos 1-783 de la SEC ID No. 4, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). Preferiblemente, este ácido nucleico comprende ADN que tiene por lo menos aproximadamente una identidad en la secuencia del 85% con la secuencia de ácidos nucleicos 1-783 de la SEC ID No. 4, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). Preferiblemente, este ácido nucleico comprende ADN que codifica el polipéptido del clon 65 de ratón que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 261 de figuras 1A y 1B (SEC ID No. 6), o el complemento del mismo.

ES 2 316 173 T3

En aún otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende ADN que tiene por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos una identidad en la secuencia del 70% con el ADNc del polipéptido del clon 65 humano en el Depósito ATCC No. 209536 (pRK5E.h.WIG-3.65.4A) o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). Preferiblemente, este ácido nucleico comprende ADN que tiene por lo menos aproximadamente una
5 identidad en la secuencia del 95% con el ADNc del polipéptido del clon 65 humano en el Depósito ATCC No. 209536 (pRK5E.h.WIG-3.65.4A) o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Un aspecto adicional de la presente invención implica un proceso para producir un polipéptido del clon 65 que comprende el cultivo de la una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el clon 65 bajo condicio-
10 nes adecuadas para la expresión del polipéptido del clon 65 y la recuperación del polipéptido del clon 65 del cultivo celular.

Se proporciona además un polipéptido del clon 65 aislado codificado por el ácido nucleico que codifica el clon 65. Preferiblemente, este polipéptido es clon 65 humano o clon 65 de ratón.
15

En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que tiene por lo menos 800 nucleótidos que se hibrida bajo condiciones astringentes con (a) la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1 o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a), y tiene por lo menos aproximadamente una identidad en la secuencia del 70% con (a) o (b).
20

También se proporciona un polipéptido codificado por un ácido nucleico que tiene por lo menos 800 nucleótidos que se hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1 y tiene por lo menos una identidad en la secuencia del 70% con la misma.
25

Preferiblemente, los complementos de las moléculas de ADN de la presente invención permanecen unidos de manera estable a la secuencia primaria bajo condiciones astringentes por lo menos moderadas, y opcionalmente, en condiciones astringentes elevadas.

También se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos anteriores, células huésped que comprenden al vector, preferiblemente donde la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de *E. coli*, una célula infectada por baculovirus, o una célula de levadura.
30

Adicionalmente, se proporciona una molécula quimérica que comprende uno de los polipéptidos anteriores o una variante inactivada de los mismos, fusionados a una secuencia de aminoácidos heteróloga, donde la secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser, por ejemplo, una secuencia etiqueta epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina. También se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a uno de los polipéptidos anteriores, donde el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.
35

Se proporciona además una composición que comprende uno de los polipéptidos anteriores y un portador para el mismo, y una composición que comprende un antagonista a uno de los polipéptidos y un portador para el mismo, donde el antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del clon 65. Preferiblemente, estas composiciones pueden comprender también un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento.
40

También se contempla un procedimiento para tratar un trastorno relacionado con el clon 65 en un mamífero que comprende la administración del mamífero de una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones anteriores. Preferiblemente, el trastorno es un trastorno maligno o arteriosclerosis. Más preferiblemente, el trastorno maligno es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o melanoma.
45

También se contempla en la presente invención un equipo que comprende uno de los polipéptidos del clon 65 anteriores o antagonistas del clon 65, tales como anticuerpos anti-clon 65, e instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar un cáncer inducido por Wnt.
50

También se contempla un procedimiento para inducir la muerte celular que comprende exponer una célula que está inducida por Wnt a una cantidad eficaz de uno de los polipéptidos del clon 65 anteriores o antagonistas del clon 65, tales como anticuerpos anti-clon 65. Preferiblemente, dicha célula es una célula de cáncer. Más preferiblemente, la célula se encuentra en un mamífero, más preferiblemente un humano. Opcionalmente, también se expone a la célula una cantidad eficaz de otro anticuerpo quimioterapéutico, tal como un anticuerpo anti-ErbB2. Además, opcionalmente el procedimiento comprende la exposición de la célula a un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o radiación. Opcionalmente, la célula se expone al agente inhibidor del crecimiento antes de la exposición al anticuerpo anti-clon 65.
55
60

La solicitud también describe un artículo de fabricación, que comprende:

65 un recipiente;

una etiqueta en el recipiente; y

ES 2 316 173 T3

una composición que comprende un agente activo contenido en el recipiente; donde la composición es eficaz para inducir la muerte celular, la etiqueta en el recipiente indica que la composición se puede utilizar para tratar estados patológicos caracterizados por la sobreinducción de Wnt, y el agente activo en la composición es uno de los polipéptidos indicados anteriormente, o un antagonista a uno de los polipéptidos, tales como un anticuerpo.

5

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran la secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de clon 65 de secuencia nativa de ratón de los aminoácidos 1 a 261 (SEC ID NO. 6) y la secuencia de nucleótidos (y secuencia complementaria) que codifica la proteína (SEC ID Nos. 4 y 5, respectivamente). Ésta es del clon 65.11.3 de ratón. Se fusionó una secuencia de histidina al antígeno estable térmicamente. Se ha eliminado la secuencia de antígeno estable térmicamente. Hay 465 pb de la región 3' no traducida y 86 pb de la región codificante. Las primeras 139 pb de la secuencia tiene un 89% en el contenido de GC. Esta es la región añadida comparada con los miembros de otra familia. Un sitio potencial de glicosilación se encuentra en el aminoácido 88 al 91. Un sitio potencial de fosforilación de la proteína quinasa C se encuentra en los aminoácidos 210 al 212. Los sitios potenciales de fosforilación de caseína quinasa II se encuentran en los aminoácidos 84 a 87, 122 a 125, 164 a 167 y 202 a 205. Los sitios potenciales de N-miristoilación se encuentran en los aminoácidos 29 a 34, 37 a 42, 46 a 51, y 225 a 240. Un sitio potencial de unión al grupo prenilo se encuentra en el aminoácido de 258 a 261. Un potencial motivo A (bucle P) del sitio de unión a ATP/GTP se encuentra en los aminoácidos 59 a 66.

20

La figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID No. 7) contenida en el ADNc del polipéptido del clon 320 humano en el depósito de ATCC no. 209534.

La figura 3 muestra otra secuencia de nucleótidos (SEC ID No. 8) contenida en el ADNc del polipéptido del clon 320 humano en el depósito de ATCC no. 209534.

25

Las figuras 4A y 4B muestran otra secuencia de nucleótidos (y el complemento de la misma) (SEC ID Nos. 9 y 10, respectivamente) contenida en el ADNc del polipéptido del clon 320 humano en el depósito de ATCC no. 209534.

Las figuras 5A y 5B muestran la secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de clon 65 de secuencia nativa humana de los aminoácidos 1 a 258 (SEC ID NO. 3) y la secuencia de nucleótidos de consenso (y secuencia complementaria) que codifica la proteína (SEC ID Nos. 1 y 2, respectivamente), que deriva de tres clones humanos de una biblioteca de hígado fetal humano. Hay 2955 pb de la región 3' no traducida y 777 pb de la región codificante en la secuencia. Los sitios potenciales de glicosilación son desde los aminoácidos 85 a 88, aminoácidos 138 a 141 y aminoácidos 245 a 248. Los sitios potenciales de fosforilación de la proteína quinasa C se encuentra en los aminoácidos 140 al 142 y 207 a 209. Los sitios potenciales de fosforilación de caseína quinasa II se encuentran en los aminoácidos 81 a 84, 119 a 122, 161 a 164 y 199 a 205. Los sitios potenciales de N-miristoilación se encuentran en los aminoácidos 26 a 31, 43 a 48, y 222 a 227. Un potencial motivo A (bucle P) del sitio de unión a ATP/GTP se encuentra en los aminoácidos 56 a 63.

30

La figura 6 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de longitud completa del clon 65 humano y de ratón (SEC ID Nos. 3 y 6, respectivamente).

La figura 7 muestra un mapa del vector pBabe puro (5,1 kb) utilizado para transformar células con fines de expresión diferencial. El vector incluye sitios de restricción únicos y sitios de restricción múltiples. Aquí se muestra en forma modificada para la clonación de Wnt-1, donde el sitio *HindIII* después del promotor de SV40 en el vector pBabe puro original ha sido eliminado y se ha añadido un sitio *HindIII* al sitio de clonación múltiple del vector pBabe puro original. Wnt-1 se clona a partir de *EcoRI-HindIII* en el sitio de clonación múltiple. Las construcciones derivadas de este vector se seleccionan en ampicilina (100 µg/ml) y las células infectadas en cultivo se seleccionan en 1,0-2,5 µg/ml de puromicina.

40

La figura 8 muestra las secuencias del cebador de síntesis de ADNc PCR-Select® (SEC ID No. 20), adaptadores 1 y 2 (SEC ID Nos. 21 y 22, respectivamente) y secuencias complementarias para los adaptadores (SEC ID Nos. 23 y 24, respectivamente), cebador de PCR 1 (SEC ID No. 25), cebador de PCR 2 (SEC ID No. 26), cebador de PCR 1 anidado (SEC ID No. 27), cebador de PCR 2 anidado (SEC ID No. 28), cebador 5' de G3PDH del cebador de control (SEC ID No. 29) y cebador 3' de G3PDH del cebador de control (SEC ID No. 30) utilizados para la hibridación sustractiva de supresión para identificar los clones 65 y 320. Cuando los adaptadores se unen a ADNc digerido por *RsaI*, se reestablece el sitio *RsaI*.

La figura 9 muestra la región del sitio de clonación del plásmido pGEM-T utilizada para clonar todas las secuencias de los clones 65 y 320 de la presente invención (SEC ID Nos. 3 y 32 para las secuencias 5' y 3', respectivamente).

La figura 10 muestra la secuencia (SEC ID No. 12) de un clon 65.11 obtenido mediante el cribado (*screening*) con una sonda derivada del clon 65, que es el clon inicial aislado en el proceso para obtener ADN del clon 65 de longitud completa de ratón.

65

La figura 11 muestra la secuencia (SEC ID No. 13) de un clon 65.9 obtenido mediante cribado con una sonda derivada del clon 65.

ES 2 316 173 T3

La figura 12 muestra la secuencia (SEC ID No. 14) de un clon 65.11.1 obtenido mediante cribado con una sonda derivada de la región homóloga CDC-42 del clon 65.11.

5 La figura 13A y 13B muestran la secuencia (SEC ID No. 15) de un clon 65.11.3 obtenido mediante cribado con una sonda derivada de la región homóloga CDC-42 del clon 65.11.

La figura 14 muestra la secuencia (SEC ID No. 16) de un clon 65.11.6 obtenido mediante cribado con una sonda derivada de la región homóloga CDC-42 del clon 65.11.

10 La figura 15 muestra la secuencia (SEC ID No. 17) de un clon 65.1 obtenido mediante cribado con una sonda derivada del clon 65.

15 La figura 16 muestra la secuencia (SEC ID No. 18) de un clon 65.6 obtenido mediante cribado con una sonda derivada del clon 65.

La figura 17 muestra la secuencia (SEC ID No. 19) de un clon 65.13 obtenido mediante cribado con una sonda derivada del clon 65.

20 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

25 Los términos “polipéptido del clon 65”, “homólogo de clon 65” y variantes gramaticales de los mismos, tal como se utilizan en la presente invención, comprenden la proteína de la secuencia nativa derivada del clon 65 y variantes de la misma (que se definen con detalle posteriormente). El polipéptido del clon 65 se puede aislar de una variedad de fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o se puede preparar mediante procedimientos recombinantes o sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas técnicas y técnicas similares.

30 Un “polipéptido del clon 65 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido del clon 65 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos del clon 65 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido del clon 65 de secuencia nativa” comprende específicamente formas truncadas naturales u otras formas de un polipéptido del clon 65 descrito en la presente invención, formas variantes naturales (por ejemplo, formas “spliced” de manera alternativa o variantes de “splice” (“corte y empalme”)), y variantes alélicas naturales de un polipéptido del clon 65. En una realización de la presente invención, el polipéptido del clon 65 de secuencia nativa es un polipéptido del clon 65 de secuencia nativa de longitud completa humano que comprende los aminoácidos 1 a 258 de las figuras 5A y 5B (SEC ID No. 3), con o sin la metionina N-terminal. En otra realización de la presente invención, el polipéptido del clon 65 de secuencia nativa es un polipéptido del clon 65 de secuencia nativa de longitud completa de ratón que comprende los aminoácidos 1 a 261 de las figuras 1A y 1B (SEC ID No. 6), con o sin la metionina N-terminal.

40 En otra realización de la presente invención, el polipéptido del clon 65 de secuencia nativa es el que está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende uno de los “splice” del clon 65 de ratón u otras variantes de secuencia nativa, que incluyen las SEC ID Nos. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19, con o sin una metionina N-terminal.

45 El término “variante del clon 65” significa un polipéptido del clon 65 activo tal como se define a continuación, que tiene por lo menos aproximadamente un 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el clon 65 humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en las figuras 5A y 5B (SEC ID No. 3) y/o con el clon 65 de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en las figuras 1A y 1B (SEC ID No. 6). Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos del clon 65 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden a, o eliminan de, el extremo N- o C-terminal de las secuencias de longitud completa de las figuras 5A-B y 1A-B (SEC ID Nos. 3 y 6, respectivamente), incluyendo variantes de otras especies, pero se excluye un polipéptido del clon 65 de secuencia nativa.

55 El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del clon 65 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en una secuencia del polipéptido del clon 65, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

65 El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a la región codificante de las secuencias del clon 65 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la región codificante de la secuencia del clon 65 de

interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTART™). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

“Condiciones astringentes” son aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%; o (4) utilizan un tampón de sulfato de dextrano al 10%, 2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones moderadamente astringentes” se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

El término “aislado” cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido del clon 65 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido del clon 65 es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico respectivo. Una molécula de ácido nucleico que codifica el clon 65 aislada es diferente de la forma o entorno en que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico que codifica el clon 65 aislada se distingue de la molécula de ácido nucleico que codifica el clon 65 tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el clon 65 aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el ADN que codifica el clon 65, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-clon 65 individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), y anticuerpos anti-clon 65, y composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica. El término “anticuerpo monoclonal”,

ES 2 316 173 T3

tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

5 “Activo” o “actividad” o “actividad biológica”, para los objetivos de la presente invención, describen la actividad de una forma o formas de un polipéptido del clon 65, incluyendo sus variantes, o sus antagonistas, que mantienen las actividades biológicas y/o inmunológicas de un polipéptido del clon 65 nativo o natural (secuencia nativa) o su antag-
10 nista. Las actividades “preferidas” para un polipéptido del clon 65 o su antagonista incluyen la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales o estimular la proliferación de células normales y tratar la arteriosclerosis, incluyendo la aterosclerosis, así como inducir la reparación de heridas y la hematopoyesis, prevenir la desmoplasia, prevenir
15 lesiones fibróticas asociadas con trastornos de la piel, tales como escleroderma, queloides, fascites eosinofílica, fascites nodular, y contractura de Dupuytren, tratar enfermedades relacionadas con los huesos, tales como osteoporosis, regular el anabolismo, incluyendo la inducción del crecimiento, tratar trastornos inmunitarios, tratar el tumor de Wilms y trastornos relacionados con los riñones, tratar trastornos relacionados con los testículos, tratar trastornos relacionados con los pulmones y tratar trastornos cardíacos.

Un “antagonista” de un polipéptido del clon 65 es una molécula que inhibe una actividad de un polipéptido del clon 65. Los antagonistas preferidos son aquellos que interfieren con o bloquean una actividad biológica indeseable de un polipéptido del clon 65, tales como cuando un polipéptido del clon 65 puede actuar para estimular las células
20 cancerígenas y el antagonista serviría para inhibir el crecimiento de estas células. Dichas moléculas incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que tienen dicha capacidad inhibitoria, así como variantes de polipéptido de, y receptores para, un polipéptido del clon 65 (si está disponible) o partes del mismo que se unen al polipéptido del clon 65. De este modo, el receptor puede ser clonado en la expresión a partir de la familia; a continuación se produce una forma soluble del receptor mediante la identificación del dominio extracelular y la escisión del dominio transmembrana del
25 mismo. La forma soluble del receptor se puede utilizar entonces como antagonista, o el receptor se puede utilizar para cribar moléculas pequeñas que antagonizarían la actividad del polipéptido del clon 65.

Alternativamente, utilizando las secuencias de nucleótidos murinos mostradas en las figuras 1-4 (SEC ID Nos. 4, 7, 8 ó 9, respectivamente), o la secuencia de aminoácidos murino mostrada en la figura 1 (SEC ID No. 6) o las
30 secuencias de nucleótidos y aminoácidos humanas mostradas en las figuras 5A-5B (SEC ID Nos. 1 y 3), se consigue que las variantes del clon 65 nativo actúen como antagonistas.

La actividad antagonista se puede determinar mediante varios medios, incluyendo ensayos estándar para la inducción de la muerte celular, tales como las descritas en la presente invención, por ejemplo, ensayos de proliferación de
35 ³H-timidina, u otros ensayos mitogénicos, tales como un ensayo que mide la capacidad del antagonista candidato de inducir el crecimiento independiente de anclaje potenciado por EGF de líneas celulares diana (Volckaert *et al.*, Gene, 15: 215-223 (1981)) y/o la inhibición del crecimiento de líneas de células neoplásicas. Roberts *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 119-123 (1985). El crecimiento independientemente del anclaje se refiere a la capacidad de células diana no neoplásicas tratadas con polipéptido del clon 65 o tratadas con el polipéptido del clon 320 o tratadas con TGF- β y
40 tratadas con EGF, de formar colonias en agar suave, una característica atribuida a la transformación de las células. En este ensayo, el candidato se incubaba junto con una cantidad equimolar de un polipéptido del clon 65 detectable en el ensayo de crecimiento de células diana independiente del anclaje potenciado por EGF, y el se observa que el cultivo no consigue inducir el crecimiento independiente del anclaje.

45 “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los individuos que necesitan un tratamiento incluyen individuos que ya padecen el trastorno o la enfermedad, así como individuos en los cuales el trastorno o la enfermedad deben prevenirse.

50 “Mamífero”, para los objetivos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, animales para deporte o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

Un “trastorno relacionado con el clon 65” es cualquier enfermedad que se beneficiaría del tratamiento de los polipéptidos del clon 65 o los antagonistas del clon 65 de la presente invención. Esto incluye trastornos crónicos y agudos, así como aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes
55 de trastornos a tratar en la presente invención incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y tumores linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofagales, epiteliales, estromales y blastocoélicos; trastornos relacionados con la hematopoyesis; trastornos del crecimiento del tejido; trastornos de la piel; desmoplasia, lesiones fibróticas; trastornos de riñón; trastornos relacionados con los huesos; traumas, tales como quemaduras, incisiones, y otras heridas; estados catabólicos; trastornos relacionados con los testículos; y
60 trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo arteriosclerosis. Un “trastorno relacionado con Wnt” es el causado por lo menos por la regulación por incremento del mecanismo del gen Wnt, incluyendo Wnt-1 y Wnt-4, pero preferiblemente Wnt-1, y puede incluir cáncer.

65 Los términos “cáncer”, “canceroso” y “maligno” se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Algunos ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células

pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el linfoma de Hodgkin y el linfoma de no Hodgkin, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, tal como carcinoma hepático y hematoma, el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorectal, el carcinoma endometrial, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, tal como el carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer tiroideo, el cáncer testicular, el cáncer de esófago, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres preferidos para el tratamiento de la presente invención son mama, colon, pulmón y melanoma.

El término “agente citotóxico”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radioactivos (por ejemplo I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxol, toxotero, metotrexato, cisplatino, melfalano, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de Estados Unidos No. 4.675.187), melfalano y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores, como por ejemplo tamoxifeno y onapristona.

Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, tal como una célula cancerígena que sobreexpresa Wnt-1, bien *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de las células malignas en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II, tales como doxorubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G I que también se extienden sobre la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes y antineoplastic drugs” por Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13. El anticuerpo 4D5 (y equivalentes funcionales del mismo) también se pueden utilizar para este objetivo si el cáncer implica células cancerosas que sobreexpresan ErbB2. Véase, por ejemplo, WO 92/22653.

“Análisis Northern” o “transferencia Northern” es un método utilizado para identificar secuencias de ARN que se hibridan con una sonda conocida, tal como un oligonucleótido, fragmento de ADN, ADNc o fragmento del mismo, o fragmento de ARN. La sonda se marca con un radioisótopo, tal como ^{32}P , o mediante biotilación, o con una enzima. El ARN a analizar normalmente se separa electroforéticamente en un gel de agarosa o poliacrilamida, se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, nylon u otra membrana adecuada y se hibrida con la sonda, utilizando técnicas estándar conocidas en el sector, tales como las descritas en las secciones 7.39-7.52 de Sambrook *et al.*, *supra*.

La técnica de “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un procedimiento en el que cantidades muy pequeñas de una pieza específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.683.195 concedida el 28 de julio de 1987. En general, la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá necesita estar disponible, de manera que se pueden diseñar cebadores oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en la secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla a amplificar. Los nucleótidos del extremo 5' terminal de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede utilizar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de AND genómico total, y ADNc transcrito de ARN celular total, bacteriófago o secuencias de plásmido, etc. Véase, en general, Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed, PCR Technology (Stockton Press; NY, 1989). Tal como se utiliza en la presente invención, la PCR se considera que es un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de la ácido nucleico polimerasa para la amplificación de una muestra de prueba de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y un ácido nucleico polimerasa para amplificar o generar una pieza específica de ácido nucleico.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptido del clon 65 de longitud completa

La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican un polipéptido al que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptido del clon 65. En particular, se han identificado y aislados ADNc que codifican nuevos polipéptidos del clon 65 murino y humano, tal como se describe en detalle en los Ejemplos siguientes.

ES 2 316 173 T3

Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA, se observó que las secuencias codificantes de clon 65 de ratón y humano, así como las tres secuencias para el clon 320 del ratón descritas en la presente invención, muestran una homología significativa con las secuencias de ADN descritas en la base de datos Gen Bank, incluyendo las publicadas por Adams *et al.*, Nature 377-174 (1995).

Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA, se observó que el clon 65 de ratón y humano muestra una homología significativa con miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas (clon 65 de ratón y humano con un 58-59% y 59% homólogos, respectivamente, con la proteína de unión a G25k gtp humana, isoformas de placenta y cerebro, y un 59% homólogo con la proteína de unión a CDC42 GTP canina). Por consiguiente, se cree que los polipéptidos del clon 65 descritos en la presente solicitud poseen actividad que se relaciona con el tratamiento de varios cánceres con los que está asociado Ras, así como con la arteriosclerosis, tal como aterosclerosis.

B. Variantes del polipéptido del clon 65

Además de los polipéptidos del clon 65 de secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de estas secuencias. Las variantes del clon 65 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica el clon 65 o mediante síntesis de los polipéptidos del clon 65 de la variante deseada. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácido pueden alterar los procesos post-traducción de los polipéptido del clon 65, tales como la modificación del número o posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana, si el polipéptido del clon 65 activo está unido a membrana.

Pueden realizarse variaciones en las secuencias del clon 65 secuencia nativa de longitud completa o en diferentes dominios de los polipéptidos del clon 65 descritos en la presente invención, por ejemplo utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para llevar a cabo mutaciones conservativas y no conservativas descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido del clon 65 que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el polipéptido del clon 65 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en cualquier parte del polipéptido del clon 65. La guía para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o eliminarse sin afectar de forma adversa la actividad deseada, puede obtenerse comparando la secuencia del polipéptido del clon 65 con la de las moléculas de proteína homólogas Rac o Rho conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y evaluando las variantes resultantes en cuanto a la actividad en ensayos *in vitro* para la regulación por incremento o descenso de genes y en animales transgénicos o knock-out.

Las variaciones pueden realizarse en el ADN clonado para producir un ADN variante usando métodos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio) (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), la mutagénesis de casete [Wells *et al.*, Gene, 34: 315(1985)], el rastreo de alanina, la mutagénesis por PCR, la mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) u otras técnicas conocidas.

El análisis de rastreo de aminoácidos puede emplearse también para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos preferidos para el rastreo están los aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido en este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal en la variante. También se prefiere habitualmente la alanina porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como en las expuestas Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, (W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976). Si la sustitución por alanina no rinde suficiente cantidad de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

Además, las variantes de eliminación de los polipéptidos del clon 65 de longitud completa incluyen variantes de las que se ha eliminado el péptido señal N-terminal, si existe, y/o la metionina de iniciación.

C. Modificaciones de los Polipéptidos del clon 65

Dentro del ámbito de esta invención se incluyen modificaciones covalentes de los polipéptidos del clon 65. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido del clon 65 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular un polipéptido del clon 65 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-clon 65, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen,

por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Creighton, *supra*, páginas 79-86), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido del clon 65 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en la secuencia nativa (ya sea mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de los grupos de glicosilación mediante medios químicos y/o enzimáticos) y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos si está presente la glicosilación de las proteínas nativas que implican un cambio en la naturaleza y la proporción de los diversos residuos de azúcar.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido del clon 65 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido del clon 65 ó 320 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación mutaciones en el ADN se pueden realizar utilizando métodos descritos anteriormente.

Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido del clon 65 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas 259-306 (1981).

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido del clon 65 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et. al. Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, *et al. Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al. Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente comprende la unión del polipéptido del clon 65 a uno de un conjunto de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

El polipéptido del clon 65 de la presente invención también se puede modificar de manera que forme una molécula química que comprenda un polipéptido del clon 65, o un fragmento del mismo, fusionado a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. En una realización, dicha molécula química comprende una fusión del polipéptido del clon 65 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo de una molécula del clon 65 nativa o variante. La presencia de dichas formas de epítipo etiquetadas se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el polipéptido del clon 65 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En una realización alternativa, la molécula química puede comprender una fusión del polipéptido del clon 65, o fragmentos del mismo, con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula química, dicha fusión podría ser la región Fc de una Ig, tal como una molécula IgG.

En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo. Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990). Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido-etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

D. Preparación de polipéptidos del clon 65

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos del clon 65 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene por lo menos ADN que codifica las secuencias de maduras o de longitud completa del clon 65 humano o de ratón (SEC ID Nos. 3 ó 6, respectivamente).

Naturalmente, se contempla que para preparar polipéptidos del clon 65 se puedan utilizar procedimientos alternativos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido del clon 65, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewan *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del polipéptido del clon 65 de forma separada y se pueden combinar utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir un polipéptido del clon 65 de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica los polipéptidos del clon 65

El ADN que codifica un polipéptido del clon 65 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del polipéptido del clon 65 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN que codifica el polipéptido del clon 65 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como una biblioteca de hígado fetal o, en cualquier caso, tal como se describe en los Ejemplos. Los genes que codifican polipéptidos del clon 65 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

Un método adicional alternativo de clonación del polipéptido del clon 65 es la hibridación supresiva sustractiva, que es un método para generar sondas y bibliotecas de ADNc reguladas de manera diferencial o específicas de tejido. Esto se describe, por ejemplo, en Diatchenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 6025-6030 (1996). El procedimiento se basa principalmente en una técnica denominada PCR de supresión y combina la normalización y sustracción en un procedimiento único. La etapa de normalización iguala la abundancia de ADNcs en la población diana y la etapa de sustracción excluye las secuencias comunes entre las poblaciones diana y conductoras.

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para un polipéptido del clon 65 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por la misma. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*. Un medio alternativo para aislar el gen que codifica un polipéptido del clon 65 es utilizar la metodología de PCR. Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad en la secuencia (a nivel de aminoácidos o nucleótidos) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar mediante la alineación de secuencias utilizando programas de software informático, tales como ALIGN, DNASTAR e INHERIT que utilizan varios algoritmos para medir la homología.

El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc o las bibliotecas genómicas seleccionadas utilizando las secuencias de aminoácidos deducidas descritas en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que puede que no se hayan transcrito de forma inversa en el ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de polipéptido del clon 65 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden

seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

5 Los procedimientos de transfección son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaPO₄ y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento de calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariontas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe en Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown *et al.*, *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, *Nature*, 336. 348-352 (1988).

20 Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariontas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariontas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinantes. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariontas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el polipéptido del clon 65 ó 320. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Sin embargo, están habitualmente disponibles y son útiles en la presente invención un conjunto de otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al.* *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic. Microbiol.* 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilbum *et al.*, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]. Las levaduras metilotróficas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionado del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptido del clon 65 glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, (Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59

(1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que está dentro de la técnica.

5

3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el polipéptido del clon 65 deseado se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

El polipéptido del clon 65 deseado se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal, si el polipéptido del clon 65 es apto para ser secretado, u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro o de longitud completa. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido del clon 65 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionta tal como, por ejemplo, secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxinaII estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* líderes, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes virales secretoras, e incluyendo señales del polipéptido del clon 65.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos.

Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el polipéptido del clon 65, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo natural es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, que se prepara y propaga tal y como se describe por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7. Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977).

Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del clon 65 para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariontas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotores de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido del clon 65.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glucolíticos [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tal como enolasa,

ES 2 316 173 T3

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

5 Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen en detalle en EP 73.657.

10 La transcripción del clon 65 de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (Patente del Reino Unido 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40); de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

15 Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido del clon 65 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias de potenciador se conocen actualmente de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la cara tardía del origen de replicación, y 25 potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido del clon 65, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

30 Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido del clon 65.

35 En Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de polipéptidos del clon 65 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

40 4. Detección de la amplificación/expresión de los genes

La amplificación génica y/o la expresión se pueden medir directamente en una muestra, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional o transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada de forma adecuada, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluidas cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN y cadenas dobles híbridas de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden estar marcados y el ensayo se puede llevar a cabo donde la cadena doble esté unida 50 a una superficie, de manera que una vez se ha formado la cadena doble en la superficie, puede detectarse la presencia del anticuerpo unido a la cadena doble.

Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción 55 inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido del clon 65 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN que codifica el polipéptido del clon 65 y que codifica un epítopo de anticuerpo específico.

60 5. Purificación del polipéptido

Las formas del polipéptido del clon 65 pueden ser recuperadas del medio de cultivo o de los lisados de las células huésped. Si están unidas a membrana, se pueden liberar de la membrana mediante una solución de detergente adecuada 65 (por ejemplo, Tritón-X 100) o por división enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido del clon 65 se pueden romper a través de diversos mecanismos físicos o químicos, tales como ciclos de congelación y descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes que lisan las células.

ES 2 316 173 T3

Se puede desear purificar el polipéptido del clon 65 a partir de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex™ G-75; columnas de proteína A Sepharose™ para eliminar contaminantes, tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unirse a las formas epítipo-etiqueta del polipéptido del clon 65. Se pueden usar diversos métodos de purificación de proteínas, y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, (Springer-Verlag, New York 1982).

En un ejemplo específico de purificación, una etiqueta poli-His o una parte Fc de IgG humana se añaden a la región codificante C-terminal del ADNc para el clon 65 antes de la expresión. El medio acondicionado de las células transfectadas se recoge mediante centrifugación para eliminar las células y se filtran. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, la proteína se puede purificar utilizando una columna de Ni-NTA. Después de cargarse, la columna se puede lavar con tampón de equilibrio adicional y la proteína eluida con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se puede entonces, si se desea, desalar en un tampón de almacenamiento.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) de los polipéptidos del clon 65 se pueden purificar del medio acondicionado mediante el bombeo en una columna de Proteína A de 5 ml que se había equilibrado en tampón fosfato. Después de cargarse, la columna se puede lavar de manera extensa con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico. La proteína eluida se puede neutralizar inmediatamente mediante la recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen tampón TRIS. La proteína altamente purificada se puede posteriormente desalar en tampón de almacenamiento tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-HIS. La homogeneidad de la proteína se puede evaluar mediante SDS-geles de poliacrilamida y mediante la secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante degradación de Edman.

La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el polipéptido del clon 65 concreto producido.

E. Usos de los polipéptidos del clon 65 y su ácido nucleico

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican los polipéptidos del clon 65 tiene varias aplicaciones en la disciplina de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico que codifica el polipéptido del clon 65 también será útil para la preparación de polipéptido del clon 65 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos de longitud completa para el clon 65 de ratón o humano (SEC ID Nos. 4 y 1, respectivamente), o partes de las mismas, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar o detectar el gen de longitud completa que codifica el polipéptido del clon 65 de interés o para aislar o detectar incluso otros genes (por ejemplo, aquéllos que codifican variantes naturales del polipéptido del clon 65, otros miembros de la familia del polipéptido del clon 65 o polipéptidos del clon 65 de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con las secuencias del polipéptido del clon 65 descritas en las figuras 1 y 5 (SEC ID Nos. 6 y 3, respectivamente). Por ejemplo, se pueden utilizar procedimientos tales como la hibridación *in situ*, la transferencia Northern y Southern, y el análisis PCR para determinar si el ADN y/o el ARN que codifican un polipéptido del clon 65 diferente están presente en el tipo o tipos de células que se evalúan. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Por ejemplo, las sondas de hibridación pueden derivar de ESTs, secuencias clonadas o secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores, e intrones de ADN que codifica una secuencia nativa del polipéptido del clon 65.

A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen del clon 65 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como ³²P o ³⁵S, o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de los sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la de cualquiera de los genes que codifican el polipéptido del clon 65 de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un conjunto de secuencias para la identificación de secuencias del clon 65 estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido del clon 65 también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el polipéptido del clon 65 particular y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden mapear a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado de hibridación con bibliotecas.

ES 2 316 173 T3

El ácido nucleico que codifica un polipéptido del clon 65 se puede utilizar como diagnóstico para determinar el grado y velocidad de expresión del ADN que codifica un polipéptido del clon 65 en las células de un paciente. Para realizar este ensayo, se trata una muestra de células de un paciente, a través de la hibridación *in situ*, o mediante otro medio adecuado, y se analiza para determinar si la muestra contiene moléculas de ARNm capaces de hibridarse con la molécula de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido del clon 65 o cualquiera de sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales “knock out” que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en estado prenatal, por ejemplo, una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido del clon 65 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido del clon 65 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas se utilizan para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el ADN que codifica el polipéptido del clon 65.

Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 4.870.009 y WO 97/38086. Habitualmente, se marcarían células concretas para la incorporación al transgén del clon 65 con potenciadores específicos de tejido. Se pueden utilizar animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica el polipéptido del clon 65 introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica el polipéptido del clon 65. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, el tratamiento de un animal con el reactivo y la reducción de la incidencia de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica en la condición patológica.

Alternativamente, se pueden utilizar homólogos no humanos de polipéptidos del clon 65 para construir un animal “knock out” con polipéptidos del clon 65 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido del clon 65 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido del clon 65 y el ADN genómico alterado que codifica el polipéptido del clon 65 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica el polipéptido del clon 65 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido del clon 65 según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica el polipéptido del clon 65 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3'). Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992). A continuación, se inyectan las células seleccionadas en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación. Véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152. A continuación, se puede implantar un embrión quimérico en un animal criado hembra pseudoembarazada adecuado y el embrión se hace nacer para crear un animal “knock out”. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizar para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido del clon 65.

En particular, los ensayos en los que los miembros de las familias de Rac y Rho se utilizan normalmente se realizan preferiblemente con el polipéptido del clon 65. Además, un ensayo para determinar si TGF- β induce el polipéptido del clon 65, que indica un papel en el cáncer, se puede realizar tal como se conoce en la técnica, así como ensayos que implican la inducción de la muerte celular y ensayos de proliferación de ³H-timidina. También se realizan ensayos mitogénicos y de crecimiento de tejido con el polipéptido del clon 65 tal como se ha indicado anteriormente. Los resultados se aplican consecuentemente.

Los polipéptidos del clon 65 de la presente invención también se puede utilizar para inducir la formación de anticuerpos anti-polipéptido del clon 65, los cuales se identifican mediante cribado de rutina tal como se indica en detalle a continuación.

Para fines de diagnóstico, el polipéptido del clon 65 se puede utilizar según la tecnología de inmunoensayo. Algunos ejemplos de inmunoensayos son proporcionados por Wide en las páginas 199-206 de *Radioimmune Assay Method*, Kirkham y Huner, ed., E&S. Livingstone, Edinburgo, 1970.

De este modo, en una realización, los polipéptidos del clon 65 se pueden marcar de manera detectable e incubar con una muestra de prueba que contiene las moléculas de interés (tal como fluidos biológicos, por ejemplo, suero, esputo, orina, etc.) y establecer la cantidad de molécula de clon 65 unida a la muestra.

ES 2 316 173 T3

La inmovilización de reactivos es necesaria para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización conlleva la separación del polipéptido del clon 65 de cualquier analito que permanezca libre en la solución. Esto se realiza de manera convencional insolubilizando el polipéptido del clon 65 antes del procedimiento de ensayo, mediante adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al.*, U.S. 3.720.760), mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehído) o mediante insolubilización de la molécula posteriormente, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

Lo indicado anteriormente son simplemente ensayos de diagnóstico de ejemplo. Otros métodos desarrollados ahora o posteriormente para la determinación de estos analitos se incluyen en el alcance de la presente invención.

Además, los polipéptidos del clon 65 son útiles para cribar compuestos que se unen a los mismos tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, estos compuestos son moléculas pequeñas, tales como moléculas orgánicas o péptidos que muestran una o más de las actividades deseadas. Los ensayos de cribado de este tipo son habituales en la técnica y se puede utilizar cualquiera de dichos procedimientos de cribado, mediante los cuales la muestra de prueba entra en contacto con el polipéptido del clon 65 de la presente invención y se determinan el grado de unión y la actividad biológica de la molécula unida.

Los polipéptidos del clon 65 son también útiles en la purificación por afinidad de una molécula que se une al polipéptido del clon 65 y en la purificación de anticuerpos del mismo. El polipéptido del clon 65 está acoplado habitualmente a una resina inmovilizada, tal como Affi-Gel 10TM (Bio-Rad, Richmond, CA) u otras de dichas resinas (matrices de soporte) mediante medios conocidos en la técnica. La resina se equilibra en un tampón (tal como uno que contiene 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7,4 complementado hasta contener un 20% de glicerol y un 0,5% de NP-40) y la preparación a purificar se coloca en contacto con la resina, mediante lo cual las moléculas se absorben selectivamente al polipéptido del clon 65 en la resina.

A continuación, la resina se lava secuencialmente con tampones adecuados para eliminar el material no adsorbido, incluyendo contaminantes no deseados, de la mezcla a purificar, utilizando, por ejemplo, 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo NP-40 al 5%; 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo 0,5 M de NaCl y NP-40 al 0,1%; 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo deoxicolato al 0,1%; 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, pH 7,4, conteniendo NP-40 al 0,1%; y una solución de NP-40 al 0,1%, glicerol al 20% y 50 mM de glicina, pH 3. A continuación, la resina se trata para eluir la molécula de unión utilizando un tampón que romperá el enlace entre la molécula de unión y el polipéptido del clon 65 (utilizando, por ejemplo, 50 mM de glicina, pH 3, NP-40 al 0,1%, glicerol al 20% y 100 mM de NaCl).

Se contempla que los polipéptidos del clon 65 de la presente invención se pueden utilizar para tratar varias condiciones patológicas, incluyendo aquellas caracterizadas por la sobreexpresión y/o activación de por lo menos el mecanismo de Wnt. Además, son útiles en el diagnóstico del cáncer, por ejemplo, como marcador para una mayor susceptibilidad para el cáncer o para tener cáncer. Entre las condiciones patológicas o trastornos de ejemplo a tratar con los polipéptidos del clon 65 se incluyen tumores benignos o malignos (por ejemplo, carcinomas renales, hígado, riñón, vejiga, testicular, mama, gástrico, ovaio, colorrectal, próstata, pancreático, pulmón, esófago, vulva, tiroides, hepático; sarcomas; glioblastomas; y varios tumores de cabeza y cuello); leucemias y tumores linfoides; otros trastornos, tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; trastornos cardíacos; trastornos renales; trastornos catabólicos; trastornos relacionados con los huesos, tales como osteoporosis; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, tales como arteriosclerosis.

Los polipéptidos del clon 65 de la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del polipéptido.

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido del clon 65 se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, argnina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Se pueden combinar otras pautas terapéuticas con la administración de los polipéptidos del clon 65 de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con los polipéptidos descritos en la presente invención también puede recibir terapia de radiación si el trastorno es el cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, se puede administrar un agente quimioterapéutico al paciente con cáncer. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o se determinan empíricamente por un técnico. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, Md, 1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del polipéptido o se puede administrar simultáneamente con el mismo. El polipéptido se puede combinar con un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno, o una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP 616812) en dosis conocidas para dichas moléculas.

Puede ser deseable también coadministrar con el polipéptido del clon 65 (o anticuerpos anti-polipéptido del clon 65), anticuerpos contra otros antígenos asociados con tumores, tales como anticuerpos que se unen a HER-2, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden co-administrar al paciente dos o más anticuerpos anti-cáncer diferentes, tales como anticuerpos anti-ErbB2 con el polipéptido del clon 65 (o anticuerpos anti-polipéptido del clon 65). Algunas veces, también puede ser beneficioso administrar una o más citoquinas al paciente.

En una realización preferida, el polipéptido del clon 65 se co-administra con un agente inhibidor del crecimiento al paciente con cáncer. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido del polipéptido del clon 65. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del polipéptido del clon 65 en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas utilizadas en la presente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido. Los anticuerpos, agentes citotóxicos, citoquinas, o agentes inhibidores del crecimiento están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

Los principios activos también se pueden introducir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización por interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Ed. (1980) *supra*.

Las formulaciones a utilizar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre algunos ejemplos de preparaciones de liberación controlada adecuadas se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (Patente U.S.A. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etilenoacetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización apropiada de aditivos, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad o el trastorno, la dosificación apropiada del polipéptido del clon 65 dependerá del tipo de trastorno a tratar, tal y como se han definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el polipéptido se administra con objetivos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al polipéptido; la ruta de administración, la condición del paciente y la discreción del médico de asistencia. El polipéptido se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 μ g/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido del clon 65 es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 μ g/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar supresión deseada de síntomas del trastorno. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

También se contempla un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la condición patológica y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el polipéptido del clon 65. El marcador en el recipiente o asociado con el mismo indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición patológica o trastorno de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

15 F. Anticuerpos anti-polipéptido del clon 65

La presente invención proporciona además anticuerpos anti-polipéptido del clon 65. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

20 1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido del clon 65 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes se pueden incluir el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

35 2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido del clon 65 o una proteína de fusión de la misma. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o se utilizan células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como PEG, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (Academia Press: Nuevo York 1986), páginas 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) páginas, 51-63.

65 A continuación, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido del clon 65. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima

ES 2 316 173 T3

(ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

5 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar. Goding, *supra*. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como ascites en un mamífero.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascites mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

15 Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células CHO o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. Dicho polipéptido de no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

30 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

35 Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

40 3. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la estructura de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o la estructura importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de DCR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77
 5 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991).

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por un polipéptido del clon 65; el otro es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes. Millstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH. WO 91/00360; WO 92/300373; EP 03089. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

45 G. Usos para anticuerpos anti-polipéptido del clon 65

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina SEPHADEXTM o papel de filtro, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el polipéptido del clon 65 (o un fragmento del mismo) a purificar y, a continuación, se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del polipéptido del clon 65 que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el polipéptido del clon 65 del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 también pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico para el polipéptido del clon 65, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos o suero específicos. De este modo, se pueden utilizar los anticuerpos en el diagnóstico de tumores humanos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.183.884).

Para las aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará habitualmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar preferiblemente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2. Coligen *et al.*, Ed., Wiley-Interscience. Nueva York, 1991), por ejemplo, y la radiactividad se puede medir utilizando recuento por centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores

fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo utilizando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, *supra.*, Coligen, ed., por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

(c) Están disponibles varios marcadores de enzima-sustrato y la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de éstos. La enzima preferiblemente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. De modo alternativo, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia están descritas anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado mediante una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrof-talazinedionas, malato deshidrogenada, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacarina oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, en Methods in Enzym., Vol. 73, Langone y Van Vunakis, eds. (Nueva York: Academic Press, 1981), páginas 147-166.

Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenil diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metillumbeliferil- β -D-galactosidasa).

Para los expertos en la materia, están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, el marcador está indirectamente conjugado con el anticuerpo. El técnico experto conocerá las diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, de este modo, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. De modo alternativo, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo anti-polipéptido del clon 65 no necesita estar marcado, y la presencia del mismo se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-polipéptido del clon 65.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, (Nueva York: CRC Press. Inc., 1987), páginas 147-158.

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad del polipéptido del clon 65 en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos preferiblemente se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar de manera adecuada del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos de sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insolubles. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado en sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser reciente o congelada o puede estar envuelta de parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Preferiblemente, el anticuerpo se marca con un radionucleido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S), de manera que el tumor se puede localizar utilizando inmunocentelleografía.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 pueden ser útiles como antagonistas de las funciones del polipéptido del clon 65, donde el polipéptido del clon 65 se regula por incremento en células cancerosas o estimula su proliferación o se regula por incremento en tejido aterosclerótico. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 pueden ser por sí mismos o con un agente quimioterapéutico u otro tratamiento para el cáncer o fármaco, tal como anticuerpo anti-HER2, eficaces en el tratamiento de ciertas formas de cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, y melanoma. Entre los usos adicionales para los anticuerpos se incluyen la inhibición de la unión de un polipéptido del clon 65 a su receptor, si es aplicable, o a una proteína que se une al polipéptido del clon 65, si es aplicable. Para el uso terapéutico, los anticuerpos se pueden utilizar en las formulaciones, pautas, rutas y dosis indicadas anteriormente en los usos para los polipéptidos del clon 65. Además, los anticuerpos anti-polipéptido del clon 65 se pueden administrar en la linfa, así como en el torrente sanguíneo.

Por conveniencia, el anticuerpo anti-polipéptido del clon 65 de la presente invención se puede disponer en formato de kit, es decir una combinación de reactivos envasados en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores necesarios por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que maximizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, normalmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivos que tiene la proporción adecuada.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

30 Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique lo contrario. El origen de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC pertenecen a la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia.

Ejemplo 1

40 *Aislamiento de clones de ADNc que codifican el clon 65 de ratón*

Se han identificado varios genes putativos que codifican los polipéptidos del clon 65 y 320 a nivel de ARNm en un experimento de sustracción de ARNc de PCR-Select de alto rendimiento llevado a cabo utilizando una línea celular de mamífero ratón (C57MG), que se ha transformado por un vector retroviral Wnt-1 y comparado con la línea celular parental. La familia de polipéptidos del clon 65 y 320 descritos en la presente invención, incluyendo el gen del clon 65, se indujo sólo en la línea celular transformada C57MGWnt-1.

1. *Hibridación de supresión sustractiva*

Se aisló independientemente el clon 65 de ratón mediante cribado diferencial de Wnt-1 utilizando hibridación de supresión sustractiva (SSH), tal y como está descrito por Diatchenko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 6025-6030 (1996). Se llevó a cabo la SSH utilizando el kit de sustracción de ADNc PCR-SELECT® (Clontech Laboratories, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se sintetizó ADNc de doble cadena (ds) conductor a partir de 2 microgramos de ARN poliA+ aislado de una línea celular mamaria de ratón (C57MG), disponible de una línea celular mioepitelial de cáncer de mama de ratón. Esta línea celular se describe en Brown *et al.*, Cell, 46: 1001-1009 (1986); Olson y Papkoff, Cell Growth and Differentiation, 5: 197-206 (1994); Wong *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14: 6278-6286 (1994); y Jue *et al.*, Mol. Cell. Biol., 12: 321-328 (1992), y es sensible a Wnt-1 pero no a Wnt-4. Se sintetizó ADNc ds prueba a partir de 2 microgramos de ARN poliA+ aislado a partir de una versión transformada de C57MG, llamada C57MG/wnt-1.

Se preparó la línea celular derivada mamaria de ratón C57MG/wnt-1 mediante la transformación en primer lugar de la línea parental con un vector retroviral de Wnt-1, pBabe Puro (5,1 kb). Este vector tiene un 5' LTR, elementos de empaquetamiento, un sitio de clonación múltiple, el gen de resistencia a puromicina alejada del promotor de SV40, un 3' LTR, y los elementos bacterianos para la replicación y la selección de ampicilina. Se modificó ligeramente el vector para la clonación de Wnt-1 mediante la eliminación del sitio *HindIII* tras el promotor de SV40 y la adición de un sitio *HindIII* en el sitio de clonación múltiple. Se clonó Wnt-1 a partir de *EcoRI-HindIII* en el sitio de clonación múltiple. La Figura 7 muestra un mapa del vector.

ES 2 316 173 T3

Se desarrollaron las células derivadas transformadas de un modo convencional, y se seleccionó la población celular final en DMEM + FCS al 10% con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina para estabilizar el vector de expresión. Se realizó la PCR utilizando el kit de Clontech, incluyendo el cebador de síntesis de ADNc (SEC ID N°: 20), adaptadores 1 y 2 (SEC ID Nos: 21 y 22, respectivamente) y secuencias complementarias para los adaptadores (SEC ID Nos: 23 y 24, respectivamente), cebador 1 de PCR (SEC ID No: 25), cebador 2 de PCR (SEC ID No: 26), cebador 1 de PCR anidado (SEC ID No: 27), cebador 2 de PCR anidado (SEC ID No: 28), cebador G3PDH5' de cebador de control (SEC ID No: 29), y cebador G3PDH3' de cebador de control (SEC ID No: 30), mostrado en la Figura 8.

Se insertaron productos generados a partir de la reacción de PCR secundaria en la región del sitio de clonación del vector pGEM-T (Promega), mostrado en la Figura 9 (SEC ID Nos: 31 y 32 para las secuencias 5' y 3', respectivamente). Se prepararon los ADNs de plásmido utilizando el Wizard Miniprep Kit™ (Promega). Se realizó la secuenciación de ADN de los fragmentos de PCR subclonados de forma manual mediante la reacción de terminación de cadena (Sequenase 2.0™ Kit, Pharmacia). Se realizaron búsquedas de homología de ácido nucleico utilizando el programa BLAST anotado anteriormente.

Se secuenciaron un total de 1384 clones a partir de más de 5000 encontrados. Se prepararon un total de 1996 plantillas de ADN. Se utilizó un programa para recortar el vector, y se utilizó un programa diferente para agrupar los clones en dos o más clones idénticos o con un solapamiento de 50 bases iguales. A continuación, se realizó un BLAST de un clon representativo de la agrupación. Se diseñaron cebadores para RT-PCR para ver si los clones se expresaban de manera diferencial.

2. RT-PCR semicuantitativa

El clon inicial aislado, designado como clon 65, tenía 212 pb y la secuencia:

```
5' CAGAGGGTGGGTGGGAAAGAGTGAATTATTTAATTTTAAATGTTATAATAAAGCCAATGT
AGTTGAGACCAAGGAAATGAGCATTGAGAACACAACTTGAAGTCTGGTGCCAGGGTTGT
TGGACCTCACACCCTGTCTCTGAGCCACCCGGAAGTGACATAAAGGACGCTGT
GTGATCAAGTTCTGGACACTTTTCTGGGATG (SEQ ID NO:11).
```

Los cebadores de RT-PCR se diseñaron para confirmar la expresión diferencial, obtener clones adicionales, cribar clon de ratón de longitud completa, y cribar el clon humano. Los cebadores de RT-PCR se diseñaron tal como se indica a continuación:

65.pcr.top1: 5' -CAGAGGGTGGGTGGGAAAGAGTGA (SEC ID NO: 33)

y

65.pcr.bot2: 3' -CCTTCACTGTATTTCTCTGCGACAC (SEC ID NO: 34)

Para el procedimiento de RT-PCR, se desarrollaron líneas celulares para la subconfluencia antes de extraer el ADN. El ARN total se extrajo utilizando Stat-60™ (Tel-Test™ B) según las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se preparó a partir de 0,1 μg - 3 μg de ARN total con el kit Superscript™ RT (Gibco, BRL). La amplificación por PCR de 5 μl de la primera cadena de ADNc se realizó en una reacción de PCR con 50 μl . Los cebadores anteriores se utilizaron para amplificar la primera cadena de ADNc. Como controles, se utilizaron cebadores correspondientes a las posiciones de nucleótidos 707-729 (sentido; 5'-GTGGCCCATGCTCTGGCAGAGGG (SEC ID No. 35)) o 836-859 (sentido; 5'-GACTGGAGCAAGGTCTGCTCGCC (SEC ID No. 36)) y 1048-1071 (antisentido; 5'-GCACCACCCACAAGGAAGCCATCC (SEC ID No. 37)) de triosafosfato isomera humana (huTPI) (Maquat *et al.*, J. Biol. Chem., 260: 3748-3753 (1985); Brown *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5: 1694-1706 (1985)), para amplificar la primera cadena de ADNc. Para la triosafosfato isomera de ratón, se utilizaron para la amplificación los cebadores correspondientes a las posiciones de nucleótidos 433-456 (sentido; 5'-GACGAAAGGGAAGCCGGCAT CACC (SEC ID No. 38)) o 457-480 pb (sentido; 5'-GAGAAGGTCGTGTTTCGAGCAAACC (SEC ID No. 39)) y 577-600 pb (antisentido; 5'-CTTCTCGTGTACTTCTGTGCCTG (SEC ID No. 40)) o 694-717 pb (antisentido; 5'-CACGTCAGCTGGCGTTGCCAGCTC (SEC ID NO. 41)).

Brevemente, se añadieron 4 μCi de (^{-32}P)CTP (3000 Ci/mmol) a cada reacción con 2,5 U de TaKaRa Ex Taq™ (Panvera, Madison, WI) y 0,2 μM de cada dNTP. Las reacciones se amplificaron en un 480 PCR termociclador™ (Perkin Elmer) utilizando las siguientes condiciones: 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, durante 18-25 ciclos. Se realizó una electroforesis sobre gel de poliacrilamida al 6% de 5 μl de productos de PCR. El gel se expuso a una película. Se obtuvieron mediciones de densitometría utilizando el software Alpha Ease Version 3.3a™ (Alpha Innotech Corporation) para cuantificar los productos génicos específicos de clon 65 y clon 320 o específicos de TPI.

ES 2 316 173 T3

3. Análisis de transferencia Northern

Se hibridaron las transferencias (*blots*) Northern de múltiples tejidos de adulto (Clontech) y la transferencia Northern del poliA+ARN de C57MG parental y del derivado C57MG/Wnt-1 (2 µg/banda) con una sonda designada como 5 65.50.mer.2 de las bases de nucleótidos 261-310 de las figuras 1A y 1B:

5' -CAACTTCTCGGCCGTGGTGTCTGTAGATGGGCGGCCTGTGAGACTCCAGC (SEC
ID No. 42)

generada utilizando los cebadores indicados anteriormente. Las membranas se lavaron en 0,1 x SSC a 55-65°C y se expusieron a autorradiografía. Las transferencias se rehibridaron con una sonda sintética de 75 pb del gen de actina humano. Véase, Godowski *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 8083-8087 (1989) para un procedimiento de fabricación de una sonda con oligos solapantes, que es cómo se preparó la sonda de actina.

4. Cribado de librerías de ADNc

Los clones que codificaban el polipéptido del clon 65 de longitud completa de ratón se aislaron mediante el cribado de ARN biblioteca 211: C57MG/Wnt-1 mediante hibridación de colonias con la sonda anterior. Los insertos de ciertos de estos clones se subclonaron en pBLuescriptTM IISK+ y su secuencia de ADN se determinó mediante secuenciación de didesoxi ADN en ambas cadenas.

5. Resultados

La técnica recientemente descrita de SSH combina una eficacia de sustracción elevada con una representación igualada de secuencias expresadas de manera diferencial. Este procedimiento se basa en reacciones específicas de PCR que permiten la amplificación exponencial de ADNcs que difieren en abundancia, mientras que se suprime la amplificación de secuencias de abundancia idéntica en dos poblaciones. La técnica de SSH se utilizó en la presente invención para aislar genes expresados en una célula mioepitelial mamaria de ratón transformada con *Wnt-1*, cuya expresión se reduce o está ausente en la célula mioepitelial parental. El poliA+ARN extraído de ambos tipos de células se utilizó para sintetizar los ADNcs de prueba y conductores. El grado de eficacia de la sustracción se monitorizó mediante análisis de transferencia Southern de productos de PCR no sustraídos y sustraídos utilizando una sonda de β-actina. No se observó ARNm de β-actina en los productos de PCR sustraídos, confirmando la eficacia de la sustracción.

Después de llevar a cabo la RT-PCR y el análisis de transferencia Northern en el clon inicial para confirmar la expresión diferencial, se observó aproximadamente una inducción de 2 veces en la línea celular Wnt-1 mediante transferencia Northern y una inducción de 4,5 veces mediante RT-PCR. Tras el cribado de la biblioteca, se obtuvo el clon 65 de longitud completa de ratón, designado como clon 65.11.3. El ADNc para el clon 65 de ratón codifica una nueva proteína intracelular que es inducida fuertemente en la línea celular Wnt-1/C57 mg, pero está ausente o a niveles muy bajos, en las células C57 mg parentales. Este clon, 65.11.3, codifica una proteína aproximadamente idéntica en un 48-60% en la secuencia a miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos putativa del clon 65 de ratón se muestran en las figuras 1A y 1B (SEC ID Nos. 4 y 6, respectivamente). La alineación de las secuencias de aminoácidos del clon 65 de humano y ratón se muestra en la figura 6 (SEC ID Nos. 3 y 6, respectivamente). El clon de ratón se colocó en pRK5E, descrito anteriormente, y se depositó con la ATCC. Tras la transformación en células JM 109, el plásmido hace que las células sean resistentes a ampicilina. Tras la digestión con *HindIII* y *NotI*, las células proporcionan un inserto en el ratón de 786 pares de bases desde el codón Met hasta el codón de parada. Existen 1824 pb en dirección 5' del sitio *NotI* que codifican el antígeno estable al calor (HSA) de ratón (CD24) fusionado al inserto del clon 65, que se puede eliminar mediante digestión con *NotI*. Debido a que la secuencia de HSA adyacente al extremo 5' del gen se extrajo electrónicamente, no existe secuencia 5' para el clon 65 en dirección 5' de la Met en las figuras 1A y 1B.

Sin limitarse a ninguna teoría, los cebadores de PCR/RT pueden caer en la 3'UTR de un clon "spliced" alternativamente dado que el clon final 65.11.3 (clon 65 de ratón) no tiene estas secuencias. Se obtuvieron un conjunto de otros clones mediante el cribado de una biblioteca de ADNc de C57 mg/Wnt-1 utilizando las sondas específicas descritas a continuación.

Se identificaron dos clones posteriores, designados como 65.11 y 65.9 y que tenían 2224 y 2004 pb, respectivamente, utilizando una sonda derivada del clon 65 original de 212 pb. Sus secuencias (SEC ID Nos. 12 y 13, respectivamente) se muestran en las figuras 10 y 11, respectivamente. Los clones 65.11 y 65.9 tienen diferentes extremos 5', prácticamente extremos 3' idénticos, y repeticiones CA. El extremo 5' del clon 65.11 tiene una región del tipo CDC-42. El extremo 5' del clon 65.9 contiene una región con homología con parte de una EST de 314 pb, AA462407 (aislada de una glándula mamaria de ratón).

Se obtuvieron otros tres clones de la misma biblioteca mediante cribado con una sonda derivada de la región homóloga a CDC-42 del clon 65.11: clon 65.11.1 que tiene 836 pb (SEC ID No. 14; figura 12), el clon 65.11.3 del clon 65 de longitud completa de ratón (SEC ID No. 15; figuras 13A-13B) que tiene 2251 pb, descrito a continuación,

ES 2 316 173 T3

y la región codificante del cual se describe en las figuras 1A-1B y comparte una región en el extremo 5' con EST AA613604 (aislado de placenta de ratón adulto) y el clon 65.11.6 que tiene 847 pb (SEC ID No. 16, figura 14).

5 Los otros tres clones (65.1, 65.6 y 65.13) también se obtuvieron del cribado primario (utilizando una parte del clon 65 original como sonda, uno de los cuales (clon 65.1) tiene un extremo 5' similar al del clon 65.9). Las secuencias de estos clones (SEC Id Nos. 17, 18 y 19, respectivamente) se muestran en las figuras 15, 16 y 17, respectivamente.

10 Los clones posteriores, que pueden ser variantes de "splice", contienen piezas del extremo 3' del clon inicial y/o contienen un extremo 5' inusual, y/o contienen un extremo de tipo CDC-42.

Ejemplo 2

Aislamiento de un clon de ADNc que codifica el clon 320 de ratón

15 El ADNc para el clon 320 de ratón se aisló independientemente mediante cribado diferencial de Wnt-1 utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1. El clon inicial aislado se designó como clon 320 y tenía 165 pb. Había dos clones en este grupo. El clon se secuenció por lo menos parcialmente tal como se ha descrito anteriormente y los cebadores de RT-PCR se diseñaron tal como se indica a continuación:

20 320.pcr.top 1: (correspondiente a las bases 2319-2342 de las figuras 4A-4B)

5' -GCACACACGCATGGAGGCAAGCTC (SEC ID No: 43)

25 y

320.pcr.bot1: (correspondiente a las bases 2423-2446 de las figuras 4A-4B)

30 3' -ACCACCTCGACATTTGTTCTACCG (SEC ID No: 44)

Los procedimientos de RT-PCR y transferencia Northern se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 para confirmar la expresión diferencial.

35 A continuación, se aislaron cuatro clones que codifican el clon 320 de ratón de longitud por lo menos parcial mediante el cribado de ARN biblioteca 211: C57MG/Wnt-1 mediante hibridación de colonias con una sonda designada como 320.50.mer.1 de las bases de nucleótidos 1997-2046 de las figuras 4A y 4B:

40 5' -CTCCTGACCTTTGGGGCTGCCACTTCCCAGGACGACCACTGCCTGCCCAC (SEC
ID No: 45) .

45 El ADNc para el clon 320 de ratón codifica una nueva proteína que está fuertemente inducida en la línea celular Wnt-1/C57 mg, pero está ausente en las células C57 mg parentales y puede ser útil en la regulación de las células cancerosas.

50 La secuencia de nucleótidos de una secuencia de consenso formada por los tres clones (SEC ID No. 7) se muestra en las figuras 4A y 4B. La secuencia de nucleótidos de otro clon del clon 320 de ratón se muestra en las figuras 5A y 5B (SEC ID No. 8) y de otro clon se muestra en la figura 6 (SEC ID No. 9). La secuencia de consenso es una secuencia del clon 320 de ratón de 2822 pb que no tiene un marco de lectura abierto obvio o aparente y es probablemente un clon parcial. Cuando el ARN de tumores que aparecen en ratones en una colonia establecida a partir de dos ratones transgénicos machos Wnt-1 (proporcionados por Harold Varmus en NCI) se sometió a RT-PCR utilizando los cebadores anteriores, el clon 320 fue fuertemente inducido. Una sección muy pequeña de aproximadamente sólo 200 pb de la secuencia de consenso se empareja con una región en la 3'UTR de Wnt-5A humana.

55 El clon de ratón se colocó en pRK5E, descrito anteriormente, y se depositó con la ATCC. Tras la transformación en células JM 109, el plásmido hace que las células sean resistentes a ampicilina. Tras la digestión con *Bam*HI y *Hind*III, se proporciona un inserto de ratón de un tamaño de aproximadamente 3000 pares de bases.

60 Ejemplo 3

Aislamiento de un clon de ADNc que codifican el clon 65 humano

65 Para aislar el clon humano de longitud completa correspondiente a 65.11.3 (clon 65 de ratón), se cribó una biblioteca de ADNc de hígado fetal humano (Clontech), tratado con el kit SuperScript™ utilizando el vector pRK5E tal como se ha descrito anteriormente, con una sonda (65.50.mer.2 (SEC ID No. 42) indicada anteriormente en el Ejemplo 1) a baja astringencia (20% de formamida, 1 X SSC, lavado a 55°C).

ES 2 316 173 T3

Se identificaron cuatro clones: 65.1, 65.4, 65.5 y 65.6. Los insertos para estos clones se subclonaron en pBlue-script™ IISK+ y su secuencia de ADN se determinó mediante secuenciación de dideoxi ADN en ambas cadenas. Se obtuvo una secuencia de consenso a partir de estos clones para producir tanto la secuencia de nucleótidos como la secuencia de aminoácidos putativa para el clon 65 humano. La secuencia de consenso y la secuencia de aminoácidos derivada se muestran en las figuras 5A y 5B (SEC ID Nos. 1 y 3, respectivamente). El clon 65.1 (SEC ID No. 46) empieza en el nucleótido de posición 51 y termina en el 227 de la SEC ID No. 1 y está rodeada en la figura. El segundo clon 65.4 (SEC ID No. 47) empieza en el nucleótido de posición 51 y termina en el 824 de la SEC ID No. 1. El tercer clon 65.6 (SEC ID No. 48) empieza en el nucleótido de posición 480 y termina en el 1319 de la SEC ID No. 1 en las figuras 5A-5B. Esta secuencia de consenso de las 5A-5B (SEC ID No. 1) tiene una homología del 93% con la secuencia de nucleótidos del clon 65 de la figura 1 (SEC ID No. 4). Véase la figura 6. Mediante la búsqueda de homología, se observa que el clon 65 humano, al igual que el clon 65 de ratón, es un miembro de la familia de Rho, Rac y CDC42. Debido a la homología con la familia de Rho y Rac, se cree que estas proteínas están implicadas en la regulación por incremento de los genes del cáncer.

El clon de ratón se colocó en un plásmido pRK5E, tal como se ha descrito anteriormente y se depositó con la ATCC. Tras la transformación en células JM 109, las células se volvieron resistentes a ampicilina. Tras la digestión con *Xba*I y *Not*I, se proporciona un inserto de un tamaño de 777 pares de bases desde el ATG hasta el codón de parada.

Ejemplo 4

Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones de células o tejido. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en el tejido de la transcripción, identificar y localizar la infección viral, seguir los cambios en la síntesis de ARNm específico y ayudar en el mapeo de los cromosomas.

La hibridación *in situ* se llevó a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo por Lu y Gillett, *Cell Vision* 1: 169-176 (1994)), utilizando ribosondas marcadas con ³³P generadas por PCR. Brevemente, se seccionan tejidos humanos bañados en parafina y fijados a formalina, se desparafinaron, se desproteinaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, y se procesaron posteriormente para una hibridación *in situ* tal y como se describe por Lu y Gillett, *supra*. Se generó una ribosonda antisentido marcada con [³³-P] UTP a partir de un producto de PCR y se hibridó a 55°C durante toda la noche. Los portaobjetos se sumergen en una emulsión nuclear de rastreo Kodak NTB2 y se expusieron durante 4 semanas.

Síntesis de ribosondas con ³³P

Se secaron con concentradores centrífugos de tipo Speed-Vac 6,0 µl (125 mCi) de ³³P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mol). A cada tubo que contenía ³³P-UTP seco, se añaden los siguientes ingredientes:

2,0 µl 5x de tampón de transcripción

1,0 µl de DTT (100 mM)

2,0 µl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 µl; cada uno de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 µl de H₂O)

1,0 µl de UTP (50 µM)

1,0 µl RNAsina

1,0 µl de plantilla de ADN (1 µg)

1,0 µl de H₂O

1,0 µl de ARN polimerasa (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)

Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadieron un total de 1,0 µl de RQ1 ADNasa, seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron un total de 90 µl de TE (Tris 10 mM pH 7,6/1 mM EDTA pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La solución remanente se cargó en una unidad de ultrafiltración MICROCON-50™, y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó utilizando el programa 2 (3 minutos). Después del giro final de recuperación, se añadieron un total de 100 µl de TE. A continuación, se pipeteó 1 µl del producto final sobre papel DE81 y se contaron en 6 ml de BIOFLUOR II™.

La sonda se extendió sobre un gel de TBE/urea. Se añadieron un total de 1-3 µl de la sonda o 5 µl de ARN MrkII a 3 µl de solución tampón de carga. Después de calentar sobre un bloque de calor a 95°C durante 3 minutos, el gel se colocó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos del gel se nivelaron, se cargó la muestra y se operó a 180-245 voltios

ES 2 316 173 T3

durante 45 minutos. El gel se envolvió en un envoltorio de plástico (marca SARAN™) y se expuso a una película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70°C desde una hora hasta toda la noche.

5 Hibridación de ³³-P

A. Pretratamiento de las secciones congeladas

Los portaobjetos se extrajeron del congelador, se colocaron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en una incubadora a 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana de extracción, y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 ml 20 x SSC + 975 ml s.c. H₂O). Después de la desproteínación en 0,5 µg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de 10 mg/ml de reserva en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa precalentado), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100% durante 2 minutos cada una.

B. Pretratamiento de las secciones bañadas en parafina

Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en s.c. H₂O, y se enjuagaron dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteínaron en 20 µg/ml de proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa; 37°C, 15 minutos) para tejido de embrión humano, u 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37°C, 30 minutos) para tejidos en formalina. El posterior enjuague en 0,5 x SSC y deshidratación se llevaron a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.

C. Prehibridación

Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico recubierta por tampón de Caja (4 x SSC, formamida al 50%). El papel de filtro se saturó. El tejido se recubrió con 50 µl de tampón de hibridación (3,75 g de sulfato de dextrano + 6 ml de s.c. H₂O), se centrifugó y se calentó en el microondas durante 2 minutos con la tapa aflojada. Después de enfriar sobre hielo, se añadieron 18,75 ml de formamida, 3,75 ml de 20 x SSC y 9 ml de s.c. H₂O, y el tejido se centrifugó bien y se incubó a 42°C durante 1-4 horas.

D. Hibridación

Se calentaron a 95°C durante 3 minutos 1,0 x 10⁶ cpm de sonda y 1,0 µl de ARNt (50 mg/ml reserva) por portaobjeto. Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo, y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por portaobjeto. Después de centrifugar, se añadieron 50 µl de una mezcla de ³³P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 55°C.

E. Lavados

El lavado se realizó durante 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f=4 L), seguido de un tratamiento con ARNasaA a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de lavado de astringencia fueron las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4 L).

F. Oligonucleótidos

Se realizó un análisis *in situ* en las secuencias de ADN descritas en la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados para estos análisis son los siguientes.

(1) Clon 65.11

p1: 5' -GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGC GTT GAC TCA
GAA AAA CC-3' (SEC ID No: 49)

p2: 5' -CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCA TAT GAA TTT
CAG CCC TAA-3' (SEC ID No: 50)

ES 2 316 173 T3

(2) Clon 320.50

p3: 5' -GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACG CAC ATC TGT
TTC CGT TTT-3' (SEC ID No: 51)

p4: 5' -CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA CCA TCC CCG CTC
TCT ACC TA-3' (SEC ID No: 52)

G. Resultados

Se realizó un análisis *in situ* en las secuencias de ADN anteriores descritas en la presente invención. Los resultados de estos análisis son los siguientes.

(1) Clon 65.11

Expresión en tejidos de ratón: Este clon se expresó en ganglios espinales en desarrollo de un ratón E15.5 y en las cúspides de las válvulas cardíacas de un ratón adulto.

(2) Clon 320.50

Expresión en tejidos de ratón: Este clon se expresó en la capa de células piramidales de hipocampo y la circunvolución dentada de un cerebro de ratón adulto. También se expresó en el pulmón, médula renal y folículos pilosos de un ratón E15.5.

Ejemplo 5

Utilización de ADN que codifica polipéptidos de clon 65 y 320 como sonda de hibridación

El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del clon 65 ó 320 como sonda de hibridación.

El ADN que comprende la secuencia codificante del clon 65 de longitud completa humano (tal como se muestra en las figuras 5A y 5B, SEC ID No. 3), o del clon 65 de ratón (tal como se muestra en las figuras 1A y 1B, SEC ID No. 6), o del clon 320 de longitud completa de ratón (las secuencias parciales mostradas en las figuras 2, 3 y 4; SEC ID Nos. 7, 8 y 9, respectivamente) se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de estos polipéptidos del clon 65 y 320 particulares) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de elevada astringencia. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de polipéptido del clon 65 o polipéptido del clon 320 a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica un polipéptido de clon 65 ó 320 de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

Ejemplo 6

Expresión de polipéptido de clon 65 ó 320 en E. coli

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptido del clon 65 ó 320 mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de clon 65 ó 320 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et. al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor *trp*, una secuencia líder poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de clon 65 o la región codificante de clon 320, el finalizador transcripcional lambda, y un gen *argU*.

ES 2 316 173 T3

A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et. al., supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y el polipéptido de clon 65 ó 320 se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

Ejemplo 7

Expresión de polipéptido de clon 65 ó 320 en células de mamíferos

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de polipéptido de clon 65 ó 320 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 se puede utilizar como vector de expresión. El ADN apropiado que codifica el polipéptido de clon 65 ó 320 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN para el polipéptido de clon 65 ó 320 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al., supra*. A los vectores resultantes se les hace referencia convenientemente de manera general como pRK5E.clon 65 o pRK5E.clon320, respectivamente, en la siguiente descripción general.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μg de ADN de pRK5E.clon 65 o pRK5E.clon 320 se mezcla con aproximadamente 1 μg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya *et. al., Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 μl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl_2 . A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO_4 , y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 pCi/ml ^{35}S - metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido de clon 65 ó 320. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

En una técnica alternativa, se puede introducir el polipéptido de clon 65 ó 320 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac *et. al., Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un frasco giratorio y se añaden 700 μg de ADN de pRK5E.clon65 o pRK5E.clon 320. En primer lugar, las células se concentran en el frasco giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el frasco giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los desechos. La muestra que contiene el polipéptido de clon 65 ó 320 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, polipéptido de clon 65 ó 320 puede expresarse en células CHO. El pRK5E.clon 65 o pRK5E.clon 320 pueden transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio reemplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ^{35}S -metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido de clon 65 ó 320, el medio de cultivo puede reemplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido de clon 65 ó 320 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

ES 2 316 173 T3

El polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con epítopo puede expresarse también en células CHO huésped. El polipéptido de clon 65 ó 320 puede subclonarse fuera del vector pRK5. Suva *et al.*, Science, 237: 893-896 (1987); EP 307.247 publicada el 15-3-1989. El inserto del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítopo concreta, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni²⁺.

Ejemplo 8

Expresión de polipéptido de clon 65 ó 320 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de un polipéptido de clon 65 ó 320 en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de un polipéptido de clon 65 ó 320 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica un polipéptido de clon 65 ó 320 y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular. Para la secreción, el ADN que codifica un polipéptido de clon 65 ó 320 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal del clon 65 ó 320 nativo u otro péptido señal de mamífero, o factor alfa de levadura o la secuencia señal/líder secretora de la invertasa, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión.

Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

El polipéptido de clon 65 ó 320 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene polipéptido del clon 65 ó 320 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna concretas.

Ejemplo 9

Expresión de polipéptido de clon 65 ó 320 en células de insectos infectadas de Baculovirus

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de un polipéptido de clon 65 ó 320 en células de insectos infectadas de Baculovirus.

La secuencia que codifica un polipéptido de clon 65 ó 320 se fusiona en dirección 5' de un epítopo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítopo etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica un polipéptido de clon 65 ó 320 o la parte deseada de la secuencia codificante (tal como la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharming) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación, el polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et al.*, Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonicán dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga

ES 2 316 173 T3

en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A_{280} con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A_{280} de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+} -NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del polipéptido de clon 65 ó 320 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Ejemplo 10

Preparación de anticuerpos que se unen a polipéptido del clon 65 ó 320

1. Anticuerpos policlonales

Se generan antisueros policlonales en conejos blancos hembra de Nueva Zelanda contra polipéptido del clon 65 murino y humano y contra polipéptido del clon 320 murino. Los antígenos utilizados son proteínas fusionadas con histidina o con la parte Fc de IgG. Cada proteína se homogeniza con adyuvante completo de Freund para la inyección primaria y con adyuvante incompleto de Freund para todas los refuerzos posteriores. Para la inmunización primaria y el primer refuerzo, se inyectan 3,3 μ g por kg de peso corporal directamente en los nódulos linfáticos popliteales tal como se describe en Bennett *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 23060-23067 (1991) y “Production of Antibodies by Inoculation into Lymph Nodes” de Morton Sigel *et al.* en Methods in Enzymology, Vol. 93 (Nueva York: Academic Press, 1983). Para los posteriores refuerzos, se inyectan 3,3 μ g por kg de peso corporal en puntos subcutáneos e intramusculares. Las inyecciones se realizan cada 3 semanas con tomas de muestras de sangre en las siguientes dos semanas.

2. Anticuerpos monoclonales

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a un polipéptido del clon 65 ó 320 son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen polipéptido del clon 65 ó 320 purificado, proteínas de fusión que contienen el polipéptido del clon 65 ó 320, y células que expresan el polipéptido del clon 65 ó 320 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno del clon 65 ó 320 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan de 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos para polipéptido del clon 65 ó 320.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales “positivos” para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de un polipéptido del clon 65 ó 320. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células del bazo se recogen. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando PEG al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionada, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA por la reactividad contra un polipéptido del clon 65 ó 320. La determinación de células de hibridomas “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra un polipéptido del clon 65 ó 320 está dentro de la técnica.

Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singéneos Balb/c para producir ascites que contiene los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido del clon 65 ó 320. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces de cultivos de tejidos o en botellas en rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en las ascites se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

ES 2 316 173 T3

Ejemplo 11

Un uso de anticuerpos que se unen a polipéptido de clon 65 ó 320

5 1. Líneas celulares

Se desarrollan las células BT474 y MDA-MB-23 establecidas de tumor mamario humano (que están disponibles de ATCC) en medio esencial mínimo (Gibco, Grand Island, NY) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT), piruvato sódico, L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales, y 2x de solución vitamínica y se mantiene a 37°C en CO₂ al 5%. Zhang *et al.*, *Inyas, & Metas.*, 11:204-215 (1991); Price *et al.*, *Cancer Res.*, 50: 717-721 (1990).

15 2. Anticuerpos

Se recogen los anticuerpos monoclonales anti-clon 65 o anti-clon 320 que pueden prepararse tal y como se describe anteriormente, con PBS que contiene EDTA 25 mM y se utilizan para inmunizar ratones BALB/c. Se administran a los ratones inyecciones i.p. de 10⁷ células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. Se administran inyecciones i.p. de un extracto de membrana de Wnt purificado con aglutinina de germen de trigo (WGA) en Sepharose en las semanas 9 y 13 a los ratones con antisueros que inmunoprecipitaron Wnt-1 marcado con ³²P. Esto va seguido de una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de Wnt-1 y se fusionan los esplenocitos línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Se criban los sobrenadantes de hibridoma para la unión de Wnt-1 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación. Se utiliza MOPC-21 (IgG1) (Cappell, Durham, NC) como un control de emparejamiento de isotipo.

25 De manera adicional, pueden utilizarse los anticuerpos monoclonales murinos IgG₁ anti-ErbB2 4D5 (ATCC CRL 10463 depositados el 24 de mayo, 1990) y 7C2, específicos para el dominio extracelular de ErbB2, con los anticuerpos anteriores. Se producen tal y como se describe en Fendly *et al*, *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990) y WO89/06692.

30 3. Análisis del estado del ciclo celular y la viabilidad

Se examinan las células simultáneamente según la viabilidad y el estado del ciclo celular mediante citometría de flujo en un FACSTAR PLUS™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA, San Jose. CA). Se recogen las células de tumor mamario mediante el lavado de la monocapa con PBS, la incubación de las células en tripsina al 0,05% y EDTA 0,53 mM (Gibco), y su resuspensión en medio de cultivo. Se lavan las células dos veces con PBS que contiene FBS al 1% y se incuba el residuo durante 30 minutos en hielo con 50 µl de 7-aminoactinomicina D (7AAD) 400 µM (Molecular Probes. Eugene. OR), un colorante vital que tiñe todas las células permeables. A continuación, se fijan las células con 1,0 ml de paraformaldehído al 0,5% en PBS y se permeabilizan simultáneamente y se tiñen durante 16 horas a 4°C con 220 µl de colorante HOECHST 33342™ 10 µg/ml (también un colorante de unión a ADN) que contiene TWEEN 20™ al 5%.

Se recopilan los datos de 1 x 10⁴ células y se almacenan utilizando el software de LYSYS II™ y se analizan utilizando el software de PAINT-AGATE™ (Becton Dickinson). Darzynkiewica *et al.*, *Cytometry*, 13:795-808 (1992); Picker *et al.*, *J. Immunol.*, 150:1105-1121 (1993). Se determinan la viabilidad y el porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular en células individuales seleccionadas utilizando tinciones 7AAD y Hoechst, respectivamente. (Se excluyen dobles de células mediante el análisis de pulsos de la anchura frente área de la señal Hoechst.) Se determinan las cantidades celulares utilizando hemocitómetros.

50 4. Afinidad de unión a receptor putativo

Se preparan anticuerpos anti-clon 65 y anti-clon 320 radiyodados mediante el procedimiento Iodogen™. Fracker *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 80: 849-857 (1978). Se realizan ensayos de unión utilizando células que expresan receptores apropiados cultivadas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware. Lincoln Park, N.J.). Se tripsinizan y se siembran las células en pocillos de placas de 96 pocillos en una densidad de 10⁴ células/pocillo y se dejan adherirse durante toda la noche. Se lavan las monocapas con medio de cultivo frío complementado con azida sódica al 0,1% y, a continuación, se incuba por triplicado con 100 µl de diluciones en serie de anticuerpos ¹²⁵I-anti-clon 65 o ¹²⁵I-anti-clon 320 en medio de cultivo frío que contiene azida sódica al 0,1% durante 4 horas en hielo. Se estima la unión no específica mediante la preincubación de cada muestra con un exceso molar de 100 veces de anticuerpos no radioactivos en un volumen total de 100 µl. Se elimina la radioactividad no unida mediante dos lavados con medio frío que contiene azida sódica al 0,1%. Se detecta la radioactividad asociada a las células en un contador gamma tras la solubilización de las células con 150 µl de NaOH 0,1 M/pocillo. Se determinan las constantes de unión (K_d) del polipéptido del clon 65 y el polipéptido del clon 320 y las afinidades de unión del anticuerpo anti-clon 65 y anti-clon 320 mediante análisis Scatchard.

65 Se espera que los anticuerpos contra los polipéptidos del clon 65 y el clon 320 afectarán el crecimiento de estas células.

ES 2 316 173 T3

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

5

	Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
10	pRK5E.h.WIG-3.65.4A	209536	10 de diciembre de 1997
	pRK5E.m.WIG-3.65.11.3	209535	10 de diciembre de 1997
15	pRK5E.h.WIG-4.320.9	209534	10 de diciembre de 1997

Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie de los cultivos de los depósitos al uso público tras la concesión de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

El documento escrito anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención. Los depósitos de los materiales de la presente invención no constituyen una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa.

Referencias citadas en la descripción

45

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

50

Documentos de patente citados en la descripción

- CA 41086 [0001]
- US 4675187 A [0052]
- US 4683195 A [0055]
- WO 8705330 A [0068]
- US 4496689 A [0070]
- US 4670417 A [0070]
- US 4179337 A [0070]
- US 4399216 A [0082]
- WO 9517416 A [0004]
- WO 9222653 A [0053]
- US 5364934 A [0060]
- US 4640835 A [0070]
- US 4301144 A [0070]
- US 4791192 A [0070]
- WO 8905859 A [0082]
- DD 266710 [0083]

65

ES 2 316 173 T3

- US 4946783 A [0083]
- US 4943529 A [0084]
- 5 • EP 183070 A [0084]
- EP 394538 A [0084]
- US 5010182 A [0087]
- 10 • WO 9013646 A [0087]
- EP 73657 A [0093]
- 15 • EP 117060 A [0097]
- US 4736866 A [0112]
- WO 9738086 A [0112]
- 20 • US 3720760 A, Bennich [0118]
- EP 616812 A [0126]
- 25 • US 4816567 A [0143] [0143] [0147]
- WO 9308829 A [0150]
- US 4676980 A [0152] [0152]
- 30 • WO 92200373 A [0152]
- EP 03089 A [0152]
- 35 • US 4275149 A [0155] [0157]
- US 4318980 A [0157]
- 40 • EP 307247 A [0229]
- EP 139383 A [0084]
- EP 402226 A [0084]
- EP 244234 A [0084]
- WO 9100357 A [0084]
- EP 362179 A [0087]
- EP 36776 A [0091]
- GB 2211504 A [0094]
- EP 117058 A [0097]
- US 4870009 A [0112]
- US 3773919 A [0131]
- WO 9100360 A [0152]
- US 5183884 A [0154]
- US 4737456 A [0155]
- US 4376110 A [0162]
- WO 8906692 A [0247]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 45 • **HOLLAND** *et al. Dev. Suppl.*, 1994, 125-133 [0003]
- **MCMAHON**. *Trends Genet.*, 1992, vol. 8, 236-242 [0003]
- **NUSSE; VARMUS**. *Cell*, 1992, vol. 69, 1073-1087 [0003]
- 50 • **GAVIN** *et al. Genes Dev.*, 1990, vol. 4, 2319-2332 [0003]
- **LEE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 2268-2272 [0003]
- 55 • **CHRISTIANSEN** *et al. Mech. Dev.*, 1995, vol. 51, 341-350 [0003]
- **VANT VEER** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 2532-2534 [0003]
- **NUSSE; VARMUS**. *Cell*, 1982, vol. 31, 99-109 [0004]
- 60 • **PAPKOFF; SCHRYVER**. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 2723-2730 [0005]
- **BRADLEY; BROWN**. *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1569-1575 [0005]
- **RIJSEWIK** *et al. Cell*, 1987, vol. 50, 649-657 [0006]
- 65 • **LAWERENCE**. *Dev. Biol.*, 1977, vol. 56, 227-240 [0006]

ES 2 316 173 T3

- **BAKER.** *Dev. Biol.*, 1988, vol. 125, 96-108 [0006]
- **KLINGENSMITH; NUSSE.** *Dev. Biol.*, 1994, vol. 166, 396-414 [0006]
- 5 • **HERMAN; HORVITZ.** *Development*, 1994, vol. 120, 1035-1047 [0006]
- **MCMAHON; BRADLEY.** *Cell*, 1990, vol. 62, 1073-1085 [0006]
- **THOMAS; CAPPECHI.** *Nature*, 1990, vol. 346, 847-850 [0006]
- 10 • **STARK et al.** *Nature*, 1994, vol. 372, 679-683 [0006]
- **TAKADA et al.** *Genes Dev.*, 1994, vol. 8, 174-189 [0006]
- 15 • **PARR; MCMAHON.** *Nature*, 1995, vol. 374, 350-353 [0006]
- **BRADBURY et al.** *Dev. Biol.*, 1995, vol. 170, 553-563 [0006]
- **ZHENG et al.** *Oncogene*, 1996, vol. 12, 555-562 [0006]
- 20 • **DZIERZAK; MEDVINSKY.** *Trends Genet.*, 1995, vol. 11, 359-366 [0007]
- **ZON et al.** *Colloque, INSERM.* 1995, vol. 235, 17-22 [0007]
- 25 • the Joint International. Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, 03 April 1995 [0007]
- **KANATSU; NISHIKAWA.** *Development*, 1996, vol. 122, 823-830 [0007]
- 30 • **CHRISTIANSEN et al.** *Mech. Devel.*, 1995, vol. 51, 341-350 [0007]
- **CADIGAN; NUSSE.** *Genes & Dev.*, 1997, vol. 11, 3286-3305 [0009]
- **DIDSBURY et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 16378-16382 [0010]
- 35 • **MOLL et al.** *Oncogene*, 1991, vol. 6, 863-866 [0010]
- **SHIRSAT et al.** *Oncogene*, 1990, vol. 5, 769-772 [0010]
- 40 • **HAATAJA et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 20384-20388 [0010]
- **CROPP et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 7737-7741 [0010]
- **CORNELIS et al.** *Oncogene*, 1993, vol. 8, 781-785 [0010]
- 45 • **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0037]
- **VOLCKAERT et al.** *Gene*, 1981, vol. 15, 215-223 [0046]
- 50 • **ROBERTS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 119-123 [0046]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI et al.** *The Molecular Basis of Cancer.* *WB Saunders*, 1995, 13 [0053]
- 55 • **MULLIS et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1987, vol. 51, 263 [0055]
- PCR Technology. *Stockton Press*, 1989 [0055]
- 60 • **ADAMS et al.** *Nature*, 1995, 377-174 [0057]
- **CARTER et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0061]
- **ZOLLER et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6497 [0061]
- 65 • **WELLS et al.** *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0061]
- **WELLS et al.** *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0061]

ES 2 316 173 T3

- T.E. CREIGHTON. Proteins: Structure and Molecular Properties. *W.H. Freeman & Co*, 1983 [0062]
- CHOTHIA. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0062]
- 5 • APLIN; WRISTON. *CRC Crit, Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0068]
- HAKIMUDDIN *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0069]
- EDGE *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0069]
- 10 • THOTAKURA *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0069]
- FIELD *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0072]
- 15 • EVAN. *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0072]
- PABORSKY *et al. Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0072]
- HOPP *et al. Biotechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0072]
- 20 • MARTIN *et al. Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0072]
- SKINNER *et al. J Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0072]
- 25 • LUTZ-FREYERMUTH *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0072]
- STEWART *et al. Solid-Phase Peptide Synthesis. W.H. Freeman Co*, 1969 [0074]
- MERRIFIELD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0074]
- 30 • DIATCHENKO *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1996, vol. 93, 6025-6030 [0076]
- DIEFFENBACH *et al. PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0077]
- 35 • Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. *IRL Press*, 1991 [0081]
- SHAW *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0082]
- GRAHAM; VAN DER EB. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0082]
- 40 • VAN SOLINGEN *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0082]
- HSIAO *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0082]
- 45 • KEOWN *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0082]
- MANSOUR *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0082]
- BEACH; NURSE. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0084]
- 50 • FLEER *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0084]
- LOUVENCOURT *et al. J. Bacteriol.*, 1983, 737 [0084]
- 55 • VAN DEN BERG *et al. BiolTechnology*, 1990, vol. 8, 135 [0084]
- SREEKRISHNA *et al. J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0084]
- CASE *et al. Roc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0084]
- 60 • BALLANCE *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0084]
- TILBURN *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0084]
- 65 • YELTON *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0084]
- A. NIGER KELLY; HYNES. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0084]

ES 2 316 173 T3

- C. ANTHONY. *The Biochemistry of Methyloprophs*, 1982, 269 [0084]
- GRAHAM *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0085]
- 5 • URLAUB; CHASIN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0085]
- MATHER. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0085]
- URLAUB *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0090]
- 10 • STINCHCOMB *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0090]
- KINGSMAN. *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0090]
- 15 • TSCHEMPER *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0090]
- JONES. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0090]
- CHANG *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0091]
- 20 • GOEDDEL *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0091]
- GOEDDEL. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0091]
- 25 • DEBOER *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0091]
- HITZEMAN *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0092]
- HESS *et al. J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0092]
- 30 • HOLLAND. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0092]
- GETHING *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0097]
- 35 • MANTEI *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0097]
- THOMAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0098]
- DEUTSCHER. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0101]
- 40 • SCOPES. *Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag*, 1982 [0101]
- THOMAS; CAPECCHI. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0113]
- 45 • LI *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0113]
- BRADLEY. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. IRL*, 1987, 113-152 [0113]
- WIDE. *Radioimmune Assay Method*. 1970, 199-206 [0116]
- 50 • Remington's *Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0125] [0129]
- *Chemotherapy Service. Williams & Wilkins*, 1992 [0126]
- 55 • KOHLER; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0137]
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press*, 1986, 59-103 [0138]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0139]
- 60 • BRODEUR *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc.*, 1987,
51-63 [0139]
- MUNSON; POLLARD. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0140]
- 65 • MORRISON *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0143]
- JONES *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0146] [0147]

ES 2 316 173 T3

- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0146]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0146]
- 5 • **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0147]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0147]
- **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0148]
- 10 • **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0148]
- **COLE** *et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss*, 1985, 77 [0148]
- 15 • **BOEMER** *et al. J. Immunol.*, vol. 147 (1), 86-95 [0148]
- **MILSTEIN; CUELLO**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0150]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0150]
- 20 • **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0151]
- Current Protocols in Immunology. *Wiley-Interscience*, 1991, vol. 1,2 [0155]
- 25 • Current Protocols in Immunology [0155]
- Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay.
- **O'SULLIVAN** *et al. Methods in Enzym. Academic Press*, 1981, vol. 73, 147-166 [0155]
- 30 • **ZOLA**. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Inc*, 1987, 147-158 [0160]
- **DIATCHENKO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 6025-6030 [0170]
- 35 • **BROWN** *et al. Cell*, 1986, vol. 46, 1001-1009 [0170]
- **OLSON; PAPKOFF**. *Cell Growth and Differentiation*, 1994, vol. 5, 197-206 [0170]
- **WONG** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1994, vol. 14, 6278-6286 [0170]
- 40 • **JUE** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1992, vol. 12, 321-328 [0170]
- **MAQUAT** *et al. J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 3748-3753 [0177]
- 45 • **BROWN** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 1694-1706 [0177]
- **GODOWSKI** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8083-8087 [0179]
- **LU; GILLETT**. *Cell*, 1994, vol. 1, 169-176 [0199]
- 50 • **BOLIVAR** *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0219]
- **THIMMAPPAYA** *et al. Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0225]
- 55 • **SOMPARYRAC** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0227]
- **SUVA** *et al. Science*, 1987, vol. 237, 893-896 [0229]
- 60 • **O'REILLEY** *et al. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. Oxford University Press*, 1994 [0236]
- **RUPERT** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0237]
- **BENNETT** *et al. J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 23060-23067 [0239]
- 65 • Production of Antibodies by Inoculation into Lymph Nodes. **MORTON SIGEL** *et al. Methods in Enzymology. Academic Press*, 1983, vol. 93 [0239]

ES 2 316 173 T3

- **ZHANG** *et al. Inyas, & Metas.*, 1991, vol. 11, 204-215 [0245]
- **PRICE** *et al. Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 717-721 [0245]
- 5 • **FENDLY** *et al. Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0247]
- **DARZYNKIEWICA** *et al. Cytometry*, 1992, vol. 13, 795-808 [0249]
- 10 • **PICKER** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 1105-1121 [0249]
- **FRACKER** *et al. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1978, vol. 80, 849-857 [0250]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 173 T3

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que comprende ADN que tiene:

5 i) por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos un 70% de identidad en la secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1;

10 ii) por lo menos 700 nucleótidos y por lo menos un 95% de identidad en la secuencia determinada sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan con la secuencia de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1;

iii) por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos un 70% de identidad en la secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos 1-783 de a SEC ID No. 4; o

15 iv) por lo menos 800 nucleótidos y por lo menos un 70% de identidad en la secuencia con el ADNc del polipéptido del clon 65 humano en el Depósito ATCC No. 209536;

en el que la expresión de dicho ácido nucleico es inducible por Wnt-1.

20 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1 parte (ii), que comprende ADN que codifica un polipéptido del clon 65 humano que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 258 de la SEC ID No. 3.

25 3. Ácido nucleico según la reivindicación 1 parte (iii), que comprende ADN que tiene por lo menos un 85% de identidad en la secuencia con (a) la secuencia de ácidos nucleicos 1-783 de la SEC ID No. 4.

4. Ácido nucleico según la reivindicación 1 parte (iii), que comprende ADN que codifica un polipéptido del clon 65 de ratón que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 261 de la SEC ID No. 6.

30 5. Ácido nucleico según la reivindicación 1 parte (i), que se hibrida bajo condiciones astringentes con el complemento de ácidos nucleicos 229-1002 de la SEC ID No. 1.

35 6. Ácido nucleico aislado que comprende ADN que es el complemento de la secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

8. Célula huésped cultivada que comprende el vector según la reivindicación 7.

40 9. Proceso para producir un polipéptido del clon 65 que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 8, bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido del clon 65 y recuperar el polipéptido del clon 65 del cultivo celular.

45 10. Polipéptido del clon 65 aislado codificado por el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Polipéptido según la reivindicación 10 que es un polipéptido del clon 65 humano o del clon 65 de ratón.

50 12. Molécula quimérica que comprende un polipéptido del clon 65 según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.

13. Molécula quimérica según la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una secuencia de etiqueta epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

55 14. Anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del clon 65 según la reivindicación 10 u 11.

15. Anticuerpo según la reivindicación 14, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

16. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 10 u 11 y un portador para el mismo.

60 17. Composición que comprende un antagonista para el polipéptido según la reivindicación 10 u 11 y un portador para el mismo, en la que dicho antagonista es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido del clon 65.

65 18. Método de identificación de un compuesto que se une a un polipéptido según la reivindicación 10 u 11, comprendiendo el método el contacto del polipéptido con un compuesto de prueba y la determinación del grado de unión.

1 ATGGCCCCG ACAAAGCCG GCCGGCCGT CCGGCCCGT GCGAGCCGC CGGGGGCCG CCGGTACCGC CTGCCGAGA GCGGGGGGG GCGGGGGCG
 TACCGGGCG TCGTTCGGC CGGCCGGAC GGGGGGGCG CGCTCGGCG GCGCCGGCG GAGCGCTCT CGGCCCGCC CGCCCCCGG
 1 M A P Q Q G R P A L P A R C E P P A A P P V P P R R E R G R G A R
 101 GCGGCCCG GGTGTCGGG GGTGCGGGC GCGGGGGCG GCGGAGGA GCGGGGTA AGTGGTGT GTGCGGAC GCGCGGTG GCAAGACCAG
 CGCCGGGCC CCACAGGCC CCAGCCCCG CGGCCCGC GCGCTCCCT GCGCCGAGT TCACGCACGA CCAGCCGTG CCGCGCCAC CGTTCGTGC
 35 G P G V S G G R G R A G G A E G R G V K C V L V G D G A V G K T S
 201 CCTGGTGT ACCTACCA CTAACGGTA CCCCACCGA TACATCCCTA CCGCTTCTG CAACTTCTG GCGTGGTGT CTGTAGATG GCGGCCGTGT
 GGACCACCAG TCGATGTGT GATTGCCAT GGGGTGGCT CACTCAAAC TGTTGACTC CCGGAGGT GCCGAGGT GTTGAAGAGC CGGCACCACA GACATCTACC CGCCGGACAC
 68 L V V S Y T T N G Y P T E Y I P T A F D N F S A V V S V D G R P V
 301 AGACTCCAG TCTGTGAC TGCAGGAC GATGATTTG ACRAAGTGG GCCCCTCTG TACACCAACA CAGACATCTT CCTGCTGTG TTCAGCGTGG
 TCTGAGTGC AGACACTGT ACGTCTGT CTACTCAAC TGTTGACTC CCGGAGAGC ATGTGGTGT GTCTGTAGAA GGACGACAGC AAGTCGACCC
 101 R L Q L C D T A G Q D E F D K L R P L C Y T N T D I F L L C F S V V
 401 TGAGCCCCC ATCTTCCAG AACGTGGGG AGAAGTGGT TCCAGAGATT CGACGTCACT GCCCAAGGC CCCCATCAT CTGGTCGGG CACAGTCGGA
 ACTCGGGTG TAGGAAGTC TTGCACCCG TCITCACCCA AGTCTCTAA GCTGCAGTGA CCGGTTTCCG GGGGTAGTAG GACCAGCCCT GTGTACGCC
 135 S P T S F Q N V G E K W V P E I R R H C P K A P I I L V G T Q S D
 501 CCTCAGGAG GAGTCAAAG TGCTCATAGA ACTGGACAAG TGCAAAAGA AGCCGTGTC TGAAGAGGC GCGAAGCTGT GCGGGGGA AGTCAAAGCT
 GGAGTCCCTC CTGCAGTTC ACGAGTATCT TGACCTGTTG AGTCTTCTT ACCTTCTCT TCGGCCACGG ACTTCTCCG CCGTTCGACA CCGCCCTCT TCAGTTTCCA
 168 L R E D V K V L I E L D K C K E K P V P E E A A K L C A E E V K A
 601 GTCTCTACA TCGAGTCTC AGCTTGTACT CAGAAAACC TCAAAAGAGT TTTCGACGCC GCCATTTGT CTGGTATCCA GCACTCAGAC TCCCAGCTAC
 CAGAGGATGT AGCTCACGAG TCGCAACTGA GTCTTTTGG AGTCTTCTT CAAAGCTGGG CGGTAACAAC GACCATAGT CGTGAGTCTG AGGTCGATG
 201 V S Y I E C S A L T Q K N L K E V F D A A I V A G I Q H S D S Q L Q
 701 AGCCAAAGA GTCTAAAAGC AGGACCCCG ATAAAGTGG GGACCTGTCC AAGTCTTGGT GGAGGAAGTA TTGCTGCCG GCCTGACTCT CGCAATAGC
 TCGTCTCTT CAGATTTTC TCCTGGGCC TATTCCACGC CCTGGACAGG TTCAGAACCA CCTCTTCT AAGCAGCAGC CCGACTGAGA GCGTTTATCG
 235 P K K S K S R T P D K V R D L S K S W W R K Y C C L A O
 801 AGGTGTTTAA GCTGCAACAG CTCTTTATG ACAGGCTGT CATAGGATGA GCCCAAGC ACCCTTCTT GCCCTTAACT TCCTGTGTG GGGAGCTTAG
 TCCACAAAT CGACGTTGC GAGAAATACC TGCTCCGACA GTATCTACT CCGGGTTCG TGGGAGAAGA CCGGAATGA AGGACACAG CCGTCCGAATC
 901 GGCTGAGATT CATATGAAA ATACGTTTTT TTAATAATTG AAAGTACAT TTTTTTCTG TTAAGTCTG AAGCTTTCAG CTGTAGACCT CCGGATTAAT
 CCGACTCTAA GTATACGTTT TATGCAAAA AATTTTTAAC TTTCAANTGA AAAAAAGC AATTCAGACC TTCGAAACTC GACATCTGGA GGCCTAATTA

FIG.- 1A

1001 TTAATATCCA TATGAAAAGG GCTCTTCAAA GCGGGGTGC AGCATGAAGT TCTGCTGTGT TGTACAGGAC AAAGAGAAT GAATGGGACC TTCTCCCTGAT
 AATAAAGGT ATACTTTTCC CGAGAAGTTT CGCCCCACAG TCGTACTTCA AGACACACA ACATGTCCTG TTTCCTCTTA CTTACCCCTGG AAGAGGACTA

 1101 TAAGGGCTAC TGAGGGCTCA GTGCAGGCA CGTGTGCACC AGGCTTGGTG AGAGTGAGCA AGCGTGAGCT TTGAAACCAC ACGAGCCACC CCCGGTTTTG
 ATTCCCGATG ACTCCCGAGT CACGTCCCGT GCACACGTGG TCCGAACCAC TCTCACTCGT TCGCACTCGA AACITTTGGTG TCGTCGGTGG GGGCCAAAAC

 1201 TAAGGGCAAA GATCTGAAC CAGCAAGGC CTTCTGCTTA CGAAACCTCG AGCCCATCCC TTCTGTTTTAC TCAGATCTC TTAGGATTTT AAACAACCA
 ATTTCCCGTT CTAGACTTTG GTCGTTCCCG GAAGACGAAT GCTTTGGAGC TCGGATAGG AAGACAAATG AGTCTAAGAG AATCCATAAA TTTTGTGGT

 1301 AACATCCCAC AGCCTACTGG CATAGTGTG GCGAACAGTG CACTTGTCTG TTACGGTTTTT GTTTTTTTTT TTTAAATCAC GTGACCAGTT ATATTGCTAT
 TTGTAGGGTG TCGGATGACC GTATCACAAC CGTTGTCCAC GTGAACGAAC AATCCAAAA CAAAACAAAA AAATTTAGTG CACTGGTCAA TATAACGATA

 1401 GAAAATGGTG GAGATGCCTC GTAGAAGCG AGTGTGGG GCACATGTGA CAITTTCTTC AGGGAGCGAC TCAIGGTGAG ACCAGAGAGG GCTCTTAGCT
 CTTTACCAC CTC'TACGGAG CATCTCCCG CATCTCCCG TCACGACCCA CGTGTACACT GTAAAAGAAG TCCCCTCGCTG AGTACCACTC TGGTCTCTCC CGAGAAATCGA

 1501 TGCAGGACTG GCTTCTGCAG GGCATCTGTG TCCTGTCTGT AAAAGCAGGA GGAGGTGCTT GTCTGGGAGC TTTAAGTGTG CTGGGCTCAT ATCGTCCCGT
 ACCTCCTGAC CGAAGACGTC CCGTAGACAC AGGACGACAA TTTTCTGCTT CTTCCACGAA CAGACCCCTG AAATTCACAC GACCCGAGTA TAGCAGGGCA

 1601 TTGCAAGGAA TTGGGCCACC TTGAGAGCC ATAGTTGATG GCTATGGGAC ACACACACAC TTTTCTCTTA AGTCCACCAA AATGCCTGCC TGTACACACA
 AACGTTCCCT AACCCGGTGG AACTCTCCGG TATCAACTAC CGATACCCTG TGTGTGTGTG AAAAAGGAAT TCAGTGTGTT TTACGGGACCG ACATGTGTGT

 1701 CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACTGTGCTT GGTTTGTGTA TGGAAACCCTT AGACCACCTT CCCACCCCA AGCAJGGCTG
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT CCAACCGACT ACCTTGGGAA TCTGGTGGGA GGGTGGGGT GGGGAGGGGT TCGTACCAGC

 1801 CAAGTGTGAG GGCACCACAC CTTCTCTCTC TTGACATTTT TTGAAACAGA CATCATTTTG TAGGATCTTA ATTATACAT TTTTTTCAGG TCATAAAATG
 GTTACACAGTC CCGTGGTGTG GAAGGAGAAG AACTGTAAAG AAAC'TTGTCT GTAGTAAAAC ATCCTAGAAAT TAAAPATGTA AAAAAAGTCC AGTATTTTAC

 1901 TGGGATGAAC ATACTTTTGA CCCCAGTCC TTCCAGGTCC ATTGACTAGG GAGGCACTGT CTTAGGGGAC AGGTATGTGC AAGGCCCTTAC CCACCAGTGG
 ACCCTACTTG TATGAAACTT GGGGTACCG AAGTCCCAGG TAACTGATCC CTCCGTGACA GAATCCCTG TCCATACACG TTCCGGAAATG GGTGTCACC

 2001 CTTCTCGCTG CAGGTCAATG TTGTGGCACT TGTCTTTTAA GGTGAGGTC TTATGACCGA CTGTTCTGAG ACAGCCCTGT GTCAGGCAAG CTC'TTTCACA
 GAAGAGCGAC GTCCAGTACA AACACCGTGA AACACCGTGA ACAAGAAAT CCAC'TCCAG AATACTGGCT GACAAGACTC TGTGGGACA CAGTCCGTTT GAGAAATGT

 2101 GGGTGTAGG TATTTCCAAAG ACGCATAGG AACAGACAG TGAATCATAG CTATCAGTTT GCTGTGGCA AGAACCTCT TTTTGGCCAC CTGGTAAACA
 CCCAACATCC ATAAAGTTT TCGGATATCC TTGGTCTGTC ACTTAGTATC GATAGTCAA CGACACCGT TCCTTGGAGA AAACCCGTTG GACCATTTGT

 2201 AATTTTATGT CTGTAATTT TTTCTTGCTA TTTAAAAAAA AAAAAAAA A
 TTTAAATACA GACATTTTAA AAGAACGAT AAATTTTTTT TTTTTTTTTT T

FIG. 1B

1 CCCACGGCTC CGCTGAATGT ATGTTGGTTA GAAAGTAGCC TTTCTGCTTC CTGCCATGG CCAGTCTCC ACCCTCTCTT TGGTGTCTTT TGTGGGGAGG
 GGGTGGCAG GCGACTTACA TACAACCAAT CTTTCATCGG AAGACGAAG GACGGTACC GGTCAAGAGG TGGGAGAGAA ACCACAAGAA ACACCCCTCC
 101 GCACCTGTGGT TTGTTCGCAGC CCTGGACTTC GAGAGCTCC CAGAACCCAG GATCAGCAGC CTCCTGTCTG TTTGTCTCAC TCCTTTCCCA GGGAGGACTT
 CGTGACACCA AACAGCGTGC GGACCTGAAG CTCCTCCGAGG GTCTTGGGTC CTAGTGGTCC GAGGACAGAC AAACGGAAGTG AGGAAAGGGT CCTCTCCTGAA
 201 GGGACTGTCC TGTCTGACAG GACGGATCTG AGTCCCGGAA GCAAAACCAGC TCACCACATA GATAGCTAGT TTAACAATAG TTTTAAATA AGGCACCTC
 CCTTGACAGG ACAGACTGTC CTGCCTAGAC TCARAGGCTT CGTTGGTCC AGTGTGTAT CTATCGATCA AATTTGTAC AAAATTTTAT TCCCGTGGAG
 301 TGTTCAAAA GTGACATCTG CTGTGTTGTT TTCAGGCCCT GATCTCTTA CAAGTTTGA AAAAAATGT GTGTATCCAT TCATGGGCTT GGTAGCCTTC
 ACAAAAGTTT CACTGTAGAC GACACAACAA AAGCTCCGGA CTATGAGAAAT GTTCCAAACT TTTTATTACA CACAFAGGTA AGTACCAGAA CCATCGGAAG
 401 TGGTCACCTC AGTCTGTGG CTCCTAACTT ATTCGCCAAC AATATTCATT TCCCCTCAGC TACAAATGANT TGCAAGCAAA AGATGTTGAA AAAAAAGCACT
 ACCAGTGGAG TCAGGACACC GAGAAATGAA TAACGGGTTG TTAATAAGTAA AGGGAGTCC ATGTTACTTA ACGTTCGTTT TCTACRACTT TTTTTCGTGA
 501 AATTTAGTTT AAAATGTCC TTTTGGTTT TTAATCTACA AAAACCATGA AGTCTCTCT CTCTCTCTA GTTGTAAAT CAGATTATGT
 TTAATCAAAA TTTTACAGTG AAAAACCAAA AATAAGATGT TTTTGGTACT TCAAGAGAGA GAGAGAGAA CNACAAATTA GTCTAATACA
 601 TCTTTTMTG TTTTGTMTT TAGTGATCA TGTATTATCAG CAGAGTGGAG TTTAAACAATC CTAGCTTAA AAAAAACCTA TTTAATGTAA GATATCTAC
 AGAAAAAAC AAAAAACAAA ATCACTAAGT ACAATACTC GTCTCACCTC AAATGTTAG GATCGAAAT TTTTMTGGAT AAATFACATT CTATAAGATG
 701 GCATCCTTCA GATATTTTGT AATCCCTTA TGGCTTTAG TCTGTACTTT TAATGPACAT ATTTCTGTCT TGTGTGATTT GTAGATTTCA CTGGTTAAA
 CGTAGGAAGT CTATAAAACA TATAGGGGAT ACCGAAATC AGACATGAAA ATTACATGTA TAAAGACAGA ACACACTAAA CATCTAAAGT GACCAATTTT
 801 GAGAGAACAT TGAAGGCTT ATGCCAAGTG GAAGATAGAA TATAAATAA AAATGTTACT TGTATATTGG TAAGAGGTTT CAGTGTCTC TCAGCTAAT
 CTCCTTTGTA ACTTCCGAA TACGGTTCAC CTCTATCTT ATATTTTATT TTTACAATGA ACATATAACC ATTTCCAAA GTCAACAGGA AGTCGATPAA
 901 CATGTAGAGA AATATTTTAG TTGAAGCCAC AAGACACAGC TTAGGCGAGT TATGTGTTCA AATAACAGAA GAACAGACTT TTTTMTTTT TTAACCACAA
 GTACATCTCT TTATAAAATC AACTTCGGTG TTCCTGTGTC AATCCCGTCA ATACAAAGT TTAATGTCTT CTCTCTGAA AAAAAAAA AATTTGTTTT
 1001 CCCAAACTGT TGGAAACCT CAATAGAGCT CTATATGTAT TGGAAACAAA GTGGAATCT CTCTCTCTAT ATATGTTCTC TCAAAAAGAG AGAGAGAATC
 GGGTTTGACA ACCCTTTGGA GTTATCTCGA GATATACATA ACCTTGTTTT CACCTTAA GAAGAGGATA TATACAAGGA AGTTTTCTC TCTCTCTAG
 1101 AAGCAGATGG CTTAAAGCTG GTCACAGGAT TGCTCACATT CTTTGGCAT TATGCATCGG ACTTAATGT TTGAGAGTGT GTTCTATTG TAACATCCCA
 TTCGTCTACC GAAATTCGAC CAGTGTCCCTA ACCAGTGTA GAAAACCGTA ATACGTACGC TGAATTAACA AACTCTACA CAACGATAAC ATTTGTAGGT

FIG. 2A

1201 GAGATGAATC AAAAAGGCTC ACCCTCTCAC CCAGGAGCAG CTTTTCAGCT TATATACACA TGCATGTACA TGTGTGTGAT ATGCATGTGT GCATGCATGT
 CTCTACTTAG TTTTTCGGAG TGGGAGAGTG GGTCTCTCGTC GAAAAGTCGA ATATATGTGT ACGTACATGT ACACACACTA TAGGTACACA CGTACGTACA
 1301 TTCTATTTTT GTGCTTGCCA CTATAACTAT TGCACCTCTC TATTCGGTIT GACTGAAGAG GGGTCTTTGG GGACATCTCT GTGTCCCAGT CTTTATJGGGA
 AACATAAAAA CACGAACGGT GATATTGATA ACGTGGAGAG ATAAGCCAAA CTGACTTCTC CCCAGAACAC CCTGTAGAGA CACAGGGTCA GAAATACCCCT
 1401 AGAAAGCAAG GGTCTGCAGA GAACAGGAAC TAAAGAAACC CTGTGTGATG TCGAATTAAT AGAAGGCCCT CTGCTTTCCTG GAAATGTAGA CCAGAATCTG
 TCTTTCCGTTT CCAGACGCTCT CTTGTCCCTTG ATTTCTTAGG GACACACTAC ACGTAAATTA TCTTCCGGAG GACGAAAGAC CTTTACATCT GGTCTTAGAC
 1501 GCCAGGACTG TAGACTGATA CATATCTGG TCCTTTGCGT TTTTCTTTTC CCTCCCTGCC CCTCCCTTATG GATAACCTTG TAAACATATTG
 CCGTCTCTGAC ATCTGACTAT GTAATAGACC AGGAAACGGA AAAAGAAAAG GGAGGGGAGG AACGAAATAC CTATTGGAAAC ATTGTATAAC
 1601 AAACCTTTAA AGGAAACCAA GAATGCATTA TTACACACAC ACACACACAC ACACACACTA CAGTAGACCA ACATATAGAG
 TTTGGAAATT TCCTTTGGTT CTTACGTAAT AATGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
 1701 TGTTTAAAAAT AGCTTTTCTG GGCAAATTCA AACAACTTGT GGCCTCTAGGA CCGACATCTG TTTCCGTTTT TCTTCAGTTG TATATTGACC AGTATTCTTT
 ACAAAATTTA TCGAAAAGAC CCGTTTAAAT TTTGTGAACA CCGAGATCCT GCGTGTAGAC AAAGGCAAAA AGAAGTCAAC ATATRACTCG TCAATAGAAA
 1801 ATTCGTAAAA CATATACTCG GGTAGCAAT GTCAGCATCT TTTCCCTTCC CATTCTGGAG AGCATTCAAG ACCTTCCCAG TACAGGAACA TCAATGAAGC
 TAACGATTTT GTATATGAGC CCCATCGTTA CAGTGTGATA AAAGGAAAGG GTAGACCTC TCGTAAAGTTC TGGAAAGGTC ATGTCTTTGT AGTTACTTTCG
 1901 ATTTATATAC AGCGGTGGC AAGCAGAACC ACATCCAAAA TGSTCAGTGT CCGGCTCTAG GGCAGGCTA TCTTGTTCCTA GTCTCTTTTC TTTGTGCTCC
 TAAATATATG TCCGCCACCG TTCGTCTTGG TGTAGTTTT ACCACTCACA GCCCGAGATC CCGTCCGAT AGAACAAGST CAGGACAAAAG AAACACGAGG
 2001 TGACCTTTGG GGCCTGCCACT TCCCAGGACG ACCACTGCCT GCCACACTG TCCCCCTCCCTC CCCCCTGGGG GATTTTCCCA ATAGCCAGTT CCCATGTGTC
 ACTGGAAAAC CCGACCGTGA AGGTCTCTGC TGGTGTGAC CCGGTGTGAC AGGGGGGGAG GGGGGGGCCC CTAANAAGGT TATCGGTCAA GGGTACACAG
 2101 TTTTCTGCA AGGTAATCA AGCCAAATGGA ACCTTCAGAT AGGGCCCAAG AGCAGGATGA CACAACCTGT GGACAAGAGC TATATTAACT TGATCACTAG
 AAAAAGACGT TGCCATAAGT TCGGTTACCT TGGAAATCTA TCCCGGTTTC TCGTCTACT GTGTGGACA CCTGTCTCAG ATATAATTGA ACTAGTGATC
 2201 TATGAGCTAA TATTACATG ATCACCATG AAAGGCCCT GCAAGAGCTG TTTAGTCTGA AATATAGGTA GAGAGCGGG ATGGCAAGGT TGCTTGTAAAC
 ATACTCGATT ATAAATGTAC TAGTGGGTAC TTTCCCGGGA CGTTCTGAC AAATCAGACT TTATATCCAT CTCTCGCCCC TACCGTTCCA ACGAACAATTG
 2301 TTCTGGTACA TGTTGATGC ACACACGCAT GGAGGCAAGC TCTAAATCAC TCGTAAAGCA TACTTTAAA ATATTTATTG TTTTGAAGAAG
 AAGACCATGT ACMACTTACC TGTGTGCGTA CCTCCGTTCC AGATTTAGTG ACGTGACAAT GACATTTCTG ATGAAATTTT TATAAATAAC AAAACTTTTC

FIG.-2B

2401 CATTTCCTAG TCTTCCCTCT CTTGGTGGAG CTGTAAACAA GATGGCATGT TGTGAAGGTT CAAGATGATT TTTTTTAAA TCGCAGAAC ATTTAGACAC
 GTAAAAGATC AGAAGGGAGA GAACCCACCTC GACATTTGTT CTACCCGTACA ACACTTCCAA GTTCTACTAA AAAAAAATTT AGCGTCTTTG TAAATCTGTG

2501 CTAAGAACTA AAACHTATAA AAGGGATCTT TGAATTTGCC TGTTAACATG GATTAATGTT TACACTTACA GCTGATGATT GGACGGTGT TTATGTTAGG
 GATTCCTTGAT TTTGAATATT TTCCCTAGAA ACTTAAACGG ACNATTTGAC CTAATTACAA ATGTGAATGT CGACTACTAA CCTGCCACAA AATACAATCC

2601 GAAATGCCTT GTTAACGAACTA TCCATGAAAGC AGATGTAATT AAAGTTGAT GTGAGCCAA CTAGAAGGTT GAACAGTGT TTCAAAAGAAC GGAGAGACTT
 CTTTACGGAA CAATTCCTTG AGTACTTCG TCTACATTA TTTCCAACTA CACTCGGTTA GATCTCCAA CTGTGCACAA AAGTTCTTTG CCTCTCTGAA

2701 ACATTTTAGA CCAATCTTTA TACATTTTGC TGAGCTAGAA AGGAGATAA GATTATTTAT TTTTGTTCAT ATCTTGACT TTTCTATTAA AATCATTTTA
 TGTAAAATCT GGTTAGAAAT ATGTAAAACG ACCTCGATCTT TCCCTATT CTAAATAATA AAAACAAGTA TAGAACATGA AAAGATAATT TTAGTAAAAAT

2801 TGAANWMAA AAAAAAATAA AA
 ACTTWWKKT TTTTTTTTTT TT

FIG._2C

CCCACGCGTCCGCATATGTCTCCTTTGTGAGGATCAACAGCTCGCTGGCAGTGGCGGCTT
ACGAGGATGGGATCCTTAACATTTGGGACCTGAGAACCGGAAGGTTCCCTATCTTTCGTT
TTGAGCATGACGCAAGAATACAAGCCCTTGGCGCTGAGCCAAGAAAAGCCATTGTTGCCA
CGGCTTCTGCTTTGACGTTGTGATGTTGTACCCCAACGAGGAGGGGCATTGGCATGTGG
CCTCGGAGTTTGAAGTTCAGAAGCTGGTTGACTACCTTGAAATAGTCCGAATACTGGGA
GGTACCCTGTGGCAATAGCCACAGCCGGGGATCTGGTGTACCTGCTGAAGGCCGACGACT
CAGCCAGAACCCTTCATTATGTCAATGGCCAGCCTGCCACATGTCTGGATGTCTCAGCCA
GCCAGTTGCCTTTGGAGTGAAGAGTCTAGGATGGGTGTATGAAGGAAACAAGATCCTGG
TGTACAGCCTGGAAGCAGAGCGCTGCCTCTCGAAGCTGGGCAATGCACTTGGAGACTTTA
CCTGTGTCAACATCCGGGATAGCCCTCCCAACCTCATGGTCAGCGGCAACATGGACAGGA
GAGTGAGGATTCATGACCTCCGCAGCGATAAGATCGCCCTGTCGCTGTCTGCCCATCAGC
TGGGGGTGTCCGCAATTCCAAATGGATAACTGGAAAGGTTGTCAGTGGAGGCCAGGAGGG
GTGGTGT

FIG._3

1 CCCACGGCT CGCATATGTC TCCTTTGGA GGATCAACAG CTCGCTGGCA GTGGCGGCTT ACGAGGATGG GATCCITTAAC ATTTGGGACC TGAGAACCCGG
 GGGTGGCAG GCGTATACAG AGGAAACACT CCTAGTTGTC GAGCGACCGT CACCGCCGAA TGCTCCTACC CTAGGAATTTG TAAACCCCTGG ACTCTTGGCC

 101 AAGGTTCCCT ATCTTTCGTT TTGAGCATGA CGCAAGAATA CAAGCCCTTG CGCTGAGCCA AGAAAAGCCC ATTGTTGCCA CGGCTTCTGC TTTTGACGTT
 TTCCAAGGSA TAGAAGCAA AACTCGTACT GCGTTCCTAT GTTCGGGAAC GCGACTCGGT TCTTTTTCGGG TAACAACGGT GCCGAAGACG AAAACTGCAA

 201 GTGATGTTGT ACCCCAACGA GGAGGGGAT TGGCATGTGG CCTCGGAGTT TGAAGTTCAG AAGCTGGTTG ACTACCTTGA ANTAGTTCCG AATACTGGGA
 CACTACAACA TGGGGTTGCT CCTCCCCGTA ACCGTACACC GGAGCCTCAA ACTTCAAGTC TTGACCAAC TGATGGAAC TTTATCAAGC TTATGACCCT

 301 GGTACCTGT GGCAATAGCC ACAGCCGGG ATCTGGTGA CCTGCTGAAG GCCGACGACT CAGCCAGAAC CCTTCAJTTAT GTCAATGGCC AGCCTGCCAC
 CCATGGGACA CCGTTATCGG TGTCGGCCCC TAGACCACAT GGACGACTTC CCGCTGCTGA GTCGGTCTTG GGAAGTAATA CAGTTACCCG TCGGACGGTG

 401 ATGTCTGGAT GTCTCAGCCA GCCAGGTTGC CTTTGGAGTG AAGAGTCTAG GATGGTGA TGAAGGAAAC AAGATCCTGG TGTACAGCCT GGAAGCAGAG
 TACAGACCTA CAGAGTCGGT CCGTCCAACG GAAACCTCAC TTCTCAGATC CTACCCACAT ACTTCCITTTG TTCTAGGACC ACATGTCCGA CCTTCGTCTC

 501 CGCTGCCCTC CGAAGCTGG CAATGCACIT GGAGACTTTA CCTGTGTCAA CATCCGGAT AGCCCTCCCA ACCTCATGGT CAGCGGCAAC ATGGACAGGA
 GCGACGGAGA GCTTCGACCC GTTACGTGAA CCTCTGAAAT GGACACAGTT GTAGGCCCTA TCGGGAGGT TGGAGTACCA GTCGCCGTTG TACCTGTCTC

 601 GAGTGAGGAT CCATGACCTC CGCAGCGATA AGATCGCCCT GTGCTGTCT GCGCATCAGC TGGGGGTGC CGCAGTCCAG ATGGATGACT GGAAGGTTGT
 CTCACTCCCTA GGTACTGGAG GCGTCGCTAT TCTAGCGGGA CAGCGACAGA CCGGTAGTGC ACCCCACAG GCGTCAAGTC TACCTACTGA CTTTCCAACA

 701 CAGTGGAGG GAGGAGGGC TGGTGTCTGT GTGGATTAC CGCATGAACC AGAAGCTGTG GBAAGTGCAC TCCAGGCACC CTGTGGCTA TCTCTCCTTC
 GTCACCTCCG CTCCCTCCCG ACCACAGACA CACCCTAATG GCSTACTTGG TCTTTCGACAC CCTTTCAGTG AGGTCCGTTG GACACCGCAT AGAGAGGAAG

 801 AATAGCCACA GCCTCATCAC TGCCAAACGTG CCCTACGAGA AGTGCCTGCG AAACCTCCGAC CTCGACAAC TFGCCCTGCA CAGGAGACAT CGTGGCCTGA
 TTATCGGTGT CCGAGTAGTG ACGGTTGCAC GGGATGCTCT TCCACGACGC TTTGAGGCTG GAGCTGTTGA AACGGACAGT GTCTCTCTGA GCACCCGACT

 901 TCCATGCCCTA TGAATTTGCT GTGACCAGC CACCTGGTCC ACCGAAAGT CTCGGGGAA GGACAGACGG CGAATGGGC ACTGTAGTAC CGACCTATGT CGATACTGGA
 AGGTACGGAT ACTTAAACGA CACTGGTCC GTGACCCCTT CCTGTCTGCC GCTTACCCCG TGACATCATG GCTGGATACA GCTATGACCT

 1001 CGCACTGTCT TTCCCCCATG ACAGTATTTA GGTGTACAC TCATGTAGAC GTGGAAGGG CAGTTTACA AATGTTAGAG TTGGAGAGAG GCTCTGCAGC
 GCGTGACAGA AAGGGGTAC TGTATTAANT CCCACAGTGG AGTACATCTG CACTTTTCCC GTCAAAATGT TTACAATCTC AACCTCTCTC CGAGACGTGC

 1101 ACATGGTGG AGTTTGGGA CAGTGTCTCT TATGACTGTG GCCACACAGC CCTGTGCCC TGTTACAGAAC CAGACTCCAT TGCTGCCCTT CTCTCTCTCC
 TGTACCACCC TCAAAACCCCT GTACACAGGAC ATACTGACAC CCGTGTGTCG GGACAACGGG ACATGTCTTG GTCTGAGSTA ACGACGGAAA GAGGAGGAGG

FIG.- 4A

1201 TCCTCCTCCT CAGGCTTTGG TAGGACTGGC TGATGACTCA GAGTTAACCT TTCAGGGGT GGCTCCTCCC CCTCAGCCTA TGGCAGCAGT GACACCCCCC
 AGGAGGAGGA GTCCGAAACC ATCCTGACCG ACTACTGAGT CTCAAATTGGA AAGGTCCCA CCGAGGAGG GGAGTCGGAT ACCGTGCTCA CTGTGGGGG
 1301 CTCGTTCCAT AGCCAGGGA CACAGGECT TCACATTGCAC TGTCTCCTGG TGTCTCCTGG GAGGTGGAA CCAGAAATCTC ACACGCATAG GCAAGCGTCA
 GAGCAAGGTA TCCGGTCCCT GTGTCCCGGA AGTGAACGTG ACAGAGGACC CACACCACGA CTCGCCACTT GGTCTTAGAG TGTCCGTATC CGTTCGCCAGT
 1401 GCCTCCAAGC TGCTTCCCA GCTGTACGC TCCCAGCTG TCTCTCCAG GCACCTCCA GTGCAGCCC TCCTCTGGGA TTCACACCCGT TGATAATTAT
 CGGAGGTTCC ACAGAGGGGT CGACAGTCCG AGGGGTCCG AGAGGAGGTC CAGTCCGGG AGGAGACCCCT AAGTGTGGCA ACTATTATAA
 1501 AGGGCCACT TACTGTAGG AGCTGTCTG TCCTGTACAT GTGCTATGAA GGAGACAGCC ATCCTTCCCTG CAGAGGAAA GGTTCATTGC ACAGGGATAG
 TCCCGGTGGA ATGGACATCC TCGACAAGAC AGGACATGTA CAGGATACTT CCTCTGTCCG TAGGAAGGAC GTCTCCTTTT CCCAGTAACG TGTCCCTATC
 1601 GGTCAAGTCTC CAAGCCTAGC CCGTGGTGC AGCTCTTCAG AATCCCCACA GACCAGGCAC CTAACACACC TGCACAGAG CCACCAGGTC TCAGGAGACA AAGTTCCTCT
 ACCGGTCCTC TGGTCAAGT TCGAGAAGTC TTAGGGGTGT CTGCTCCGTG GATTGTGTGG ACGTGTCTCC GGTGGTCCAG AGTCTCTGTG TTCAAGGAGA
 1801 CCCAGGGAAT ACCAGCTCAA AAAACAAGTG GGCTGGCAA CTTCCACATTG GGTCTGCCGA GAGCAAGRAA AAAGAGGGG GTGGGGGAGC TCCATGGGGT
 GGGTCCCTTA TGGTCCAGTT TTTTGTTCAC CCGACCGTTT GAGGTGTAAC CCAGACGCTT CTCGTTCTTT TTTCTCCCC CAGCCCTCCG AGGTACCCCA
 1901 GGATCCCAGG CTGGCAGCAG GAAGGTGCTG GAAGGCCCTGA GAGGTGTGC AGTCCCTCC CCGAGCCCTG GTGGTCTCCT CTTGTGTGCT GGGATGGAGT
 CCTAGGGTCC GACCCCTCCT CTTCCACGAC CTTCCGGACT CTTCCACAGG GCCTTCCCC ATGCACAAGT GCCCAGGGGA GCTCACCTCC CTCCTTGTCTGG GCTGGCGCCC
 2001 CTAGTGGGTT TGTGGCATGA TCTCAGATCT TGGCATGAG GCCTTCCCC ATGCACAAGT GCCCAGGGGA GCTCACCTCC CTCCTTGTCTGG GCTGGCGCCC
 GATCACCCAA ACACCGTACT AGAGTCTAGA ACCGTAACTC CCGAGAGGGG TACGTGTTCA CGGTCCCTT CGAGTGGAGG GAGAACGACC CGACCCGCGGG
 2101 CTTGCTGGCC TGGTCTTGT GTGTCTCTAC TCGAGCATTC CCAGTCTAA GCTGTCCACT GGAGACATTT CTGTCAAGGA AATTGGCTGT GCGGTCAAGT
 GGACGACCGG ACCAGAACGA CACAGGAGTG AGCTCGTAAG GGTCAAGGAT CGACAGGTGA CCTCTGTAAA GACAGTCTCT TTAACCGACA CGCCAGTCCA
 2201 CTTTCTGGG CTTCCAGCC ATGAAGGCC ACTGAAGAGC AGAGGTGACT AGAGTAGTTT CAAGCATACA TGCCCTTCTA GCCCCAAATC CCTGCCCCCT
 GGAAGACCC GAAGCGTCCG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG TACTTTCCGG
 2301 ACCCCACAG AGCATCTGC CTCGCTGGCT CTTGCCACTG CACCTGCTCC CAGGGTGGG GACAGGCTGG CTCCTGTGC TGCCTCTGAA GCCAGAAGAC
 TGGGGTGTG TCGTAGACAG GAGCGACCGA GGACGGTAC GTGGACGAGG GTCCACCCC CTGTCCGACC GAGGACACCG ACAGGACTT CCGTCTTCTG
 2401 ACCAGACAC AGCCCTGGGA GCCAGGGTG GTACACATC TGCAGCTTGC CTTTGTCTT AAGCGCCAC TTTCTGCTGT TTAATTAAAGG TTCTACACTG
 TGGTCTCTGT TCGGGACCT CCGTCCCCAC CAGTGTGTAG ACGTCAAGC GAAAACGGAA TTCGCCGGTG AAGACGAGAC AATAATTCTC AAGATGTGAC
 2501 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTT

FIG. 4B

1 CTCCAACAGC GCAGGGCAGA GCGGCTGGCG CCGCGGAGC GCGGAGCCAC GACCCCTCCT GGCCGCCCTT GTCTACTGGC CGTGCGGCCC GGAACCGCCA
 GAGGTTGTGC CGTCCCGTCT CCGCGACCGC GCGGCCCTCG CGCCTCGGTG CTGGGAGGGA CCGCGGAA CAGATGACCG GCACGCCGGG CCTTGGCGGT

 101 CTCTCCAGGG CCGGGGACGC GCCCGCAGCT GTCGGTGACA GCTCCTCCCT ACCGCAACC TCCGGGGCG AGGGCGGTG GGGCCGGGCC CTGCTAGCCC
 GAGAGTCCC GCGCCCTGCG CCGCGTCTGA CAGCACTGT CGAGGAGGGA TGGCGTTGG AGGCCCGCC TCCCGCCAG CCGCGCCCGG GACGATCGGG

 201 GCGACCGCA GCCCGCGCTC GCGGATCGAT GCCCGCGCAG CAGGGGACC CCGGTTCC CGACCGTGC GAGGCGCTC CGTGCCTGCC CGTCCGGAG
 CGCTGGCCTT CCGGCGCGAG CGCTAGCTA CCGGGGCTG GTCCCCCTGG GCGCAAGG GCTGGCGAG CTCCGGGAG GCCACGGCG CGCAGCCCTC
 M P P Q Q G D P A F P D R C E A P P V P P R R E

 301 CCGGTGGAC GCGGGGACG CCGGCTGGG GAGCGGGGG GCGGGGGGT TCGGGGGG CCGGGGTCAA GTCCGTGCTG GTCGGCGACG
 GCGCCACCTG CCGCCCTGCG GCCCGACCC CTCGGGCCCC CCGCCCGCC CCGCTCCCG CCGCGCAGTT CACGCACGAC CAGCCGCTGC
 25 R G G R G G R G P G E P G G R A G G A E G R G V K C V L V G D G

 401 GCGCGTGGG CAAGACGAGC CTGTGGTGA GTTACACCAC CAACGGCTAC CCCACCGAGT ACATCCCTAC TGCCTTCGAC AACTTCTCCG CGGTGGTGTG
 CCGCCACCC GTTCTGCTCG GACCACCACT CAATGTGGTG GTTGCCGATG GGTGGCTCA TGTAGGATG ACGGAAGCTG TTGAAGAGGC GCCACCCACAG
 59 A V G K T S L V V S Y T T N G Y P T E Y I P T A F D N F S A V V S

 501 TGTGGATGG CCGCCCGTGA GACTCCAACT CTGTGACACT GCCGGACAGG ATGAATTTGA CAAGCTGAGG CCTCTCTGCT ACACCAACAC AGACATCTTC
 ACACCTACCC GCGGGCACT CTGAGTTGA GACACTGTA CCGCCTGTCC TACTTAACT GTTCGACTCC GGAGAGACGA TGTGGTTGTG TCTGTAGAAG
 92 V D G R P V R L Q L C D T A G Q D E F D K L R P L C Y T N T D I F

 601 CTGCTCTGCT TCAGTGTGT GAGCCCTCA TCCITCCAGA ACGTCAGTA GAATGGGTG CCGGAGATTG GATGCCACTG TCCCAAGCC CCCATCATCC
 GACGAGACGA AGTCACAGCA CTCGGGAGT AGGAAGTCT TGCAGTCACT CTTTACCCAC GGCTCTAAG CTACGGTGAC AGGTTTCGG GGTAGTAGG
 125 L L C F S V V S P S S F Q N V S E K W V P E I R C H C P K A P I I L

 701 TAGTTGGAAC GCAGTCGGAT CTCAGAGAAG ATGTCAAAGT CCTCAATTGAG TTGGACAAAT GCAAAAGAAA GCCAGTGCCT GAAGAGCGG CTAAGCTGTG
 ATCAACCTTG CGTCAGCCTA GAGTCTCTC TACAGTTCA GGAGTNACTC AACCTGTTA CGTTCTTTT CCGTCAAGGA CTTCTCCGCC GATTCGACAC
 159 V G T Q S D L R E D V K V L I E L D K C K E K P V P E E A A K L C

 801 CCGCGAGGAA ATCAAAGCCG CCTCTACAT CGAGTGTCA GCCTTGACTC AAAAAACCT CAAGAGGTC TTGTATGCAG CCAATCGTCC TGGCATTCAA
 GCGGCTCCTT TAGTTTCGGC GGAGGATGA GCTCACAAGT CCGAACTGAG TTTTTTGA GTTCTCCAG AACTACGTC GGTAGCAGCG ACCGTAAGTT
 192 A E E I K A A S Y I E C S A L T Q K N L K E V F D A A I V A G I Q

FIG. 5A

901 TACTCGGACA CTCAGCAACA GCCAAGAAG TCTAAAAGCA GGACTCCAGA TAAATGAAA AACCTCTCCA AGCTCTGGTG GAAGAAGTAC TGCTGTTTCC
 ATGAGCCTGT GAGTCGTGT CCGTTTCTTC AGATTTTCTC CTTGAGGTCT ATTTTACTTT TTGGAGAGGT TCAGGACCAC CTTCCTTCATG ACGACAAGC
 225 Y S D T Q Q Q P K K S K S R T P D K M K N L S K S W W K K Y C C F V
 1001 TATGATGCTG GCAAGACACC CAGAAAGGCT ATTTTTCAGAT GAAATCGATA TTAGAAGCTA TATTAGCTGA AACAACTCCT TTTACTGCGT AGAACCTATA
 ATACTACGAC CGTTCGTGG GTCTTCGGA TAAAAGTCTA CTTTAGCTAT AATCTCGAT AATCTCGACT TTGTTGAGGA AAATGACGCA TCCTTGGTAT
 259 O
 1101 TCGAGAGTGT GTGTATATGT ATTATAGGAG GAGCTCTCAA TTTTATGTAT TCTTCTGCCC TTTAATTTTC TTGTTTGTTC GAGCTTAGGG ATGAGATACT
 AGCTCTCACA CACATATACA TAAATATCCTC CTCGAGAGTT AAATACATA AGAAGACGG AAATTAAGA AACAAACAAA CTCGAATCCC TACTCTATGA
 1201 TATGCAAGAT ATTTTGAAG TAAATTAAC ATTTTTCACA TCTCTGAAA TTTAGAGTTC TAGACCTCTG GTTAATTTAT ATCTAATATG AAGAAGACAC
 ATACGTTCTA TAAAACTTC ATTTAATTTG TAAAAAGTGT AGAGACCTTT AAATCTCAAG ATCTGGAGAC CAATTAATA TAGATTATAC TTCTTCTGTG
 1301 CTCPTAATCTG GATGTTAAGA ATGAAGTCT GTPACATAT AATGPACAGA AGAGCAAAAG GGAGGAACAC TATGGTTAAC CCTCTCTTGA TTAAGGGCTA
 GAGATTAGAC CTACAATTCT TACTTCAAGA CGATGTAATA TTACATGTCT TCTCGTTTTC CCTCCTTGTG ATACCAATTTG GGAGAGAACT AATTCCEGAT
 1401 CTTAATGCAC AGTGCAATTAT GTACACAGGT CAACCATGTT AACAAATAGTT CTTAGCTTTG AAACCTCCATG CAACCCATGC CTTTTTTTTA AGGAGCAAAA
 GAATTACCTG TCACGTAATA CATGTGTCCA GTTGGTACCA TTGTTATCAA GAATCGAACC TTTGAGGTAC GTTTGGTACG GAAAAAAT TCCTCGTTTT
 1501 ATCTGAGAAA AAAAGTGAGA GACCTCTGCC TACAAAACCTT CAAAACAGTC ACTTTGTCA ATTGCTAATA CCCAGTTACT TATGATTTAA AAACAACCAA
 TAGACTCTTT TTTTCACTCT CTGGAGACGG ATGTTTGA AATGTTGCA GTTTGTCAG TGAACAAGT TAACGATTAAT GGGTCAATGA ATACTAAAT TTTGTTGGTT
 1601 CAGAAAACAT CCCACAGACT GTATGGCACT CTGTAGTCAA AAAAGGAAAC TTTCTTATTG GGACTTTTCT TCTTTAGTCC AGTTGTGTG ACACATATGA
 GTCTTTTGTG GGGTGTCTGA CATACCGTGA GACATCAGTT TTTTCCITTTG AAAGAATAAC CCTGNAAGA AAGAATCAGG TCAACACAAC TGTGTATACT
 1701 ACACAGACAA AGTGTATGC GGAGGAAAGC AAGTGTGGT CAGTAGTTTC ATGTTTTAGG GAGTGGTTC TGTGGAGATC AGAAAGTGAC ATTTGCTTTC
 TGTGTCGTGT TCACGATACG CCTCCTTTCG TTCACAACCA GTCATCAAAG TACAAAATCC CTCACCAAGG ACACCTCTAG TCTTTCACCTG TAAACGAAAG
 1801 GGTACTGTAA TACATGCACC AAACCTGCCTC AATCCTAGGT AACGAGGCA ACAGGGAGCA CTTGTCTGGA TTGTTTTAA ACCTCCATAC TCAAGCTGTG
 CCATGACATT ATGTACCTGG TTGACGGAG TTAGGATCCA TTGCTCCCTTGTCCCTCGT GGACAGACCT AACAAAAAT TGGAGGTATG AGTTCCGACAG
 1901 TCTTCGGCAG GGAGGTGAAT ACTCTTGAAA GSCCAACAGC AAGTGTGTTGT GGGACACAAC ACAGATAAT TTTTCTTAAG TCGACCAAGA TGTACTTCTC
 AGAAGCCGTC CCTCCACTTA TGAGAACTTT CCGGTTGTGG TTCAACAACA CCTGTGTTG TGTCTATTA AAARGAATTC AGCTGGTTCT ACATGAAGAG
 2001 TGTGTGCACA CCCATGCACA CTCATGCACA CAGATACATA GGTCTGTATG GCTGTATTTG CTGTTGATTC AGACTTTCAC ACCATTAATG GGGAAAAGCG
 ACACACGTGT GGGTACGTGT GATACGTGT GTCTATGTAT CCAGACATAC CGACATAAAC GACAACCTAAG TCTGAAAGTG TGTAAATAC CCCTTTTCCG

FIG. 5B

2101 TGGCCACAAA AACAGATGCT AGGAAGCTTG GCTTCCCTCTT CTTGTTGACC CTTTTTGGAA CCAACATCTT TTTTATATATA TTCAGAGTAT GTTTTTAAGT
 ACCGGTGTTF TTGTCTACGA TCCTTCGAAC CGAAGGAGAA GAACAACCTGG GAAAAAACTT GGTGTAGAA AAAATAATAT ATAGTCTATA CAAAAATCA

 2201 GTATCTTAAT ATATACATTT TTTAGGACAT CTTAATCTA AACAAAAAAT AAAATGAACA TCCTTTGAAA CCTGTAAAA CAACCAGTTA AAGCCACAGA
 CATAGAATTA TATATCTAAA AAATCCTGTA GAATTTAGAT TTGTTTTTA TTTTACTTGT AGAGAATTT GGACAATTTT GTTGGTCAAT TTCGGTGTCT

 2301 TGGCTTTCAG GGCAGTAGCA GCAGAGGCCA GTGGACTCTG AGGACTCCTG AGGGGGGGG CGGTAGCCA GCCAGGTGCA TGCCGGGACC ATGGCCCCCA
 ACCGAAAGTC CCGTCATCGT CGTCTCCGGT CACCTGAGAC TCCTGAGGAC TCCCCCGCCC GCACATCGGT CGGTCCACGT ACGGCCCTGG TACCGGGGGT

 2401 TACTTGGCTG CTTCCTGTGA CAGTGAATA CATCTTCAA GGTGGCAGCT GTTAGGGCTG AATCTTCTGG AGAAAAAGGT GCCATCTCAG GAGATAGCT
 ATGAACCCGAC GAAGGACACT GTCACCTTAT GTAGGAAGTT CCACCCGCGA CAATCCCGAC TTAGAAGACC TCCTTTTCCA CCGTAGAGTC CTCTTATCGA

 2501 TTTACTCTGG TAGGAATGCT TCCGAGACAC CACAAGGCAG CCTGAACACT CAGTTGCAGG GTCGGGCTTG CGGTGGGTGA CCCAGAGCCA CCAAGTCCAC
 AAATGAGACC ATCCTTACGA AGGCTCTGTG GGTCTCTGTC GACTCTGTGA GTCAACGTCC CAGCCCGAAC GCACCCCACT GGTCTCCGGT GGTTCAGTG

 2601 ATCCACAAC ATGAGGGAA ATCTGTAAAG CCAGTTAGAT AGAAGAGTTT TATTTTCTG TGGGTTTTGT GTGTCTTTT TTATGTTAAA AAGAAATCCA
 TAGGTGTTGA TTTACTCCCTT TAGACATTTT GGTCAATCTA TCCTTCTAAA ATAAAAGAC ACCCAAACA CAACAGAAA AATACAATTT TTTCTTAGGT

 2701 GTTTGTGTT TTCTATAGAA AAGTAAAAG ATCAGGTTAT ACTTAGGTT AGGGTCTA TTTATTCCTG TTAGTAAATA AAATTAACAA ATTTCTTTGT
 CAAACACAAA AAGATATCTT TTTCAATTTT TAGTCCAATA TGAATCCA TCCCCAAGAT AAATAAGGAC AATCATTTTAT TTTAATTTGT TAAAGAAA

 2801 TTAACAAAAG ATTAATCTTT AAACCACTAA AATACATAGA CTGATTGATT ATCAACACA TTGGAATTGA TGTGGTCTAT AGTTTCTTGA AGCATTTAGT
 AATTGTTTTT TAAATAGAAA TTTGGTGATT TATGTATCT GACTAACTAA TAAGTTGTGT AACCTTAACT ACAGCCAGTA TCAAAGGACT TCGTAAATCA

 2901 TACAACCTGA AGGAATAAAA TGAATTTGTT AAATGCTTAA AATAGACCTA ACTGAATACA GTCTCATCTT GCCCGGCTG GCTTACCTAT CTGTGAAAG
 ATGTTGGACT TCCTTATTTT ACTAAACACC TTTACGAAAT TTATCTGGAT TGACTTATGT CAGAGTAGAA CGGCGGGAC CGAATGGATA GACACCTTTT

 3001 CTAGGCTTCC CAGGTGGCT CTGCTGTCT GGTGCTTGA GGTGTGGAG GGAAGATGAG TTATTTAACT GGTAAAGGAT TTGAAACACT ATTTTATAT
 GATCCGNAAG GTCCACCCGA GACGGACAGA CCACGGACCT CCACACCTC CCTTCTACTC AATAAATGTA CCATTCGCTA AACTTTGTGA TAAAAATATA

 3101 TAAAGTAAAT GGCATGGAGT ATAGTGCAA TTCAATTTTA AGATAGAACA CAAAACCTGA AAGAATTTT ATGCGTGTGA CAGTGTATGG GGCTGCAGTT
 ATTTCAATTA CCGTACCTCA TATCACGTTT AAGTAAAAAT TCTATCTTGT GTTTTGAAT TCTTCAAAA TACCCACACT GTCACATACC CCGACGTCAA

 3201 GGTCTCCCTG GAGGGGACTT CCACACCTCC TGCCTTTAGG CCATGGGTGG AAAGTCTCA GTGAAGTACA CCTGTGTC CCTGTTCTGA AAGCTTTATA
 CCAGAGGGAC CTCCCTCTGA GGTGTGGAGG ACGGAAATCC GGTACCCACC TTTCAAGAGT CACTTCAATGT GGACACACCG GGTCAAGACT TTCGAAATAT

FIG. 5C

3301 CAGTTGAATT TTAAGTGGG TTGATAACAC CTTGGACTGT TAGTGTTAAA AATCTAGTGG GTGACCTTT AAATGCACAG TTTTAAAT ATATGCTGC
 GTCAACTTAA AATTCACCCC AACTATTGTG GAACCTGACA ATCACAATTT TTAGATCACC CAACTGGAAA TTTACGTGTC AAAAATTTTA TATAACGACG

 3401 ATTTTATAGA ATAGTAAAGG TACGATATA CTTGAGATTT TCCTCCATTT TTATTCTTC GTGAACATAG AGTTGGGGC CGAAATGTT TTTAAAGTAT
 TAAAAATCT TATCATTTCC ATGCTAATAT GAACCTTAAA AGGAGTAAA AATRAAGAAG CACTTGTATC TCAAAACCCCG GCTTTTACAA AAATTTTCATA

 3501 GTGTTTGTAGT TAAATATAAA GTTGGTTTAC TTCAAAAGCTA AAAAATTGTT AAACCTGCAG CTTGGTATTG CAGAGAAGAT TTTATAAGAA TTTTGTCTTA
 CACAAACTCA ATTTATATTT CAACCAAGTG AAGTTTCGAT TTTTAAACAA TTTTGAACGTC GAACCATRAC GTCTCTTCTA AAATATTTCTT AAACGAAAT

 3601 GAGAATGCCA CTTTGGCTGA ACTACAAGTG TAGGCCACCA TTATATTTA TAAATCCAGC ATACTTCAA ACTGTTTGT ATCTCTTGT ACCATGTATG
 CTCCTTACGGT GAAACCGACT TGATGTTTAC ATCCGGTGGT AATATTAAT ATTTAGTGG TATGAAGTTT TGACAAAACA TAGAGAACA TGGTACATAC

 3701 TATAAATGGA CCTTTTATAA CCTTGTCTC TGCTTGACAG ACTCAAGAGA AACTACCAG GTATTACACA AGCCAAAATG GGAGCAAGGC CTTCTCTCCA
 ATATTTACCT GGAAATATT GGACACAGAG ACGAATGTC TGAGTTCTCT TTGATGGGTC CATTAATGTT TCGGTTTTAC CCTCGTTCCG GAAGAGAGGT

 3801 GACTATCGTA ACCTGGTCC TTACCAAGTT GTGCTTTTCT GTTTTCAAGT GTAATGATG TTGAGCAGAA TGTGTACTT GAAATGCTA TAAGTGAGAT
 CTGATAGCAT TGGACCACGG AATGGTTCAA CACGAAAAGA CAAAAGTTCA CATTACTAC AACTGCTCTT ACACATGAA CTTTACCGAT ATTCACCTTA

 3901 GGATGAAAT AAATCTGAC TTATGAATAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 CCATACTTTA TTTAAGACTG AATACITATA TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

FIG. 5D

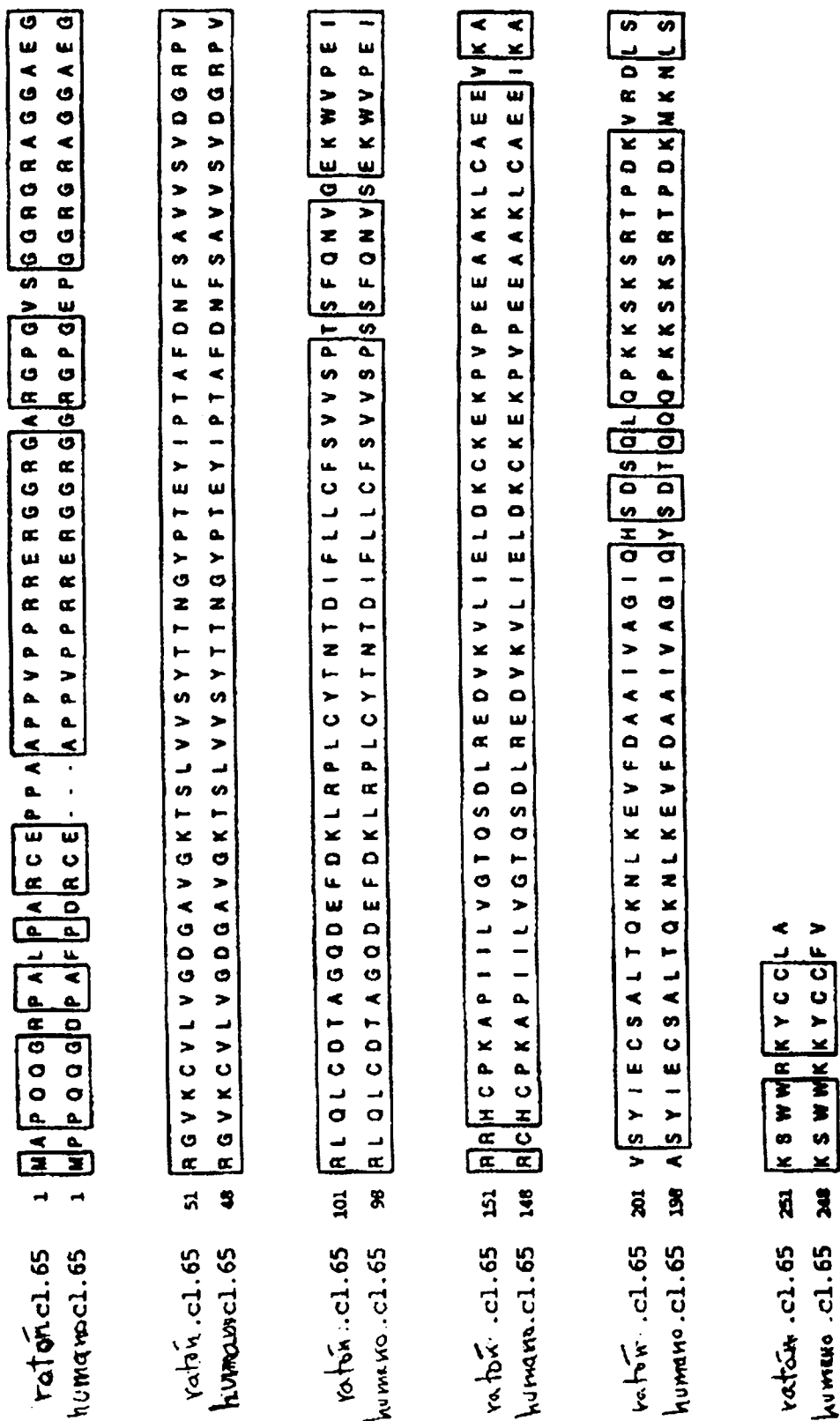


FIG.-6

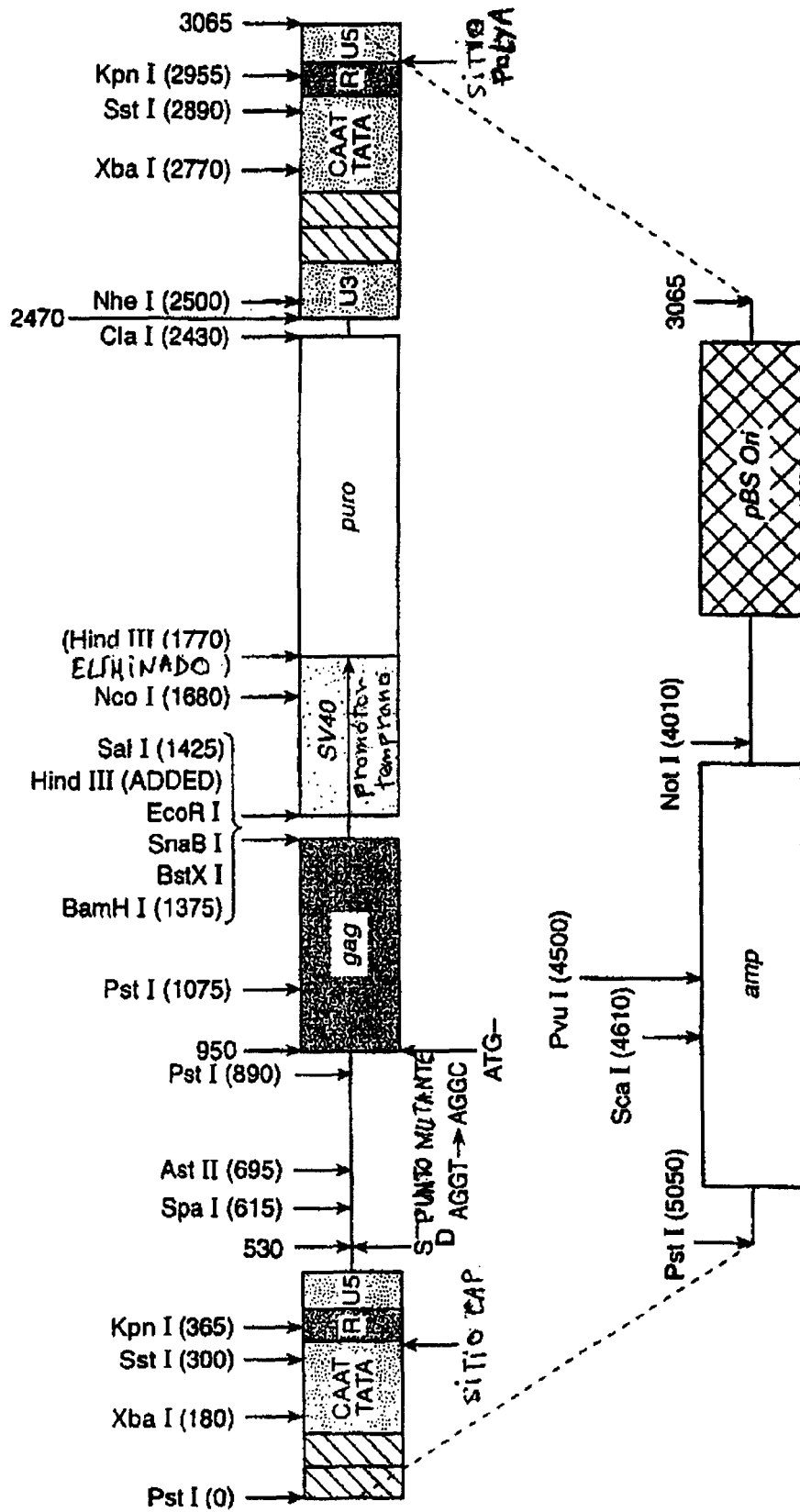


FIG.-7

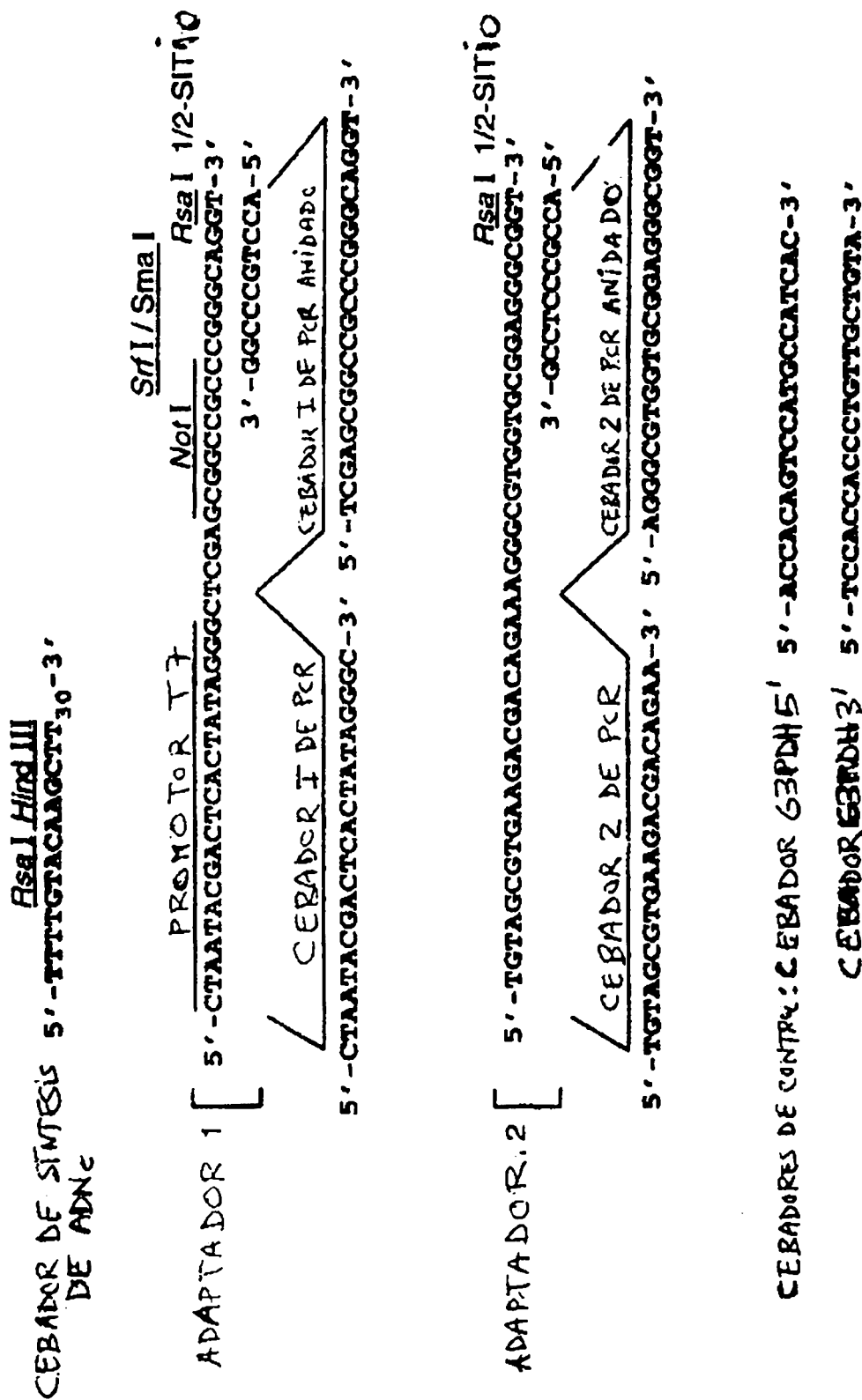


FIG.-8

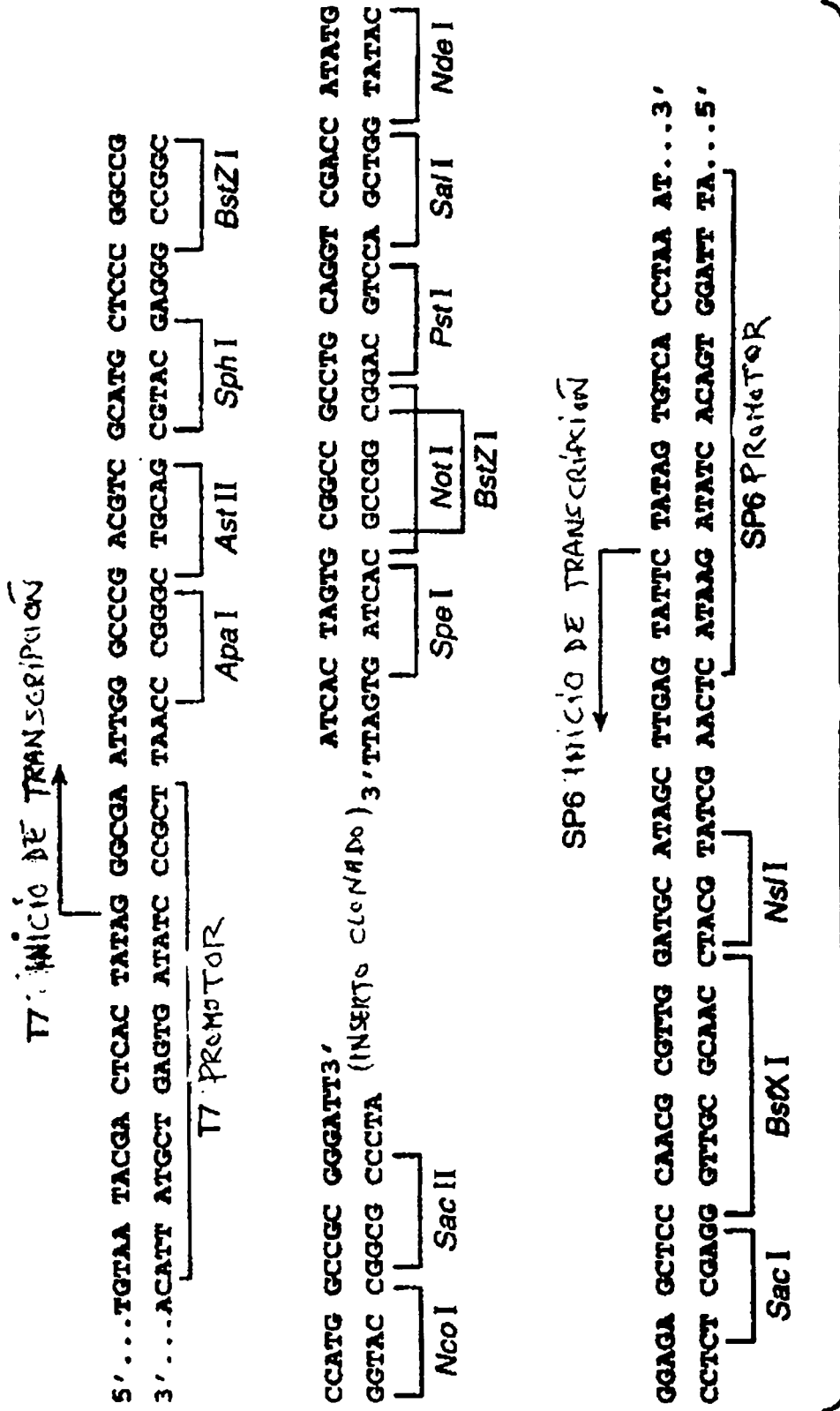


FIG.-9

5' -CCCACGCGTCCGCGCGGTGGGCAAGACCAGCCTGGTGGTCAGCTACACCACTAACG
 GCTACCCACCGAGTACATCCCTACGGCCTTCGACAACCTCTCGGC
 CGTGGTGTCTGTAGATGGGCGGCCTGTGAGACTCCAGCTCTGTGACACTGCAGGACAGG
 ATGAGTTTGACAAGCTGAGGCCCTCTGCTACACCAACACAGACATCTTCCTGCTGTGCTTCA
 GCGTGGTGAGCCCCACATCCTTCCAGAACGTGGGCGAGAAGTGGGTTCAGAGATTCGAC
 GCTACTGCCCAAAGGCCCCCATCATCCTGGTCGGGACACAGTCGGACCTCAGGGAGGACGTCA
 AAGTGCTCATAGAACTGGCTTCTGCAGGGCATCTGTGTCCTGCTGTAAAAGCAGGAGGAG
 GTGCTTGTCTGGGAGCTTTAAGTGTGCTGGGCTCATATCGTCCCGTTTTGCAAGGAATTG
 GGCCACCTTGAGAGGCCATAGTTGATGGCTATGGGACACACACACACTTTTTCTTAAGTCC
 ACCAAAATGCCTGCCTGTACACACACACACACACACACACACACACACACACACACT
 GGCTGGTTTTGCTGATGGAACCCTTAGACCACCCTCCACCCCCACCCTCCCCAAGCATGGC
 TGCAAGTGTGAGGGCACCACACCTTCTTCTTGACATTTCTTTGAACAGACATCATT
 TGTAGGATCTTAATTTATACATTTTTTTTCAGGTCATAAAATGTGGGATGAACATACT
 TTGAACCCAGTGCCTTCAGGGTCCATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGGGACAGGTAT
 GTGCAAGGCCCTTACCCACCAGTGGCTTCTCGCTGCAGGTCATGTTTGTGGCACTTGTCTT
 TAAGGTGAGGGTCTTATGACCGACTGTTCTGAGACAGCCCTGTGTGAGGCAAGCTCTT
 CACAGGGTTGTAGGTATTTCCAAGACGATAGGAACCAGACAGTGAATCATAGTATCATT
 TTGCTGTGGGCAAGGAACCTCTTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTTTATGTCT
 GTAAATTTTTCTTGTATTTAAAAAATAAATCAATCTTACGTTTTTCTGTAGGAAA
 AAAAAAACAAGTAAAAGAACAGGCCATATTTTCAGGTCAAAGGCTTCTTCTGCTG
 GTAAATGGGACTGAAGACTTTCTTACATCATTATTTAAAGGCTAATTGCTGAACCA
 CTAGAGTATATGAACTGTTTGTGAATGATATTAGCCATAGTCTCCTGAGGTGTTT
 CCTTGTGGCCTGAGTGGTAACATTGTTTTGCTTATGGAGATGCTGTAAGTACCTAGTACTCAGC
 TTATCCTATTGTGCATGGCTGTCTGGAAAGCCAGCGTACAAGTGGGGCTTGCCTGCCCTGTGTA
 CAGAGGGTGGGTGGGAAAGAGTGAATTTAATTTTAAATGTTATAATAAGCCAATGTAGTTGA
 GACCAAGGAAATGAGCATTGAGAACAACACTTGAAGTCTGGTGCCAGGGTTGTTGGACCTC
 ACACCCTGTCTCTGAGCCACCCGGAAGTGACATAAAGGACGCTGTGTGATCAAGT
 TCTGGACACTTTTTCTGGGATGCGTACCCTGGACTATTTATGTACAAAATCTAGTGGGTT
 GACGCTGCCCTGCAAGTTTTCAATGTCCCTGCATCCTATGAAGTCATAATGTCTGAC
 TGTACTGGAGGTTTTCTGCATTTTTTACTTTTTCGAAAATAGAGGTTTGGGCTGAGAAT
 TCTAAACGCATGTGCCTGGGTGGGACGTCAAGTCAGGGTTCTCATCAAAGCTGAGAA
 GTGGCTGGAATGTTTCACTTGGTGTCTGGGAGGATCCTGTGAGCTATGTAGA
 GAGGTGGCTCTTCAGCCTGACTCAGTGTGGGCTGAACGAAGTACCTGCAGAACACACGGT
 AGCAGGCTCCAAAATCGTCACCTCAAGCATGCGTGCAAGCAAACCTCCGAGAACTCC
 GTTTTCTGCTCGGCAGACGTGTGAGCAGTACCAGAAAGTCTCAAGCCAAAAGGGGAGCCTCG
 CTCGCTGGCTCCTCTGCAGGTGCCTTATCGACCTGTGCTCTTCTTTTTCCCGTGTCAA
 GATGTTGGACAGGATCTTGTACTTGAACATACTACAAATGAGTACTATGAAATAAATC
 TGACCTGTGGACCGAAAAA

FIG. 10

5' -CCCACGCGTCCGCACGTGACCAGTTATATTGCTATGAAAATGGTGGAGATGCCTCGTA
GAAGGCGAGTGCTGGGTGCACATGTGACATTTTCTTCAGGGAGCGACTCATGGTGAGACCA
GAGAGGGCTCTTAGCTTGCAGGACTGGCTTCTGCAGGGCATCTGTGTCCTGCTGTTAAAAG
CAGGAGGAGGTGCTTGTCTGGGAGCTTTAAGTGTGCTGGGCTCATATCGTCCCCTTTGCA
AGGAATTGGGCCACCTTGAGAGGCCATAGTTGATGGCTATGGGACACACACACACTTTTT
CCTTAAGTCCACCAAATGCCTGCCTGTACACACACACACACACACACACACACACACAC
ACACACACACTGGCTGGTTTGGCTGATGGAACCCTTAGACCACCCTCCCACCCCCACCCCT
CCCCAAGCATGGCTGCAAGTGTGAGGGCACCACACCTTCCTCTTCTTGACATTTCTTTGA
ACAGACATCATTTTGTAGGATCTTAATTTATACATTTTTTTTCAGGTCATAAAATGTGGGA
TGAACATACTTTGAACCCCAGTGCCTTCAGGGTCCATTGACTAGGGAGGCCTGTCTTAG
GGGACAGGTATGTGCAAGGCCTTACCCACCAGTGGCTTCTCGCTGCAGGTCATGTTTGTG
GCACTTGTCTTTAAGGTGAGGGTCTTATGACCGACTGTTCTGAGACAGCCCTGTGTCAG
GCAAGCTCTTTCACAGGGTTGTAGGTATTTCCAAGACGCCATAGGAACCAGACAGTGAAT
CATAGCTATCAGTTGCTGTGGGCAAGGAACCTCTTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTT
TATGTCTGTAAATTTTTTCTTGCTATTTAAAAAATAAATCAATCTTACGTTTTTCTGT
AGGAAAAAACAAGTAAAAGAACAGGCCATATTTTCAGGTCAAAGGCTTCTTCCCTGC
TGGTAAATGGGACTGAAGACTTTCTTACATCATTTATAAAGGCTAATTGCTGAACCACT
AGAGTATATGAACTGTTTGTGAATGATATTAGCCATAGTCTCCTGAGGTGTTTCTTGTG
GCCTGAGTGGTAACATTGTTTTGCTTATGGAGATGCTGTAACCTGACCTAGTGACTCAGCT
TATCCTATTGTGCATGGCTGTCTGGAAAGCCAGCGTACAAGTGGGGCTTTGCCTGCCCTG
TGTACAGAGGGTGGTGGGAAAGAGTGAATTATTTAATTTTAAATGTTATAATAAAGCCA
ATGTAGTTGAGACCAAGGAAATGAGCATTGAGAACACAACTTGAAGTCTGGTGCCAGGG
TTGTTGGACCTCACACCCTGTCTCTGAGCCACCCGGAAGTACATAAAGGACGCTGTGTG
ATCAAGTTCTGGACACTTTTCTGGGATGCGTACCCTGGACTATTTATGTCACAAATCTA
GTGGGTTGACGCTGCCCTGCAAGTTTTCAATGTCCTTGCATCCTATGAAGTCATAATGTC
TGACTGTACTGGAGGTTTTCTGCATTTTTTACTTTTTCGAAAATAGAGGTTTGGGCTGAG
AATTCTAAACGCATGTGCCCTGGGTGGGACGTCAGTCAAGTCAAGGTTCTCATCAAAGCTGAGAA
GTGGCTGGAATGTTGAGCTGGTGTCTGGGGAGGATCCTGTGAGCTATGTAGAGAGGTGG
CTCTCAGCCTGACTCAGTGTGGGCTGAACGAAGTACCTGCAGAACACACGGTAGCAGGC
TCCAAAATCGTCACCTCAAGCATGCGTGCAAGCAAATTCGAGAACTCCGTTTTCTGCT
CGGCAGACGTGTGAGCAGCTACCCAGAAGTCTCAAGCCAAAAGGGGAGCCTCGCTCGCTG
GCTCCTCTGCAGGTGCCCTTATCGACCTGTGCTCTTCTTTTTCCCGTGTCAAAGATGTTG
GACAGGATCTTGTACTTGAACATACTACAAATGAGTTACTATGAAATAAATTCTGACCT
GTGGACCGAAAAA

FIG. 11

5' - CCCACGCGTCCGCGCCGAGGGACGCGGCGTCAAGTGCGTGCTGGTCGGCGACGGCGCGGT
GGGCAAGACCAGCCTGGTGGTCAGCTACACCACTAACGGCTACCCACCGAGTACATCCC
TACGGCCTTCGACAACCTTCTCGGCCGTGGTGTCTGTAGATGGGCGGCCTGTGAGACTCCA
GCTCTGTGACACTGCAGGACAGGATGAGTTTGACAAGCTGAGGCCCTCTGCTACACCAA
CACAGACATCTTCTGCTGTGCTTCAGCGTGGTGAGCCCCACATCCTTCCAGAACGTGGG
CGAGAAGTGGGTTCAGAGATTTCGACGTCAGTCCCAAAGGCCCCCATCATCCTGGTCGG
GACACAGTCGGACCTCAGGGAGGACGTCAAAGTGCTCATAGAAGTGGACAAGTGCAAAGA
GAAGCCGGTGCCTGAAGAGGGCGGAAGCTGTGCGCGGAGGAAGTCAAAGCTGTCTCCTA
CATCGAGTGCTCAGCGTTGACTCAGAAAACCTCAAAGAGGTTTTTCGACGCCGCCATTGT
TGCTGGTATCCAGCACTCAGACTCCCAGCTACAGCCAAAGAAGTCTAAAAGCAGGACCCC
GGATAAGGTGCGGGACCTGTCCAAGCTTGGTGGAGGAAGTATTGCTGCCTGGCCTGACT
CTCGCAAATAGCAGGTGTTAAGCTGC AACAGCTCTTTATGGACGAGGCTGTCATAGGAT
GAGCCCCAAAGCACCCCTCTTCTGCCCTTAACCTCCTGTGTGCGGGAGCTTAGGGCTGAGA
TTCATATGCAAATACGTTTTTTTTAAAAATTGAAAGTTACATTTTTTTTCTGTTAAGTCT
GGAAGCTTTGAGCTGTTAGACCTCCGGATTAATTTATATTCCATATGAAAAGGGCTCTTC
AAAAGCGGGGGTGTGAGCATGAAGTTCTGCTGGTGTGTTGTACAGGACAAAGGAGAATGAA
TGGGGAACCTTCTCCTGAATTAAGGGGCTAACTGAAGGGCTCAATTGCAAGGGCA

FIG. 12

5' - CGCGGTGGGCAAGACCAGCCTGGTGGTCAGCTACACCACTAACGGCTACCCACCGAGTA
CATCCCTACGGCCTTCGACAACCTTCTCGGCCGTGGTGTCTGTAGATGGGCGGCCTGTGAG
ACTCCAGCTCTGTGACACTGCAGGACAGGATGAGTTTGACAAGCTGAGGCCCTCTGCTA
CACCAACACAGACATCTTCTGCTGTGCTTCAGCGTGGTGAGCCCCACATCCTTCCAGAA
CGTGGGCGAGAAGTGGGTTCAGAGATTTCGACGTCAGTCCCAAAGGCCCCCATCATCCT
GGTCGGGACACAGTCGGACCTCAGGGAGGACGTCAAAGTGCTCATAGAAGTGGCTTCTGC
AGGGCATCTGTGCTCCTGCTGTTAAAAGCAGGAGGAGGTGCTTGTCTGGGAGCTTTAAGTG
TGCTGGGCTCATATCGTCCCGTTTGCAAGGAATTGGGCCACCTTGAGAGGCCATAGTTGA
TGGCTATGGGACACACACACACTTTTTCTTAAGTCCACCAAATGCCTGCCTGTACACA
CACACACACACACACACACACACACACACACACTGGCTGGTTTGCTGATGGAACCC
TTAGACCACCCTCCCACCCCCACCCCTCCCCAAGCATGGCTGCAAGTGTGAGGGCACCAC
ACCTTCTTCTTGTGACATTTCTTTGAACAGACATCATTTTGTAGGATCTTAATTTATAC
ATTTTTTTCAGGTATAAAATGTGGGATGAACATACTTTGAACCCAGTGCCTTCCAGGGT
CCATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGGGACAGGTATGTGCAAGGCCTTACCCACCAGT
GGCTTCT

FIG. 14

5' -CCCACGCGTCCGGCGCGAGCTTAGCAGATCTCCACTTACCGAACATCTAGAGAGTCGCG
 CGCGCGCCGACGGAGCGGACATGGGCAGAGCGATGGTGGCCAGGCTAGGGCTGGGGTTGC
 TGCTTCTGGCACTGCTCCTACCCACGCAGATTTACTGCAACCAAACATCTGTTGCACCGT
 TTCCCGGTAACCAGAATATTTCTGCTTCCCCAAATCCAAGTAACGCTACCACCAGAGGGG
 GTGGCAGCTCCCTGCAGTCCACAGCTGGTCTCCTGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCCACAT
 CTCTACTGTTAGAGACTCAGGCCAGGAAACGCTCTCTACTTCCCCATCCTCTAGACCTACC
 CCAAATGGCAACCACAAGTCCAATGTGATCAGGAAGAAACAGGTCCACCTCGAATTGGCT
 GTTACCATATCTCAACAGAAAACACGGAGAATTCGAAATTCGACGGGATTAAGGACGCG
 TGAAAGGTTTGAGAGAAGAGAGATGCCGCTATTGAATCTGCTGGAGTTTTACATCCCAAG
 ATGAAGACAGCATTTCAGAATTGATGTGATTTCCCTGAATGTGGCTTAGGAAAAGTGGACA
 CTTAAAACCTCTCACTTGAAATTGGGCACAGGTTTGATGTAGAGATAAGGACGGGGTGGCG
 AATGGAGACCCATTTTGTCACTTGCATCTGACCGATAAGGCCATAGTGCAGTTAGGTG
 ATATTCGAAAGCTTCTTTGATGCTCTTTATGTATATGTTGGAAGGAACTACCAGGCGTTG
 CTTTAAATTCCAATGTGTTGTTTCGTTACTACTAATTTAATACCGTAAGCTCTAGGTAA
 AGTTCATGTTGTTGAACTCTGACTGTTCTCTTTGGAATTGAACGTTTGCATCCTCCTC
 CTGTGGCTTTAGGTTCTGACATTGTATTTGACCTTTACTAGTAATTAACATGTGCCAGGCA
 ATGGTGGATTGGAACCCATCCCCAAGTCCAGCCACCCTGAATAAATCTGATTTCAAAG
 TCAAACAGTAGACATTTCCATTGTCTTTCTCACTCACCACAAGCACCAAATTCACTAG
 AGTACACTGGTTCAGAGAGCAGAATCATGTTGGCCTTGCTAATTTCAAATGTCTGTCT
 TTTACTTTGGTATATGTTGAGGGCTTTTTCATAATTTAAAGTGTGTTCTGTTAGCAAGGC
 AAAAATTATGAGTCTTAATTCTACAGGCAAATATGCAAAGGAGCCAAAACCTGTAACCCA
 GCATTTGGGATGTGAAGACTGGAAGCTAACTCTCATTGAATTCACAAAGTCTTTTTATACA
 ATTTCTGTACATACTTTTTTTTTTTTTAAGAGAAAACAAACGGTGGATCAGAATAGCCA
 CGTTTGAATACTTTGGTTATCCATTCATATTTTTAGATAGTTATTGGTCCCTGTGCCTGA
 AAGGGGGCTTGGTTCTACCGTAAGTTTTTCCAATTTCTTGATATACACATACCTTCTAA
 AACCTAGACATTTCTGAAAAAATCTTTTGTTCGCATGGTCACACACTGATGCTTACCC
 GTACAGTAGTCTTGATAACCAGAGTCATTTCTCCATCTTTAGAAACCTTCTGGGAAGA
 AGGAGAGCTCACAGACCCGAAGCTACTGTGTGTGTAATGAACACTCCCCTTGCCTCACA
 CCTGAATGCTGTACATCTATTTGATTGTAATTTGTGTTGTGTTATGCTTTGATTCA
 TAGTAACTTCTCATGTTATGGAATTGATTTGCATTGAACACAACTGTAAAAAATAAAAA
 AAAAAGGGCGGCCCGCCGCCCGCG
 ATGGCCCCGCAGCAAGGCCGGCGCGCTGCCCGCCCGCTGCGAGCCGCCGGCGCGCGC
 CCGGTACCGCTCGCCGAGAGCGCGGGGGCGCGGGGCGCGCGGGCCCGGGTGTCCGGG
 GGTCCGGGGCGCGCGGGCGCGCCGAGGGACGCGGCGTCAAGTGCGTGCTGGTCCGCGAC
 GCGCGGTGGGCAAGACCAGCCTGGTGGTCAGCTACACCCTAACGGCTACCCACCGAG
 TACATCCCTACGGCCTTCGACAACTTCTCGGCCGTGGTGTCTGTAGATGGGCGGCTGTG
 AGACTCCAGCTCTGTGACACTGCAGGACAGGATGAGTTTGACAAGCTGAGGCCCTCTGC
 TACACCAACACAGACATCTTCTGCTGTGCTTCAGCGTGGTGAAGCCACATCCTTCCAG
 AACGTGGGCGAGAAGTGGGTTCCAGAGATTCGACGTCCTGCCAAAGGCCCCCATCATC
 CTGGTCCGGACACAGTCCGACCTCAGGGAGGACGTCAAAGTGTCTCATAGAAGTGGACAAG
 TGCAAAGAGAAGCCGGTGCCTGAAGAGGCGGCGAAGCTGTGCGGGAGGAAGTCAAAGCT
 GTCTCCTACATCGAGTGTCTCAGCGTTGACTCAGAAAAACCTCAAAGAGGTTTTTCGAGGCC
 GCCATTGTTGCTGGTATCCAGCACTCAGACTCCCAGCTACAGCCAAAGAAGTCTAAAAGC
 AGGACCCCGGATAAGGTGCGGGACCTGTCCAAGTCTTGGTGGAGGAAGTATTGCTGCCTG
 GCCTGACTCTCGCAAATAGCAGGTGTTTAAAGCTGCAACAGCTCTTTATGGACGAGGCTGT
 CATAGGATGAGCCCCAAAGCACCCCTTCTGCCCTTAACTTCTGTGTGCGGGAGCTTAG
 GGCTGAGATTCATATGCAAATACGTTTTTTTTAAAAATTGAAAGTTACATTTTTTTTTCTG

FIG. 13A

TTAAGTCTGGAAGCTTTGAGCTGTAGACCTCCGGATTAATTTATATTCCATATGAAAAGG
 GCTCTTCAAAGCGGGGTGTCAGCATGAAGTTCTGCTGTGTTGTACAGGACAAAGGAGAAT
 GAATGGGACCTTCTCCTGATTAAGGGCTACTGAGGGCTCAGTGCAGGGCACGTGTGCACC
 AGGCTTGGTGAGAGTGAGCAAGCGTGAGCTTTGAAACCACACGAGCCACCCCGGTTTTG
 TAAGGGCAAAGATCTGAAACCAGCAAGGGCCTTCTGCTTACGAAACCTCGAGCCCATCCC
 TTCTGTTTACTCAGATTCTCTTAGGATTTTAAACAACCAACATCCCACAGCCTACTGG
 CATAGTGTGGCGAACAGTGCACCTGCTTGTACGGTTTTGTTTTGTTTTTTTAAATCAC
 GTGACCAGTTATATTGCTATGAAAATGGTGGAGATGCCTCGTAGAAGGGCAGTGTGGGT
 GCACATGTGACATTTCTTCAGGGAGCGACTCATGGTGAGACCAGAGAGGGCTCTTAGCT
 TGCAGGACTGGCTTCTGCAGGGCATCTGTGTCCTGCTGTTAAAAGCAGGAGGAGGTGCTT
 GTCTGGGAGCTTTAAGTGTGCTGGGCTCATATCGTCCCGTTTGCAAGGAATTGGGCCACC
 TTGAGAGGCCATAGTTGATGGCTATGGGACACACACACACTTTTTCTTAAGTCCACCAA
 AATGCCTGCCTGTACACACACACACACACACACACACACACACACACACTGGCT
 GGTGTGCTGATGGAACCCTTAGACCACCCTCCACCCCCACCCCTCCCCAAGCATGGCTG
 CAAGTGTGAGGGCACCACACCTTCTCTTCTTGACATTTCTTTGAACAGACATCATTTTG
 TAGGATCTTAATTTATACATTTTTTTTTCAGGTCATAAAATGTGGGATGAACATACTTTGAA
 CCCCAGTGCCTTCAGGGTCCATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGGGACAGGTATGTGC
 AAGGCCTTACCACCAGTGGCTTCTCGCTGCAGGTGATGTTTGTGGCACTTGTCTTTAA
 GGTGAGGGTCTTATGACCGACTGTTCTGAGACAGCCCTGTGTCAGGCAAGCTCTTTCACA
 GGGTTGTAGGTATTTCCAAGACGCCATAGGAACCAGACAGTGAATCATAGCTATCAGTTT
 GCTGTGGGCAAGGAACCTCTTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTTTATGTCTGTAAATTT
 TTTCTTGCTATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 13B

5' -CCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGTTCAGGGTCCATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGG
 GACAGGTATGTGCAAGGCCTTACCACCAGTGGCTTCTCGCTGCAGGTGATGTTTGTGGC
 ACTTGTCTTTAAGGTGAGGGTCTTATGACCGACTGTTCTGAGACAGCCCTGTGTCAGGC
 AAGCTCTTTCACAGGGTTGTAGGTATTTCCAAGACGCCATAGGAACCAGACAGTGAATCA
 TAGCTATCAGTTTGCTGTGGGCAAGGAACCTCTTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTTTA
 TGTCTGTAAATTTTTTCTTGCTATTTAAAAAAAAAAAAATCAATCTTACGTTTTTCTGTAGG
 AAAAAAAAAAACAAGTAAAAGAACAGGCCATATTTTCAGGTCAAAGGCTTCTTCTGCTGG
 TAAATGGGACTGAAGACTTTCTTACATCATTATTAAGGCTAATTGCTGAACCACTAGA
 GTATATGAACTGTTTGTGAATGATATTAGCCATAGTCTCCTGAGGTGTTTCTTGTGGCC
 TGAGTGGTAACATTGTTTTGCTTATGGAGATGCTGTAAGTACCTAGTACTCAGCTTAT
 CCTATTGTGCATGGCTGTCTGGAAAGCCAGCGTACAAGTGGGGCTTTGCCTGCCCTGTGT
 ACAGAGGGTGGGTGGGAAAGAGTGAATTAATTTAAATGTTATAATAAGCCAATG
 TAGTTGAGACCAAGGAAATGAGCATTGAGAACAACAACTGAAGTCTGGTGCCAGGGTTG
 TTGGACCTCACACCCTGTCTCTGAGCCACCCGGAAGTGACATAAAGGACGCTGTGTGATC
 A

FIG. 17

5' -CCCACGCGTCCGTATGAAAATGGTGGAGATGCCTCGTAGAAGGCGAGTGCTGGGTGCACATG
TGACATTTTCTTCAGGGAGCGACTCATGGTGGAGACCAGAGAGGGCTCTTAGCTTGCAGGAC
TGGCTTCTGCAGGGCATCTGTGTCTGCTGTAAAAGCAGGAGGAGGTGCTTGTCTGGGAGCTTTA
GTGTGCTGGGCTCATATCGTCCCGTTTGCAAGGAATTGGGCCACCTTGAGAGGCCA
TAGTTGATGGCTATGGGACACACACACTTTTTCTTAAGTCCACCAAATGCCTGCCTGTA
CACACACACACACACACACACACACACACACACACTGGCTGGTTGCTGATGGAA
CCCTTAGACCACCCTCCCACCCCAACCCTCCCCAAGCATGGCTGCAAGTGTGAGGGCACCACAC
CTTCCTCTTCTTGACATTTCTTTGAACAGACATCATTTTGTAGGATCTTAATTTATAC
ATTTTTTTCANGTCATAAAATGTGGGATGAACATACTTTGAACCCCAAGTGCCTTCAGGGTC
CATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGGGACAGGTATGTGCAAGGCCTTACCCACCAGT
GGCTTCTCGCTGCAGGTCATGTTGTGGCACTGTTCTTTAAGGTGAGGGTCTTATGACCG
ACTGTTCTGAGACAGCCCTGTGTGAGGCAAGCTCTTTCACAGGGTTGTAGGTATTTT
CAAGACGCCATAGGAACCAGACAGTGAATCATAGCTATCAGTTTGCTGTGGGCAAGGAACC
TCTTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTTTATGTCTGTAAATTTTTCTTGCTATTTAAAA
AAAAAATCAATCTTACGTTTTTCTGTAGGAAAAAAAAAAAAACAAGTAAAAGAACAGGCCAT
ATTTGAGGTCAAAGGCTTCTTCCTTCTGGTAAATGGGACTGAAGACTTTCTTACATCA
TTATTAAGGCTAATTGCTGAACCACTAGAGTATATGAACTGTTTGTGAATGATATTAGC
CATAGTCTCCTGAGGTGTTTCTTGTGGCCTGAGTGGTAACATTGTTTTGCTTATGGAGA
TGCTGTAAGTACCTAGTGACTCAGCTTATCCTATTGTGCATGGCTGTCTGGAAAGCCAG
CGTACAAGTGGGGCTTTGCCTGCCCTGTGTACAGAGGGTGGGTGGGAAAGAGTGAATT
ATTTAATTTAAATGTTATAATAAAGCCAATGTAGTTGAGACCAAGGAAATGAGCATTGAGA
ACACAACTTGAAGTCTGGTGCCAGGGTGTGGACCTCACACCCTGTCTCTGAGCCACC
CGAAGTGACATAAAGGACGCTGTGTGATCA

FIG. 15

5' -CCCACGCGTCCGGTGACCAGTTATATTGCTATGAAAATGGTGGAGATGCCTCGTAGAAGG
CGAGTGCTGGGTGCACATGTGACATTTTCTTCAGGGAGCGACTCATGGTGAGACCAGAGA
GGGCTCTTAGCTTGCAGGACTGGCTTCTGCAGGGCATCTGTGTCTGCTGTTAAAAGCAG
GAGGAGGTGCTTGTCTGGGAGCTTTAAGTGTGCTGGGCTCATATCGTCCCGTTTGCAAGG
AATTGGGCCACCTTGAGAGGCCATAGTTGATGGCTATGGGACACACACACACTTTTTCTT
TAAGTCCACCAAATGCCTGCCTGTACACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACACTGGCTGGTTTGCTGATGGAACCCTTAGACCACCCTCCCACCCCCACCCCTCCC
CAAGCATGGCTGCAAGTGTGAGGGCACCACACCTTCCTCTTCTTGACATTTCTTTGAACA
GACATCATTTGTAGGATCTAATTTATACATTTTTCAGGTCATAAAATGTGGGATGAA
CATACTTTGAACCCAGTGCCTCAGGGTCCATTGACTAGGGAGGCACTGTCTTAGGGGA
CAGGTATGTGCAAGGCCTTACCACCCAGTGGCTTCTCGCTGCAGGTCATGTTTGTGGCAC
TTGTTCTTTAAGGTGAGGGTCTTATGACCGACTTCTGAGACAGCCCTGTGTGAGGCAA
GCTCTTTACAGGGTGTAGTATTTCCAAGACGCCATAGGAACGACAGTGAATCAT
GCTATCAGTTTGCTGTGGGCAAGGAACCTCTTTTGGCCACCTGGTAACAAAATTTTATG
TCTGTAAATTTTTCTTGCTATTTAAAAAATAATCAATCTTACGTTTTTCTGTAGGAA
AAAAAACAAGTAAAAGAACAGGCCATATTTAGGTCAAAGGCTTCTTCTGCTGGTA
AATGGGACTGAAGACTTTCTTACATCATTATTAAGGCTAATTGCTGAACCACTAGAGT
ATATGAACTGTTTGTGAATGATATTAGCCATAGTCTCCTGAGGTGTTTCTTGTGGCCTG
AGTGGTAACATGTTTTGCTTATGGAGATGCTGTAAGTACCTAGTACTCAGCTTATCC
TATTGTGCATGGCTGTCTGGAAAGCCAGCGTACAAGTGGGGCTTGCCTGCCCTGTGTAC
AGAGGGTGGTGGGAAAGAGTGAATATTTAATTTAAATGTTATAATAAGCCAATGTA
GTTGAGACCAAGGAAATGAGCATTGAGAACACAACTTGAAGTCTGGTGCCAGGGTGT
GGACCTCACACCCTGTCTCTGAGCCACCCGGAAGTACATAAAGGACGCTGTGTGATCAA
GTTCTGGACACTTTTCTGGGATGCGTACCACTGGACTATTTATGTCACAAATCTAGTGGG
TTGACGCTGCCCTGCAAGTTTCAATGTCCCTGCATCCTATGAAGTCATAATGTCTGACT
GTACTGGAGTTTTCTGCATTTTTACTTTTCGAAAATAGAGGTTGGGCTGAGAATTC
TAAACGCATGTGCCTGGGTGGGACGTCAAGTCAGGGTCTCATCAAAGCTGAGAAGTGGC
TGGAATGTTGAGCTTGGTGTCTGGGGCAGGCTCCAAAATCGTACCTCAAGCATGCGTGC
AAGCAAATTCGGAGAACTCCGTTTTCTGCTCGGCAGACGTGTGAGCAGCTACCCAGAAG
TCTCAAGCCAAAAGGGGAGCCTCGCTCGCTGGCTCCTCTGCAGGTGCCTTATCGACCTGT
GCTCTTCTTTTTCCCGTGTCAAAGATGTTGGACAGGATCTTGTACTTGAACATACTAC
AAATGAGTTACTATGAAATAAATCTGACCTGTGGACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 16

ES 2 316 173 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> POLIPÉPTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LOS CODIFICAN

<130> P1176R1PCT

10 <160> 52

<210> 1

<211> 3960

15 <212> ADN

<213> Humano

20 <400> 1

ctccaacagc gcagggcaga gcggtggcg ccgccggagc gcggagccac 50
gaccctccct ggccgccttt gtctactggc cgtgcggccc ggaaccgcca 100
25 ctctccaggg ccggggacgc gcccgagct gtcggtgaca gtcctccct 150
accgcaacc tccggggcgg aggggcggtc gggccgggccc ctgctagccc 200
30 gcgaccgcaa gcccgcgctc gcggatcgat gccccgcag cagggggacc 250
ccgcgttccc cgaccgctgc gaggcgctc cggtgccgce gcgtcgggag 300
35 cgcggtggac gcgggggacg cgggcctggg gagccggggg gccgggggag 350
tgcggggggt gccgaggggc gcggcgtcaa gtgcgtgctg gtcggcgacg 400
gcgcggtggg caagacgagc ctggtggtga gttacaccac caacggctac 450
40 cccaccgagt acatccctac tgcttcgac aacttctccg cggtggtgctc 500
tgtggatggg cggcccgtga gactccaact ctgtgacact gccggacagg 550
45 atgaatttga caagctgagg cctctctgct acaccaacac agacatcttc 600
ctgctctgct tcagtgtcgt gagcccctca tccttccaga acgtcagtga 650
50 gaaatgggtg ccggagattc gatgccactg tcccaaagcc cccatcatcc 700
tagttggaac gcagtcggat ctcagagaag atgtcaaagt cctcattgag 750
55 ttggacaaat gcaaagaaaa gccagtgcct gaagaggcgg ctaagctgtg 800
cgccgaggaa atcaaagccg cctcctacat cgagtgttca gccttgactc 850
aaaaaacct caaagaggtc tttgatgcag ccategctgc tggcattcaa 900
60 tactcggaca ctcagcaaca gccaaagaag tctaaaagca ggactccaga 950
taaaatgaaa aaactctcca agtcctggtg gaagaagtac tgctgttttcg 1000
65 tatgatgctg gcaagacacc cagaaaggct attttcagat gaaatcgata 1050

ES 2 316 173 T3

5 ttagaagcta tattagctga aacaactcct tttactgcgt agaacctata 1100
 tcgagagtgt gtgtatatgt attataggag gagctctcaa ttttatgtat 1150
 tctttctgcc ttttaatttc ttgtttgttt gagcttaggg atgagatact 1200
 10 tatgcaagat atttttgaag taaattaaac atttttcaca tctctggaaa 1250
 ttttagagttc tagacctctg gttaatttat atctaatacg aagaagacac 1300
 ctctaactcg gatgttaaga atgaagtctt gctacattat aatgtacaga 1350
 15 agagcaaaaag ggaggaacac tatggttaac cctctcttga ttaagggcta 1400
 cttaatgcac agtgcattat gtacacaggt caaccatggg aacaatagtt 1450
 cttagctttg aaactccatg caaacatgc ctttttttta aggagcaaaa 1500
 20 atctgagaaa aaaagtgaga gacctctgcc tacaaaactt caaaccagtc 1550
 acttttgtea attgctaata cccagttact tatgatttaa aaacaaccaa 1600
 25 cagaaaacat cccacagact gtatggcact ctgtagtcaa aaaaggaaac 1650
 tttcttattg ggacttttct ttcttagtcc agttgtggtg acacatatga 1700
 30 acacagacaa agtgcctatgc ggaggaaagc aagtgttggg cagtagtttc 1750
 atgttttagg gagtggttcc tgtggagatc agaaagtgac atttgctttc 1800
 35 ggtactgtaa tacatgcacc aaactgcctc aatcctaggt aacgagggca 1850
 acagggagca cctgtctgga ttgtttttaa acctccatac tcaagctgtc 1900
 tcttcggcag ggaggtgaat actcttgaaa ggccaacagc aagtgtttgt 1950
 40 gggacacaac acagataatt ttttcttaag tcgaccaaga tgtacttctc 2000
 tgtgtgcaca cccatgcaca ctcatgcaca cagatacata ggtctgtatg 2050
 45 gctgtatttg ctgttgattc agactttcac accattaatg gggaaaagcg 2100
 tggccacaaa aacagatgct aggaagcttg gcttcctctt cttggtgacc 2150
 50 cttttttgaa ccaacatctt ttttattata ttcagagtat gtttttaagt 2200
 gtatcttaat atatacattt tttaggacat cttaaactta aacaaaaaat 2250
 aaaatgaaca tctcttgaaa cctgttaaaa caaccagtta aagccacaga 2300
 55 tggctttcag ggcagtagca gcagaggcca gtggactctg aggactcctg 2350
 aggggcgggg cgtgtagcca gccaggtgca tgccgggacc atggccccc 2400
 60 tacttggtctg ctctctgtga cagtgaaata catccttcaa ggtggcagct 2450
 gttagggctg aatcttctgg agaaaaaggt gccatctcag gagaatagct 2500
 65

ES 2 316 173 T3

tttactctgg taggaatgct tccgagacac cacaaggcag cctgaacact 2550
 cagttgcagg gtcgggcttg cggtaggtga cccagagcca ccaaagtcac 2600
 5 atccacaact aatgagggaa atctgtaaag ccagttagat agaagagttt 2650
 tatttttctg tgggttttgt gttgtctttt ttatgttaaa aagaaatcca 2700
 10 gtttgtgttt ttctatagaa aaagttaaag atcaggttat actttagggt 2750
 aggggttcta tttattcctg ttagtaaata aaattaacaa atttctttgt 2800
 15 ttaacaaaag attaatcttt aaaccactaa aatacataga ctgattgatt 2850
 attcaacaca ttggaattga tgtcggtcac agtttcctga agcatttagt 2900
 tacaacctga aggaataaaa tgatttgtgg aaatgcttaa aatagacctt 2950
 20 actgaatata gtctcatctt gccgcgcctg gcttacctat ctgtggaaag 3000
 ctaggcttcc caggtgggct ctgcctgtct ggtgcctgga ggtgtgggag 3050
 25 ggaagatgag ttatttaact ggtaagcgat ttgaaacact atttttatat 3100
 taaagtaaat ggcattggag atagtgcaaa ttcattttta agatagaaca 3150
 30 caaaacttga aagaagtttt atgcgtgtga cagtgtatgg ggctgcagtt 3200
 ggtctccctg gaggggactt ccacacctcc tgcctttagg ccatgggtgg 3250
 aaagtgtcca gtgaagtaca cctgtgtggc ccagttctga aagctttata 3300
 35 cagttgaatt ttaagtgggg ttgataacac cttggactgt tagtgtaaaa 3350
 aatctagtgg gttgacctt aaatgcacag tttttaaaat atattgctgc 3400
 40 attttataga atagtaaagg tacgattata cttgagattt tcttccattt 3450
 ttatttcttc gtgaacatag agtttggggc cgaaaatggt tttaaagcat 3500
 45 gtgtttgagt taaatataaa gttggttcac ttcaaagcta aaaaattggt 3550
 aaacttgcag cttggtattg cagagaagat tttataagaa ttttgcttta 3600
 50 gagaatgcca ctttggtgta actacaagtg taggccacca ttataattta 3650
 taaatccagc atacttcaaa actgtttgtt atctcttgtt accatgtatg 3700
 tataaatgga ccttttataa ccttgttctc tgcttgacag actcaagaga 3750
 55 aactaccag gtattacaca agccaaaatg ggagcaaggc cttctctcca 3800
 gactatcgta acctggtgcc ttaccaagt gtgcttttct gttttcaagt 3850
 60 gtaaagtatg ttgagcagaa tgttgtactt gaaaatgcta taagtgagat 3900
 ggtatgaaat aaattctgac ttatgaatat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3950
 65 aaaaaaaaaa 3960

ES 2 316 173 T3

<210> 2

<211> 3960

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 2

```

10      tttttttttt tttttttttt tttttttttt atattcataa gtcagaattt 50
      atttcatacc atctcactta tagcattttc aagtacaaca ttctgctcaa 100
      catcatttac acttgaaaac agaaaagcac aacttggtaa ggcaccaggt 150
15      tacgatagtc tggagagaag gccttgctcc cattttggct tgtgtaatac 200
      ctgggtagtt tctcttgagt ctgtcaagca gagaacaagg ttataaaagg 250
20      tccatttata catacatggt aacaagagat aacaaacagt tttgaagtat 300
      gctggattta taaattataa tggtggccta cacttgtagt tcagccaaag 350
25      tggcattctc taaagcaaaa ttcttataaa atcttctctg caataccaag 400
      ctgcaagttt aacaattttt tagctttgaa gtgaaccaac tttatattta 450
30      actcaaacac atactttaa aacattttcg gcccacaaact ctatgttcac 500
      gaagaaataa aatggagga aatctcaag tataatcgta cctttactat 550
35      tctataaaat gcagcaatat attttaaaaa ctgtgcattt aaaggtcaac 600
      ccactagatt ttaaacacta acagteccaag gtgttatcaa cccacttaa 650
40      aattcaactg tataaagctt tcagaactgg gccacacagg tgtacttcac 700
      tgagcacttt ccacccatgg cctaaaggca ggagggtgtgg aagtcccctc 750
45      cagggagacc aactgcagcc ccatacactg tcacacgcat aaaacttctt 800
      tcaagttttg tgttctatct taaaaatgaa tttgcastat actccatgcc 850
50      atttacttta atataaaaat agtgtttcaa atcgcttacc agttaaataa 900
      ctcatcttcc ctcccacacc tccaggcacc agacaggeag agcccacctg 950
55      ggaagcctag ctttccacag ataggtaage caggcgcggc aagatgagac 1000
      tgtattcagt taggtctatt ttaagcattt ccacaaatca ttttattcct 1050
60      tcaggttgta actaaatgct tcaggaaact atgaccgaca tcaattccaa 1100
      tgtgttgaat aatcaatcag tctatgtatt ttagtggttt aaagattaat 1150
      cttttgntaa acaaagaaat ttgttaattt tatttactaa caggaataaa 1200
65      tagaaccect aacctaaagt ataacctgat cttttacttt ttctatagaa 1250

```

ES 2 316 173 T3

aaacacaaac tggatttctt tttaacataa aaaagacaac acaaaacceca 1300
 cagaaaaata aaactcttct atctaactgg ctttacagat ttccttcatt 1350
 5 agttgtggat gtgactttgg tggctctggg tcaccaccg caagcccgac 1400
 cctgcaactg agtgttcagg ctgccttgtg gtgtctcgga agcattccta 1450
 10 ccagagtaaa agctattctc ctgagatggc acctttttct ccagaagatt 1500
 cagccctaac agctgccacc ttgaaggatg tatttctactg tcacaggaag 1550
 15 cagccaagta tggggggccat ggtcccggca tgcacctggc tggctacacg 1600
 ccccgccccct caggagtccct cagagtccac tggcctctgc tgctactgcc 1650
 ctgaaagcca tctgtggctt taactggttg ttttaacagg tttcaagaga 1700
 20 tgttcatttt attttttgtt tagatttaag atgtcctaaa aaatgtatat 1750
 attaagatac acttaaaaaac atactctgaa tataataaaa aagatggttg 1800
 25 ttcaaaaaag ggtcaacaag aagaggaagc caagcttccct agcatctggt 1850
 tttgtggcca cgcttttccc cattaatggt gtgaaagtct gaatcaacag 1900
 30 caaatacagc catacagacc tatgtatctg tgtgcatgag tgtgcatggg 1950
 tgtgcacaca gagaagtaca tcttggtcga cttaagaaaa aattatctgt 2000
 gttgtgtccc acaaacactt gctggtggcc tttcaagagt attcacctcc 2050
 35 ctgccgaaga gacagcttga gtatggaggt ttaaaaacaa tccagacagg 2100
 tgctccctgt tgcctctggt acctaggatt gaggcagttt ggtgcatgta 2150
 40 ttacagtacc gaaagcaaat gtcactttct gatctccaca ggaaccactc 2200
 cctaaaacat gaaactactg accaacactt gctttcctcc gcatagcact 2250
 45 ttgtctgtgt tcatatgtgt caacacaact ggactaagaa agaaaagtcc 2300
 caataagaaa gtttcccttt ttgactacag agtgccatac agtctgtggg 2350
 atgttttctg ttggttgttt ttaaatcata agtaactggg tattagcaat 2400
 50 tgacaaaagt gactggtttg aagttttgta ggcagaggtc tctcactttt 2450
 tttctcagat ttttgtctct taaaaaaaaag gcatggtttg catggagttt 2500
 55 caaagctaag aactattggt accatgggtg acctgtgtac ataatgcact 2550
 gtgcattaag tagcccttaa tcaagagagg gttaaccata gtgttcctcc 2600
 60 cttttgctct tctgtacatt ataatgtagc agaacttcat tcttaacatc 2650
 cagattagag gtgtcttctt catattagat ataaattaac cagaggtcta 2700

65

ES 2 316 173 T3

gaactcctaaa tttccagaga tgtgaaaaat gtttaattta cttcaaaaat 2750
 atcttgcata agtatctcat ccctaagctc aaacaacaaa gaaaattaaa 2800
 5 ggcagaaaga atacataaaa ttgagagctc ctcctataat acatatacac 2850
 acactctcga tataggttct acgcagtaaa aggagttggt tcagctaata 2900
 10 tagcttctaa tategatttc atctgaaaat agcctttctg ggtgtcttgc 2950
 cagcatcata cgaaacagca gtacttcttc caccaggact tggagaggtt 3000
 15 tttcatttta tctggagctc tgcttttaga cttctttggc tgttgctgag 3050
 tgtccgagta ttgaatgcca gcgacgatgg ctgcatcaaa gacctctttg 3100
 20 aggttttttt gagtcaaggc tgaacactcg atgtaggagg eggctttgat 3150
 ttctctggcg cacagcttag ccgcctcttc aggcaactggc ttttctttgc 3200
 25 atttgtccaa ctcaatgagg actttgacat cttctctgag atccgactgc 3250
 gttccaacta ggatgatggg ggctttggga cagtggcatc gaatctccgg 3300
 30 caccatttc tcaactgacgt tctggaagga tgaggggctc acgacactga 3350
 agcagagcag gaagatgtct gtggtggtgt agcagagagg cctcagcttg 3400
 35 tcaaattcat cctgtccggc agtgtcacag agttggagtc tcacggggccg 3450
 cccatccaca gacaccaccg cggagaagtt gtcgaaggca gtagggatgt 3500
 40 actcggtggg gtagccgttg gtggtgtaac tcaccaccag gctcgtcttg 3550
 cccaccgcgc cgtcgcgcgac cagcacgcac ttgacgcgcg gccctctggc 3600
 45 accccccgca cgccccggc cccccggctc cccaggcccg cgtccccgcg 3650
 gtccaccgcg ctccccgacg gccggcaccg gaggcgcctc gcagcggtcg 3700
 50 gggaacgcgg ggtccccctg ctgcgggggc atcgatccgc gagcgcgggc 3750
 ttgcggtcgc gggctagcag ggccccggccc gaccgcccct ccgccccgga 3800
 55 gggttgcggt agggaggagc tgtcaccgac agctgcgggc gcgtccccgg 3850
 ccttgagagag tggcggttcc gggccgcacg gccagtagac aaaggcggcc 3900
 60 agggagggtc gtggctccgc gctccggcgg cgccagccgc tctgccttgc 3950
 gctggtggag 3960

65

ES 2 316 173 T3

<210> 3

<211> 258

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 3

10	Met	Pro	Pro	Gln	Gln	Gly	Asp	Pro	Ala	Phe	Pro	Asp	Arg	Cys	Glu
	1				5					10					15
	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly
					20					25					30
15	Arg	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Ala	Gly	Gly	Ala
					35					40					45
	Glu	Gly	Arg	Gly	Val	Lys	Cys	Val	Leu	Val	Gly	Asp	Gly	Ala	Val
					50					55					60
20	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Gly	Tyr	Pro
					65					70					75
	Thr	Glu	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ala	Phe	Asp	Asn	Phe	Ser	Ala	Val	Val
25					80					85					90
	Ser	Val	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Cys	Asp	Thr	Ala
					95					100					105
30	Gly	Gln	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys	Leu	Arg	Pro	Leu	Cys	Tyr	Thr	Asn
					110					115					120
	Thr	Asp	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser	Val	Val	Ser	Pro	Ser	Ser
					125					130					135
35	Phe	Gln	Asn	Val	Ser	Glu	Lys	Trp	Val	Pro	Glu	Ile	Arg	Cys	His
					140					145					150
	Cys	Pro	Lys	Ala	Pro	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Thr	Gln	Ser	Asp	Leu
40					155					160					165
	Arg	Glu	Asp	Val	Lys	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Asp	Lys	Cys	Lys	Glu
					170					175					180
	Lys	Pro	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Cys	Ala	Glu	Glu	Ile
45					185					190					195
	Lys	Ala	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Cys	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Lys	Asn
					200					205					210
50	Leu	Lys	Glu	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Gly	Ile	Gln	Tyr
					215					220					225
	Ser	Asp	Thr	Gln	Gln	Gln	Pro	Lys	Lys	Ser	Lys	Ser	Arg	Thr	Pro
					230					235					240
55	Asp	Lys	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	Lys	Ser	Trp	Trp	Lys	Lys	Tyr	Cys
					245					250					255
60	Cys	Phe	Val												
					258										

<210> 4

<211> 2351

65 <212> ADN

<213> Ratón

ES 2 316 173 T3

<400> 4

atggccccgc agcaaggccg gccggcgctg cccgcccgct gcgagccgcc 50
 5 gggggcgccc ccggtaccgc ctccgagaga gcgcgggggg cgcggggcgc 100
 gcgggccccg ggtgtccggg ggtcgggggc gcgcgggcgg cgccgagggg 150
 10 cgcggcgctca agtgcggtgct ggtcggcgac ggcgcggtgg gcaagaccag 200
 cctggtggtc agctacacca ctaacggcta ccccaccgag tacatcccta 250
 cggccttcga caacttctcg gccgtggtgt ctgtagatgg gcggcctgtg 300
 15 agactccagc tctgtgacac tgcaggacag gatgagtttg acaagctgag 350
 gccctctcgc tacaccaaca cagacatctt cctgctgtgc ttcagcgtgg 400
 20 tgagcccac atccttcag aacgtggggc agaagtgggt tccagagatt 450
 cgacgtcact gcccaaaggc ccccatcatc ctggtcggga cacagtcgga 500
 25 cctcagggag gacgtcaaag tgctcataga actggacaag tgcaaagaga 550
 agccggtgcc tgaagaggcg gcgaagctgt gcgcgaggga agtcaaagct 600
 30 gtctcctaca tcgagtgtc agcgttgact cagaaaaacc tcaaagaggt 650
 tttcgacgcc gccattgttg ctggtatcca gcactcagac tcccagctac 700
 agccaaagaa gtctaaaagc aggaccccgg ataagggtgc ggacctgtcc 750
 35 aagtcttggg ggaggaagta ttgctgctg gcctgactct cgcaaatagc 800
 aggtgtttaa gctgcaacag ctctttatgg acgaggctgt cataggatga 850
 40 gccccaaagc accctcttct gcccttaact tcctgtgtgc gggagcttag 900
 ggctgagatt catatgcaa atacgtttt ttaaaaattg aaagttacat 950
 45 ttttttctg ttaagtctgg aagcttgag ctgtagacct ccggattaat 1000
 ttatattcca tatgaaaagg gctcttcaa gcgggggtgc agcatgaagt 1050
 tctgctgtgt tgtacaggac aaaggagaat gaatgggacc ttctcctgat 1100
 taagggtcac tgagggctca gtgcagggca cgtgtgcacc aggcttgggtg 1150
 55 agagtgagca agcgtgagct ttgaaaccac acgagccacc cccggttttg 1200
 taagggcaaa gatctgaaac cagcaagggc cttctgctta cgaaacctcg 1250
 agcccatccc ttctgtttac tcagattctc ttaggatttt aaaacaacca 1300
 60 aacatcccac agcctactgg catagtgttg gcgaacagtg cacttgcttg 1350
 ttacggtttt gttttgtttt tttaaatcac gtgaccagtt atattgctat 1400
 65 gaaaatggtg gagatgcctc gtagaaggcg agtgctgggt gcacatgtga 1450

ES 2 316 173 T3

cattttcttc agggagcgac tcatggtgag accagagagg gctcttagct 1500
tgcaggactg gcttctgcag ggcattctgtg tcctgctggt aaaagcagga 1550
5 ggaggtgctt gtctgggagc ttttaagtgtg ctgggctcat atcgtcccgt 1600
ttgcaaggaa ttgggccacc ttgagaggcc atagttgatg gctatgggac 1650
10 acacacacac tttttcctta agtccaccaa aatgcctgcc tgtacacaca 1700
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacactggct ggtttgcctga 1750
15 tggaaacctt agaccacctt cccacccccca cccctcccca agcatggctg 1800
caagtgtcag ggcaccacac cttcctcttc ttgacatttc tttgaacaga 1850
catcattttg taggatctta atttatacat ttttttcagg tcataaaatg 1900
20 tgggatgaac atactttgaa ccccagtgcc ttcaggggcc attgactagg 1950
gaggcactgt cttaggggac aggtatgtgc aaggccttac ccaccagtgg 2000
25 cttctcgctg caggtcatgt ttgtggcact tgttctttaa ggtgagggtc 2050
ttatgaccga ctgttctgag acagccctgt gtcaggcaag ctctttcaca 2100
30 gggttgtagg tatttccaag acgccatagg aaccagacag tgaatcatag 2150
ctatcagttt gctgtgggca aggaacctct ttttggccac ctggtaacaa 2200
35 aattttatgt ctgtaaattt tttcttgcta tttaaaaaaa aaaaaaaaaa 2250
a 2251

40 <210> 5
<211> 2251
<212> ADN
<213> Ratón

45 <400> 5

tttttttttt ttttttttaa atagcaagaa aaaatttaca gacataaaat 50
50 tttgttacca ggtggccaaa aagaggttcc ttgcccacag caaactgata 100
gctatgattc actgtctggt tcctatggcg tcttggaat acctacaacc 150
55 ctgtgaaaga gcttgectga cacagggctg tctcagaaca gtcggtcata 200
agaccctcac cttaaagaac aagtgccaca aacatgacct gcagcgagaa 250
gccactggtg ggtaaggcct tgcacatacc tgtcccctaa gacagtgcct 300
60 ccctagtcaa tggaccctga aggcactggg gttcaaagta tgttcatccc 350
acattttatg acctgaaaaa aatgtataaa ttaagatcct acaaaatgat 400
65 gtctgttcaa agaaatgtca agaagaggaa ggtgtggtgc cctgacactt 450

ES 2 316 173 T3

gcagccatgc ttggggaggg gtgggggtgg gaggggtggc taagggttcc 500
 atcagcaaac cagccagtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 550
 5 gtgtgtgtac aggcaggcat tttgggtggac ttaaggaaaa agtgtgtgtg 600
 tgteccatag ccatcaacta tggcctctca aggtggccca attccttgca 650
 10 aacgggacga tatgagccca gcacacttaa agctcccaga caagcacctc 700
 ctectgcttt taacagcagg acacagatgc cctgcagaag ccagtcctgc 750
 15 aagctaagag ccctctctgg tctcaccatg agtcgctccc tgaagaaaat 800
 gtcacatgtg caccacgac tcgccttcta cgaggcatct ccaccathtt 850
 catagcaata taactggta cgtgatttaa aaaaacaaaa caaaaccgta 900
 20 acaagcaagt gcactgttcg ccaacactat gccagtaggc tgtgggatgt 950
 ttggttgttt taaaatccta agagaatctg agtaaacaga agggatgggc 1000
 25 tcgaggtttc gtaagcagaa ggcccttgct ggtttcagat ctttgccctt 1050
 acaaaaaccgg ggggtggctcg tgtggtttca aagctcacgc ttgctcactc 1100
 tcaccaagcc tgggtgcacac gtgccctgca ctgagccctc agtagccctt 1150
 30 aatcaggaga aggtcccatt cattctectt tgtcctgtac aacacagcag 1200
 aacttcatgc tgacaccccg ctttgaagag cccttttcat atggaatata 1250
 35 aattaatccg gaggtctaca gctcaaagct tccagactta acagaaaaaa 1300
 aatgtaactt tcaattttta aaaaaacgta ttttgcatat gaatctcagc 1350
 40 cctaagctcc cgcacacagg aagttaaggg cagaagaggg tgctttgggg 1400
 ctcatcctat gacagcctcg tccataaaga gctgttgtag cttaaacaac 1450
 tgctatattgc gagagtcagg ccaggcagca atacttcctc caccaagact 1500
 45 tggacaggtc ccgcacctta tccggggctc tgcttttaga cttctttggc 1550
 tgtagctggg agtctgagtg ctggatacca gcaacaatgg cggcgtcgaa 1600
 50 aacctctttg aggtttttct gagtcaacgc tgagcactcg atgtaggaga 1650
 cagctttgac ttectccgcg cacagcttcg ccgcctcttc aggcaccggc 1700
 55 ttctctttgc acttgtccag ttctatgagc actttgacgt cctccctgag 1750
 gtccgactgt gtcccagcca ggatgatggg ggcctttggg cagtgacgtc 1800
 gaatctctgg aacccacttc tcgcccagct tctggaagga tgtggggctc 1850
 60 accacgctga agcacagcag gaagatgtct gtgttgggtg agcagagggg 1900

65

ES 2 316 173 T3

cctcagcttg tcaaaactcat cctgtcctgc agtgteacag agctggagtc 1950
5 tcacaggccg cccatctaca gacaccacgg ccgagaagtt gtcgaaggcc 2000
gtagggatgt actcgggtggg gtagccgtta gtggtgtagc tgaccaccag 2050
10 gctgggtcttg cccaccgcgc cgtcgcgcgac cagcacgcac ttgacgccgc 2100
gtccctcggc gccgcccgcg cgccccgcac ccccggacac cccgggcccg 2150
15 cgcgccccgc gccccccgcg ctctcggcga ggcggtaccg gcggcgcccgc 2200
cggcggctcg cagcgggcgg gcagcgccgg ccggccttgc tgcggggcca 2250
20 t 2251

<210> 6

<211> 261

25 <212> PRT

<213> Ratón

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 173 T3

<400> 6

5	Met	Ala	Pro	Gln	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala	Leu	Pro	Ala	Arg	Cys	Glu
	1				5					10					15
	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Gly	Gly
					20					25					30
10	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Ala
					35					40					45
	Gly	Gly	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Val	Lys	Cys	Val	Leu	Val	Gly	Asp
					50					55					60
15	Gly	Ala	Val	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn
					65					70					75
	Gly	Tyr	Pro	Thr	Glu	Tyr	Ile	Pro	Thr	Ala	Phe	Asp	Asn	Phe	Ser
20					80					85					90
	Ala	Val	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Cys
					95					100					105
25	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys	Leu	Arg	Pro	Leu	Cys
					110					115					120
	Tyr	Thr	Asn	Thr	Asp	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser	Val	Val	Ser
					125					130					135
30	Pro	Thr	Ser	Phe	Gln	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Trp	Val	Pro	Glu	Ile
					140					145					150
	Arg	Arg	His	Cys	Pro	Lys	Ala	Pro	Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Thr	Gln
35					155					160					165
	Ser	Asp	Leu	Arg	Glu	Asp	Val	Lys	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Asp	Lys
					170					175					180
40	Cys	Lys	Glu	Lys	Pro	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Leu	Cys	Ala
					185					190					195
	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Val	Ser	Tyr	Ile	Glu	Cys	Ser	Ala	Leu	Thr
45					200					205					210
	Gln	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Gly
					215					220					225
50	Ile	Gln	His	Ser	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Pro	Lys	Lys	Ser	Lys	Ser
					230					235					240
	Arg	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Arg	Asp	Leu	Ser	Lys	Ser	Trp	Trp	Arg
55					245					250					255
	Lys	Tyr	Cys	Cys	Leu	Ala									
60					260	261									

<210> 7

<211> 2822

<212> ADN

65 <213> Ratón

ES 2 316 173 T3

<400> 7

cccacgcgtc cgctgaatgt atgttggtta gaaagtagcc tttctgcttc 50
5 ctgcccacatgg ccagttctcc accctctctt tgggtgctctt tgtggggagg 100
gcactgtggt ttgtcgcagc cctggacttc gagaggctcc cagaaccag 150
10 gatcaccagc ctctgtctg tttgcttcac tcctttccca gggaggactt 200
gggactgtcc tgtctgacag gacggatctg agttcccgaa gcaaaccagc 250
15 tcaccacata gatagctagt ttaaacaatg ttttaaata agggcacctc 300
tgtttcaaaa gtgacatctg ctgtgttgtt ttcgaggcct gatactctta 350
20 caaggtttga aaaaaaatgt gtgtatccat tcatgggctt ggtagccttc 400
tggtcacctc agtcctgtgg ctcttaactt attgcccaac aatattcatt 450
25 tcccctcagc tacaatgaat tgcaagcaaa agatggtgaa aaaaagcact 500
aatttagttt aaaatgtcac tttttggttt ttattctaca aaaaccatga 550
30 agttctctct ctctctctct ctctctctta gttgttaaat cagattatgt 600
35 tctttttttg tttttgtttt tagtgattca tgtttatgag cagagtggag 650
ttaacaatc ctagctttaa aaaaaaccta ttaaatgtaa gatattctac 700
40 gcatecttca gatattttgt atatccccta tggcctttag tctgtacttt 750
taatgtacat atttctgtct tgtgtgattt gtagatttca ctggttaaaa 800
45 gagagaacat tgaaaggctt atgccaagtg gaagatagaa tataaaataa 850

50

55

60

65

ES 2 316 173 T3

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

```

aaatgttact tgtatattgg taagaggttt cagttgtect tcagctaatt 900
catgtagaga aatatttttag ttgaagccac aagagacagc ttagggcagt 950
tatgtgttca aataacagaa gaacagactt tttttttttt ttaaaccaaa 1000
cccaaactgt tgggaaacct caatagagct ctatatgtat tggaaacaaaa 1050
gtggaattct cttctoctat atatgttccct tcaaaaagag agagagaatc 1100
aagcagatgg cttaaagctg gtcacaggat tgctcacatt cttttggcat 1150
tatgcatgcg acttaattgt ttgagagtgt gttgctattg taacatccca 1200
gagatgaatc aaaaaggctc accctctcac ccaggagcag cttttcagct 1250
tatatacaca tgcattgtaca tgtgtgtgat atgcatgtgt gcatgcatgt 1300
ttgtattttt gtgcttgcca ctataactat tgcacctctc tatteggttt 1350
gactgaagag gggctctgtg ggacatctct gtgtcccagt ctttatggga 1400
agaaagcaag ggtctgcaga gaacaggaac taaagaatcc ctgtgtgatg 1450
tgcaattaat agaaggcctc ctgctttctg gaaatgtaga ccagaatctg 1500
gccaggactg tagactgata cattatctgg tcctttgcct ttttcttttc 1550
cctcccctgc cctcccctc ttgctttatg gataaccttg taacatattg 1600
aaacctttaa aggaaaccaa gaatgcatta ttacacacac acacacacac 1650
acacacacac acacacacac acacacacta cagtagacca acatatagag 1700
tgtttaaaat agcttttctg ggcaaattca aacaacttgt ggctctagga 1750
cgcacatctg tttccgtttt tcttcagttg tatattgacc agtattcttt 1800
attgctaaaa catatactcg gggtagcaat gtcagcatct tttcccttcc 1850
catcctggag agcattcaag accttcccag tacaggaaca tcaatgaagc 1900
atztatatac aggcggtggc aagcagaacc acatccaaaa tggtcagtgt 1950
cgggctctag ggcaaggcta tcttgttcca gtccctgtttc tttgtgetcc 2000
tgacctttgg ggctgccact tcccaggacg accactgcct gccacactg 2050
tccccccctc ccccggggg gattttccca atagccagtt cccatgtgtc 2100
tttttctgca acggtattca agccaatgga accttcagat agggcccaag 2150
agcaggatga cacaacctgt ggacaagagc tatattaact tgatcactag 2200
tatgagctaa tattaacatg atcacccatg aaaggcgctt gcaagagctg 2250
tttagtctga aatataggta gagagcgggg atggcaaggt tgcttgtaac 2300
  
```

65

ES 2 316 173 T3

ttctggtaca tgttgaatgc acacacgcac ggaggcaagc tctaaatcac 2350
5 tgcactgtta ctgtaaagca tactttaaaa atatttattg ttttgaaaag 2400
cattttctag tcttcctct cttggtggag ctgtaaacia gatggcatgt 2450
10 tgtgaagggt caagatgatt tttttttaa tgcagaaac atttagacac 2500
ctaagaacta aaacttataa aagggatctt tgaatttgcc tgtaacatg 2550
15 gattaatggt tacacttaca gctgatgatt ggacgggtgt ttatgtagg 2600
gaaatgcctt gttaacgaac ttcataaagc agatgtaatt aaagggtgat 2650
20 gtgagccaat ctagaagggt gaacagtgtt ttcaaagaac ggagagactt 2700
acattttaga ccaatcttta tacattttgc tgagctagaa aggagataaa 2750
25 gattatttat ttttgttcat atcttgact tttctattaa aatcatttta 2800
tgaaawmmaa aaaaaaaaaa aa 2822

30
<210> 8
<211> 727
<212> ADN
35 <213> Ratón

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 173 T3

<400> 8

cccacgcgctc cgcataatgtc tcctttgtga ggatcaacag ctcgctggca 50
5 gtggcggcctt acgaggatgg gatccttaac atttgggacc tgagaaccgg 100
aaggttccct atctttcgtt ttgagcatga cgcaagaata caagcccttg 150
10 cgctgagcca agaaaagccc attggtgcca cggcttctgc ttttgacggt 200
gtgatgttgt accccaacga ggaggggcat tggcatgtgg cctcggagtt 250
15 tgaagttcag aagctgggtg actaccctga aatagttccg aatactggga 300
ggtagcctgt ggcaatagcc acagccgggg atctggtgta cctgctgaag 350
20 gccgacgact cagccagaac ccttcattat gtcaatggcc agcctgccac 400
atgtctggat gtctcagcca gccagggtgc ctttggagtg aagagtctag 450
gatgggtgta tgaaggaaac aagatcctgg tgtacagcct ggaagcagag 500
30 cgctgcctct cgaagctggg caatgcactt ggagacttta cctgtgtcaa 550
catccgggat agccctccca acctcatggt cagcggcaac atggacagga 600
35 gagtgaggat tcatgacctc cgcagcgata agatcgcect gtcgctgtct 650
gcccatacagc tgggggtgtc cgcaattcca aatggataac tggaaagggt 700
40 gtcagtggag gccaggaggg gtggtgt 727

<210> 9

45 <211> 2526

<212> ADN

<213> Ratón

50

55

60

65

ES 2 316 173 T3

<400> 9

cccacgcgtc cgcataatgtc tcctttgtga ggatcaacag ctcgctggca 50
 5 gtggcggcctt acgaggatgg gatccttaac atttgggacc tgagaaccgg 100
 aaggttccct atctttcgtt ttgagcatga cgcaagaata caageccttg 150
 10 cgctgagcca agaaaagccc attggtgcca cggcttctgc ttttgacggt 200
 gtgatgttgt accccaacga ggaggggcat tggcatgtgg cctcggagtt 250
 15 tgaagttcag aagctgggtg actaccttga aatagttccg aatactggga 300
 ggtaccctgt ggcaatagcc acagccgggg atctggtgta cctgctgaag 350
 20 gccgacgact cagccagaac ccttcattat gtcaatggcc agcctgccac 400
 atgtctggat gtctcagcca gccaggttgc ctttggagtg aagagtctag 450
 25 gatgggtgta tgaaggaaac aagatcctgg tgtacagcct ggaagcagag 500
 cgctgcctct cgaagctggg caatgcactt ggagacttta cctgtgtcaa 550
 30 catccgggat agccctccca acctcatggt cagcggcaac atggacagga 600
 gagtgaggat ccatgacctc cgcagcgata agatcgccct gtcgctgtct 650
 35 gcccatcagc tgggggtgtc cgcagtccag atggatgact ggaaggttgt 700
 cagtggaggc gaggaggggc tgggtgtctgt gtgggattac cgcataaacc 750
 40 agaagctgtg ggaagtgcac tccaggcacc ctgtgcgcta tctctccttc 800
 aatagccaca gcctcatcac tgccaacgtg ccctacgaga aggtgctgcg 850
 45 aaactccgac ctcgacaact ttgcctgtca caggagacat cgtggcctga 900
 tccatgccta tgaatttgct gtggaccagc tggcctttca gagccccctt 950
 50 cctgtctgcc gcttaccocg tgacatcatg gctggatata gctatgacct 1000
 cgcactgtct ttcccccatg acagtattta ggggtgtcacc tcatgtagac 1050
 55 gtggaaaggg cagttttaca aatgttagag ttggagagag gctctgcagc 1100
 acatggtggg agtttgggga cagtgtcctg tatgactgtg gccacacagc 1150
 60 cctgttgccc tgtacagaac cagactccat tgctgccttt ctctctctcc 1200
 tctctctct caggctttgg taggactggc tgatgactca gagttaacct 1250
 65 ttccaggggt ggctcctccc cctcagccta tggcagcagt gacaccccc 1300

ES 2 316 173 T3

5 ctcgttccat aggccagggga cacagggcct tcaacttgca tgtctcctgg 1350
 gtgtgggtgct gaggggtggaa ccagaatctc acacgcatag gcaagegtca 1400
 gcctccaagc tgccctcccca gctgtcagcc tcccagctg tctcctccag 1450
 gcaccctcca gtgcagcccc tcctctggga ttcacaccgt tgataattat 1500
 10 agggccacct tacctgtagg agctgttctg tcctgtacat gtgctatgaa 1550
 ggagacagcc atccttcctg cagagggaaa gggtcattgc acagggatag 1600
 ggtcagtctc caagcctagc cggtgggtgtc tctcctgac aaacgcagcc 1650
 atagctcacc cactctgcct tcagagtgtc atggacaaat ccacacatag 1700
 tggccaggag acccagtcag agctcttcag aatccccaca gaccaggcac 1750
 20 ctaacacacc tgcacagagg ccaccaggtc tcaggagaca aagttcctct 1800
 cccaggggat accagctcaa aaaacaagtg ggctggcaaa ctccacattg 1850
 ggctctgccga gagcaagaaa aaagaggggg gtgggggagc tccatggggg 1900
 ggatcccagg ctggcagcag gaaggtgctg gaaggcctga gaggggtgtgc 1950
 agtgcctcc ccgagccctg gtggctctct cctgtgtgct gggatggagt 2000
 ctagtggggt tgtggcatga tctcagatct tggcattgag gcctctcccc 2050
 atgcacaagt gcccagggga gctcaccctc ctcttgctgg gctggcgccc 2100
 35 cctgctggcc tggctctgct gtgtcctcac tcgagcattc ccagtccctaa 2150
 gctgtccact ggagacattt ctgtcagaga aattggctgt gcggtcagct 2200
 cctttctggg cttcgcagcc atgaaaggcc actgaagagc agaggtgact 2250
 agagtagttt caagcataca tgcccttcta gcccccaatc cctgccccct 2300
 acccccacag agcatctgtc ctgctgggt cctgccactg cacctgctcc 2350
 caggggtgggg gacaggctgg ctccctgtgc tgcctctgaa gccagaagac 2400
 accaggacac agccctggga gccaggggtg gtcacacatc tgcagcttgc 2450
 50 cttttgctt aagcggccac ttctgctctg ttattaaagg ttctacactg 2500
 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2526

55 <210> 10
 <211> 2526
 <212> ADN
 60 <213> Ratón

65

ES 2 316 173 T3

<400> 10

tttttttttt tttttttttt ttttttcagt gtagaacctt taataacaga 50
 5 gcagaagtgg ccgcttaagg caaaaggcaa gctgcagatg tgtgaccacc 100
 cctggctccc agggctgtgt cctgggtgtct tctggcttca gaggcagcac 150
 10 agggagccag cctgtceccc accctgggag caggtgcagt ggcaggagcc 200
 agcgaggaca gatgctctgt gggggtaggg ggcagggatt gggggctaga 250
 agggcatgta tgcttgaaac tactctagtc acctctgctc ttcagtggcc 300
 15 tttcatggct gcgaagccca gaaaggagct gaccgcacag ccaatttctc 350
 tgacagaaat gtctccagtg gacagcttag gactgggaat gctcgagtga 400
 20 ggacacagca agaccaggcc agcagggggc gccagcccag caagagggag 450
 gtgagctccc ctgggcactt gtgcatgggg agaggcctca atgccaagat 500
 ctgagatcat gccacaaacc cactagactc catcccagca cacaggagga 550
 25 gaccaccagg gctcggggag ggcaactgac acctctcag gecttccagc 600
 accttctctc tgccagcctg ggatccacc catggagctc cccaccccc 650
 30 ctcttttttc ttgctctcgg cagacccaat gtggagtttg ccagcccact 700
 tgttttttga gctgggtattc cctgggagag gaactttgtc tccctgagacc 750
 35 tggtggcctc tgtgcagggtg tgttaggtgc ctggctctgtg gggattctga 800
 agagctctga ctgggtctcc tggccactat gtgtggattt gtccatgaca 850
 ctctgaaggc agagtgggtg agctatggct gcgtttgtea ggaagagaca 900
 40 ccaccggcta ggcttgagaga ctgacctat cctgtgcaa tgacccttcc 950
 cctctgcagg aaggatggct gtctccttca tagcacatgt acaggacaga 1000
 45 acagctccta caggttaaggt ggccctataa ttatcaacgg tgtgaatccc 1050
 agaggagggg ctgcactgga ggggtgcctgg aggagacagc tggggaggct 1100
 gacagctggg gaggcagctt ggaggctgac gcttgcctat gcgtgtgaga 1150
 50 ttctgggtcc acctcagca ccacaccag gagacagtgc aagtgaaggc 1200
 cctgtgtccc tggcctatgg aacgaggggg ggtgtcactg ctgccatagg 1250
 55 ctgaggggga ggagccacc ctggaaaggt taactctgag tcatcagcca 1300
 gtcctaccaa agcctgagga ggaggaggag gaggagaaag gcagcaatgg 1350
 60 agtctggttc tgtacagggc aacagggctg tgtggccaca gtcatacagg 1400
 aactgtccc caaactccca ccatgtgtctg cagagcctct ctccaactct 1450
 aacatttgta aaactgcctt tccacgtct acatgagggtg acaccctaaa 1500
 65

ES 2 316 173 T3

tactgtcatg ggggaaagac agtgcgaggt catagctgta tccagccatg 1550
 atgtcacggg gtaagcggca gacaggaagg gggctctgaa aggccagctg 1600
 5 gtcacacagca aattcatagg catggatcag gccacgatgt ctctctgtgac 1650
 aggcaaagtt gtcgaggtcg gagtttcgca gcaccttctc gtagggcacg 1700
 10 ttggcagtga tgaggctgtg gctattgaag gagagatagc gcacaggggtg 1750
 cctggagtgc acttcccaca gcttctgggt catgcggtaa tcccacacag 1800
 acaccagccc ctctctgcct ccaactgacaa ccttccagtc atccatctgg 1850
 15 actgcggaca cccccagctg atgggcagac agcgacaggg cgatcttate 1900
 gctgcggagg tcatggatcc tcaactctct gtccatgttg ccgctgacca 1950
 20 tgagggtggg agggctatcc cggatgttga cacaggtaaa gtctccaagt 2000
 gcattgcca gcttcgagag gcagcgctct gcttccaggc tgtacaccag 2050
 gatcttgttt ccttcataca cccatcctag actcttcaact ccaaaggcaa 2100
 25 cctggctggc tgagacatcc agacatgtgg caggctggcc attgacataa 2150
 tgaagggttc tggctgagtc gtcggccttc agcaggtaca ccagatcccc 2200
 30 ggctgtggct attgccacag ggtacctccc agtattcgga actatttcaa 2250
 ggtagtcaac cagcttctga acttcaaact ccgaggccac atgccaatgc 2300
 35 cctcctcgt tggggtaaaa catcacaacg tcaaaagcag aagccgtggc 2350
 aacaatgggc ttttcttggc tcagcgcaag ggettgtatt cttgcgtcat 2400
 gctcaaaacg aaagataggg aaccttccgg ttctcaggtc ccaaagtta 2450
 40 aggatcccat cctcgtgaagc cgccactgcc agcgagctgt tgatcctcac 2500
 aaaggagaca tatgcgagc cgtggg 2526

45 <210> 11
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Ratón

50 <400> 11
 cagaggggtg gtgggaaaga gtgaattatt taattttaa tggtataata 50
 55 aagccaatgt agttgagacc aaggaaatga gcattgagaa cacaaacttg 100
 aagtctgggt ccagggttgt tggacctcac accctgtctc tgagccacc 150
 60 ggaagtgaca taaaggacgc tgtgtgatca agttctggac acttttctgg 200
 gatg 204

<210> 12
 65 <211> 2224
 <212> ADN
 <213> Ratón

ES 2 316 173 T3

<400> 12

5 cccacgcgtc cgcgcggtgg gcaagaccag cctggtggtc agctacacca 50
 ctaacggcta cccacccgag tacatcccta cggccttcga caacttctcg 100
 gccgtgggtg ctgtagatgg gcggcctgtg agactccagc tctgtgacac 150
 10 tgcaggacag gatgagtttg acaagctgag gccctctgc tacaccaaca 200
 cagacatctt cctgctgtgc ttcagcgtgg tgagccccac atccttccag 250
 aacgtggggc agaagtgggt tccagagatt cgacgtcact gcccaaaggc 300
 ccccatcctc ctggtcggga cacagtcgga cctcagggag gacgtcaaag 350
 20 tgctcataga actggcttct gcagggcctc tgtgtcctgc tgtaaagaagc 400
 aggaggaggc gcttgtctgg gagctttaag tgtgctgggc tcatatcgtc 450
 ccgtttgcaa ggaattgggc caccttgaga ggccatagtt gatggctatg 500
 ggacacacac acactttttc cttaagtcca ccaaaatgcc tgccctgtaca 550
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacact ggetggtttg 600
 30 ctgatggaac ccttagacca ccctcccacc cccacccctc cccaagcatg 650
 getgcaagtg tcagggcacc acaccttctt cttcttgaca tttctttgaa 700
 cagacatcat tttgtaggat ctttaatttat acattttttt caggtcataa 750
 aatgtgggat gaacatactt tgaaccccag tgccttcagg gtccattgac 800
 40 tagggaggca ctgtcttagg ggacaggtat gtgcaaggcc ttaccacca 850
 gtggcttctc gctgcaggtc atgtttgtgg cacttgttct ttaagggtgag 900
 ggtcttatga cegactgttc tgagacagcc ctgtgtcagg caagctcttt 950
 cacagggttg taggtatttc caagacgcca taggaaccag acagtgaatc 1000
 50 atagctatca gtttgctgtg ggcaaggaac ctcttttttg ccacctggta 1050
 acaaaatttt atgtctgtaa attttttctt gctatttaaa aaaaaaaaaat 1100
 caatcttacg tttttctgta ggaaaaaaaa aaacaagtaa aagaacaggc 1150
 catatttcag gtcaaaggct tcttctctgct ggtaaattgg actgaagact 1200
 ttcttacatc attattaaaa ggctaattgc tgaaccacta gagtatatga 1250
 60 actgtttgtg aatgatatta gccatagtct cctgaggtgt tctcttgtgg 1300

65

ES 2 316 173 T3

cctgagtggg aacattgttt tgcttatgga gatgctgtaa ctgacctagt 1350
 gactcagctt atcctattgt gcatggctgt ctggaaagcc agcgtacaag 1400
 5 tggggccttg cctgcectgt gtacagaggg tgggtgggaa agagtgaatt 1450
 atttaatttt aatgttata ataaagccaa tgragttagg accaaggaaa 1500
 10 tgagcattga gaacacaaac ttgaagtctg gtgccagggt tgttggacct 1550
 cacaccctgt ctctgagcca cccggaagtg acataaagga cgctgtgtga 1600
 15 tcaagttctg gacacttttc tgggatgcgt accactggac tatttatgtc 1650
 acaaactctag tgggttgacg ctgccctgca agttttcaat gtcctctgat 1700
 cctatgaagt cataatgtct gactgtactg gaggttttcc tgcatttttt 1750
 20 acttttcgaa aatagagggt tgggctgaga attctaaacg catgtgcctg 1800
 ggtgggacgt caagtcaggg ttctcatcaa agctgagaag tggctggaat 1850
 25 gttcagcttg gtgtctgggg aggatcctgt gagctatgta gagagggtggc 1900
 tcttcagcct gactcagtgt gggctgaacg aagtacctgc agaacacacg 1950
 30 gtagcaggct ccaaaatcgt cacctcaagc atgcgtgcaa gcaaacttcc 2000
 gagaactccg ttttctgctc ggcagacgtg tgagcagcta cccagaagtc 2050
 35 tcaagccaaa aggggagcct cgctcgctgg ctctctgca ggtgccttat 2100
 cgacctgtgc tcttctcttt tcccggtgca aagatggttg acaggatctt 2150
 40 gtacttgaaa catactacaa atgagttact atgaaataaa ttctgacctg 2200
 tggaccgaaa aaaaaaaaaa aaaa 2224

45 <210> 13
 <211> 2004
 <212> ADN
 <213> Ratón
 50
 <400> 13

cccacgcgct cgcacgtgac cagttatatt gctatgaaaa tgggtggagat 50
 55 gcctcgtaga aggcgagtgct tgggtgcaca tgtgacattt tcttcagggga 100
 gcgactcatg gtgagaccag agagggctct tagcttgacg gactggcttc 150
 60 tgcaggggcat ctgtgtcctg ctgttaaaag caggaggagg tgcttgtctg 200
 ggagctttaa gtgtgctggg ctcatatcgt cccgtttgca aggaattggg 250
 ccaccttgag aggccatagt tgatggctat gggacacaca cacacttttt 300
 65 ccttaagtc accaaaatgc ctgcctgtac acacacacac acacacacac 350

ES 2 316 173 T3

acacacacac acacacacac tggctggttt gctgatggaa cccttagacc 400
 accctcccac ccccaccctt ccccaagcat ggctgcaagt gtcagggcac 450
 5 cacaccttcc tcttcttgac atttctttga acagacatca tttttagga 500
 tcttaattta tacatttttt tcaggtcata aaatgtggga tgaacatact 550
 10 ttgaacccca gtgccttcag ggtccattga ctagggaggg actgtcttag 600
 gggacaggta tgtgcaaggg cttaccacc agtggcttct cgctgcaggt 650
 15 catgtttgtg gcacttgttc ttttaagggtga gggctcttatg accgactggt 700
 ctgagacagc cctgtgtcag gcaagctctt tcacaggggt gtaggtattt 750
 ccaagacgcc ataggaacca gacagtgaat catagctatc agtttgctgt 800
 20 gggcaaggaa cctctttttg gccacctggt aacaaaattt tatgtctgta 850
 aattttttct tgctatttca aaaaaaaaaa tcaatcttac gtttttctgt 900
 25 aggaaaaaaaa aaaacaagta aaagaacagg ccatatttca ggtcaaaggg 950
 ttcttctgctc tggtaaatgg gactgaagac tttcttacct cattattaaa 1000
 30 aggctaattg ctgaaccact agagtatatg aactgtttgt gaatgatatt 1050
 agccatagtc tctgaggtg tttccttggt gcctgagtg taacattggt 1100
 ttgcttatgg agatgctgta actgacctag tgactcagct tatectattg 1150
 35 tgcattggctg tctggaaagc cagcgtacaa gtggggcttt gcctgccctg 1200
 tgtacagagg gtgggtggga aagagtgaat tatttaattt taaatggtat 1250
 40 aataaagcca atgtagttga gaccaaggaa atgagcattg agaacacaaa 1300
 cttgaagtct ggtgccaggg ttgttgacc tcacaccctg tctctgagcc 1350
 acccggaagt gacataaagg acgctgtgtg atcaagttct ggacactttt 1400
 45 ctgggatgctg taccactgga ctatttatgt cacaaatcta gtgggttgac 1450
 gctgccctgc aagttttcaa tgteccctgca tcctatgaag tcataatgct 1500
 50 tgactgtact ggaggttttc ctgcattttt tacttttoga aaatagaggt 1550
 ttgggctgag aattctaaac gcatgtgcct ggggtgggacg tcaagtcagg 1600
 55 gttctcatca aagctgagaa gtggctggaa tgttcagctt ggtgtctggg 1650
 gaggatcctg tgagctatgt agagaggtgg ctcttcagcc tgactcagtg 1700
 60 tgggctgaac gaagtacctg cagaacacac ggtagcaggg tccaaaatcg 1750
 tcacctcaag catgcgtgca agcaaaactc cgagaactcc gtttttctgt 1800

65

ES 2 316 173 T3

5 cggcagacgt gtgagcagct acccagaagt ctcaagccaa aaggggagcc 1850
tcgctcgcctg gctcctctgc aggtgcctta tcgacctgtg ctcttctctt 1900
10 ttcccgtgtc aaagatggtg gacaggatct tgtacttgaa acatactaca 1950
aatgagttac tatgaaataa attctgacct gtggaccgaa aaaaaaaaaa 2000
aaaa 2004

<210> 14

<211> 1016

15 <212> ADN

<213> Ratón

<400> 14

20 cccacgcgct cgcgccgagg gacgcggcgt caagtgcgtg ctggtcggcg 50
acggcgcggg gggcaagacc agcctgggtg tcagctacac cactaacggc 100
25 taccaccacc agtacatccc tacggccttc gacaacttct cggccgtggg 150
gtctgtagat gggcggcctg tgagactcca gctctgtgac actgcaggac 200
30 aggatgagtt tgacaagctg aggccctct gctacaccaa cacagacatc 250
ttcctgctgt gcttcagcgt ggtgagcccc acatccttcc agaacgtggg 300
cgagaagtgg gttccagaga ttcgacgtca ctgccc aaag gccccatca 350
35 tcctggtcgg gacacagtcg gacctcaggg aggacgtcaa agtgctcata 400
gaactggaca agtgcaaaga gaagccgggtg cctgaagagg cggcgaagct 450
40 gtgcgcgagg gaagtcaaag ctgtctccta catcgagtgc tcagcgttga 500
ctcagaaaaa cctcaaagag gttttcgacg ccgccattgt tgctggatc 550
45 cagcactcag actcccagct acagccaaag aagtctaaaa gcaggacccc 600
ggataagggt cgggacctgt ccaagtcttg gtggaggaag tattgctgcc 650
50 tggcctgact ctcgcaaata gcaggtgttt aagctgcaac agctctttat 700
ggacgaggct gtcataggat gagccccaaa gcacctctt ctgcccttaa 750
cttcctgtgt gcgggagctt agggctgaga ttcatatgca aaatacgttt 800
55 ttttaaaaat tgaaagttac attttttttc tgtaagtct ggaagcttg 850
agctgttaga cctccgatt aatttatatt ccatatgaaa agggctcttc 900
60 aaaagcgggg gtgtcagcat gaagttctgc tgggtgttgt acaggacaaa 950
ggagaatgaa tggggaacct tcctcctgaa ttaaggggct aactgaaggg 1000
65 ctcaattgca agggca 1016

<210> 15

<211> 4075

ES 2 316 173 T3

<212> ADN

<213> Ratón

5 <400> 15

cccacgcgctc cggcgcgagc ttagcagatc tccacttacc gaacatctag 50
 agagtcgcgc cgcgcgccga cggagcggac atgggcagag cgatggtggc 100
 10 caggctaggg ctggggttgc tgcttctggc actgctccta cccacgcaga 150
 tttactgcaa ccaaacatct gttgcaccgt ttcccggtaa ccagaatatt 200
 15 tctgcttccc caaatccaag taacgctacc accagagggg gtggcagctc 250
 cctgcagtc acagctggtc tccctgggctc tctctctctc tcttccacat 300
 20 ctctactggt agagactcag gccaggaaac gtctctactt ccccatcctc 350
 tagacctacc ccaaattggca accacaagtc caatgtgatc aggaagaaac 400
 25 aggtccacct cgaattggct gttaccatat ctcaacagaa aacacggaga 450
 attcgaaatt cgacgggatt aaaggacgcg tgaaaggttt gagagaagag 500
 30 agatgccgct attgaatctg ctggagtttt acatcccaag atgaagacag 550
 cattcagaat tgatgtgatt tccttgaatg tggcttagga aaagtggaca 600
 35 cttaaaaactc tcaactgaaa ttgggcacag gtttgatgta gagataagga 650
 cgggggtgcgg aatggagacc cattttgtca ttgattcacc tgaccgataa 700
 ggccatagtg cagttagggtg atattcgaaa gcttctttga tgctctttat 750
 40 gtatatgttg gaaggaaacta ccaggcgttg ctttaaattc ccaatgtggt 800
 gtttcgttac tactaattta ataccgtaag ctctaggtaa agttccatgt 850
 45 tgttgaactc tgactgttct ctttgggaatt gaacgttttg catcctcctc 900
 ctgtggcttt aggtctgaca ttgtatttga cctttactag taattaacat 950
 50 gtgccaggca atggtggatt ggaaccatc cccaagtcca gccaccactg 1000
 aataaatctg atttcaaaag tcaaacagta gacatttccc attgtcgttt 1050
 55 ctcaactcacc acaagcacca aattcactag agtacactgg ttccagagag 1100
 cagaatcatg ttggccttgg ctaatttcaa aatgctgtct tttactttgg 1150
 60 tatatgttga gggctttttc ataatttaaa gtgtgttctg ttagcaaggc 1200
 aaaaattatg agtcttaatt ctacaggcaa atatgcaaag gagccaaaac 1250
 65 tgtaaaacca gcatttggga tgtgaagact ggaagctaac tctcattgaa 1300

ES 2 316 173 T3

ttcacaaaagt cttttataca atttctgtac atactttttt tttttttaag 1350
 agaaaaacaa acggtggatc agaatagcca cgtttggaaat actttggtta 1400
 5 tccattcata tttttagata gttattggtc ctgtgcctga aagggggctt 1450
 ggttctaccg taagtttttc caatttcctt gatatacaca taccttctaa 1500
 10 aacctagaca tttcctgaaa aaaatctttt gttcgcatgg tcacacactg 1550
 atgettaccg gtacagtagt cttgataacc agagtcattt tctccatctt 1600
 15 tagaaacctt cctgggaaga aggagagctc acagacccga agctactgtg 1650
 tgtgtgaatg aacactcccc ttgcctcaca cctgaatgct gtacatctat 1700
 ttgattgtaa attgtgtttg tgtatttatg ctttgattca tagtaacttc 1750
 20 tcatgttatg gaattgattt gcattgaaca caaactgtaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaagggcg gccgccgcc cgcgatggcc ccgcagcaag gccggccggc 1850
 25 gctgcccgcc cgctgcgagc cgccggcggc gccgccggtc ccgcctcgcc 1900
 gagagcgcg ggggcgcggg gcgcgcgggc ccgggggtgc cgggggtcgg 1950
 30 gggcgcgcgg gcggcgccga gggacgcggc gtcaagtgcg tgctggtcgg 2000
 cgacggcgcg gtgggcaaga ccagcctggg ggtcagctac accactaacg 2050
 35 gctaccccac cgagtacatc cctacggcct tcgacaactt ctcgcccggtg 2100
 gtgtctgtag atgggcggcc tgtgagactc cagctctgtg aactgcagg 2150
 acaggatgag tttgacaagc tgaggcccct ctgctacacc aacacagaca 2200
 40 tcttcctgct gtgcttcagc gtggtgagcc ccacatcctt ccagaacgtg 2250
 ggcgagaagt gggttccaga gattcgacgt cactgcccaa aggccccat 2300
 45 catectggtc gggacacagt cggacctcag ggaggacgtc aaagtgctca 2350
 tagaactgga caagtgcaa gagaagccgg tgcctgaaga ggcggcgaag 2400
 50 ctgtgcgcgg aggaagtcaa agctgtctcc tacatcgagt gctcagcgtt 2450
 gactcagaaa aacctcaaag aggttttoga cgccgccatt gttgctggta 2500
 55 tccagcactc agactcccag ctacagccaa agaagtctaa aagcaggacc 2550
 ccggataagg tgcgggacct gtccaagtct tgggtggagga agtattgctg 2600
 cctggcctga ctctcgcaaa tagcaggtgt ttaagctgca acagctcttt 2650
 60 atggacgagg ctgtcatagg atgagcccca aagcaccctc ttctgccctt 2700
 aacttctctgt gtgcgggagc ttagggctga gattcatatg caaaatacgt 2750
 65

ES 2 316 173 T3

ttttttaaaa attgaaagtt acattttttt tctgttaagt ctggaagctt 2800
 tgagctgtag acctccggat taatttatat tccatatgaa aagggctctt 2850
 5 caaagcgggg tgtcagcatg aagttctgct gtgttggtaca ggacaaagga 2900
 gaatgaatgg gaccttctcc tgattaaggg ctactgaggg ctcaagtgcag 2950
 10 ggcacgtgtg caccaggctt ggtgagagtg agcaagcgtg agctttgaaa 3000
 ccacacgagc ccccccggt tttgtaaggg caaagatctg aaaccagcaa 3050
 15 gggccttctg cttacgaaac ctcgagccca tcccttctgt ttactcagat 3100
 tctcttagga ttttaaaaca accaaacatc ccacagccta ctggcatagt 3150
 gttggcgaac agtgcacttg cttgttacgg ttttgttttg tttttttaa 3200
 20 tcacgtgacc agttatattg ctatgaaaat ggtggagatg cctcgtagaa 3250
 ggcgagtgct ggggtgcacat gtgacatttt cttcagggag cgactcatgg 3300
 25 tgagaccaga gagggtctct agcttgcagg actggcttct gcagggcatc 3350
 tgtgtcctgc tgttaaaagc aggaggaggt gcttgtctgg gagctttaag 3400
 30 tgtgctgggc tcatatcgtc ccgtttgcaa ggaattgggc caccttgaga 3450
 ggccatagtt gatggctatg ggacacacac acactttttc cttaagtcca 3500
 35 ccaaaatgcc tgctgtaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 3550
 cacacacact ggctggtttg ctgatggaac ccttagacca ccctcccacc 3600
 40 cccaccctc cccaagcatg gctgcaagtg tcagggcacc acaccttctt 3650
 cttcttgaca tttctttgaa cagacatcat tttgtaggat cttaatttat 3700
 acattttttt caggtcataa aatgtgggat gaacatactt tgaaccccag 3750
 45 tgccttcagg gtccattgac tagggaggca ctgtcttagg ggacaggtat 3800
 gtgcaaggcc ttaccacca gtggcttctc gctgcaggtc atgtttgtgg 3850
 50 cacttgttct ttaaggtgag ggtcttatga ccgactgttc tgagacagcc 3900
 ctgtgtcagg caagctcttt cacagggttg taggtatttc caagacgcca 3950
 55 taggaaccag acagtgaatc atagctatca gtttgctgtg ggcaaggaac 4000
 ctctttttgg ccacctggta acaaaatttt atgtctgtaa attttttctt 4050
 60 gctatttaaa aaaaaaaaaa aaaaa 4075

<210> 16

<211> 847

65 <212> ADN

<213> Ratón

ES 2 316 173 T3

<400> 16

5 **cgcggtgggc aagaccagcc tgggtggcag ctacaccact aacggctacc 50**
ccaccgagta catccctacg gccttcgaca acttctcggc cgtgggtgtct 100
gtagatgggc ggccctgtgag actccagctc tgtgacactg caggacagga 150
10 **tgagtttgac aagctgaggc ccctctgcta caccaacaca gacatcttcc 200**
tgctgtgctt cagcgtggtg agccccacat ccttccagaa cgtgggcgag 250
15 **aagtgggttc cagagattcg acgtcactgc ccaaaggccc ccatcatcct 300**
ggtcgggaca cagtcggacc tcagggagga cgtcaaagtg ctcatagaac 350
tggtctctgc agggcatctg tgtectgctg ttaaaagcag gaggaggtgc 400
20 **ttgtctggga gctttaagtg tgctgggctc atatcgctcc gtttgcaagg 450**
aattgggcca ccttgagagg ccatagttga tggctatggg acacacacac 500
25 **actttttcct taagtccacc aaaatgcctg cctgtacaca cacacacaca 550**
cacacacaca cacacacaca cacacactgg ctggtttget gatggaaccc 600
30 **ttagaccacc ctcccacccc caccctccc caagcatggc tgcaagtgtc 650**
agggcaccac accttctctt tcttgacatt tctttgaaca gacatcattt 700
tgtaggatct taatttatac atttttttca ggtcataaaa tgtgggatga 750
35 **acatactttg aaccccagtg ccttcagggt ccattgacta gggaggcact 800**
gtcttagggg acaggtatgt gcaaggcctt acccaccagt ggcttct 847

40 <210> 17

<211> 1363

<212> ADN

<213> Ratón

45

<220>

<221> Desconocido

<222> 504

50

<223> Cualquier nucleótido

<400> 17

55 **cccacgcgtc cgtatgaaaa tgggtggagat gcctcgtaga aggcgagtgc 50**
tgggtgcaca tgtgacattt tcttcagggg gcgactcatg gtgagaccag 100
60 **agagggctct tagcttgacg gactggcttc tgcagggcat ctgtgtectg 150**
ctgttaaaag caggaggagg tgcttgtctg ggagctttaa gtgtgctggg 200
ctcatatcgt cccgtttgca aggaattggg ccaccttgag aggccatagt 250
65 **tgatggctat gggacacaca cacacttttt ccttaagtcc accaaaatgc 300**

ES 2 316 173 T3

ctgcctgtac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 350
 tggctggttt gctgatggaa cccttagacc accctcccac ccccaccct 400
 5 ccccaagcat ggctgcaagt gtcagggcac cacaccttcc tcttcttgac 450
 atttctttga acagacatca ttttgtagga tcttaattta tacatttttt 500
 10 tcangtcata aaatgtggga tgaacatact ttgaaccca gtgccttcag 550
 ggtccattga ctagggaggc actgtcttag gggacaggta tgtgcaaggc 600
 cttaccacc agtggcttct cgctgcaggt catgtttgtg gcacttgctc 650
 15 ttttaaggtga gggctttatg accgactgtt ctgagacagc cctgtgtcag 700
 gcaagctctt tcacaggggt gtaggtattt ccaagacgcc ataggaacca 750
 20 gacagtgaat catagctatc agtttgctgt gggcaaggaa cctctttttg 800
 gccacctggt aacaaaattt tatgtctgta aattttttct tgctatttaa 850
 25 aaaaaaaaaat caatcttacg tttttctgta ggaaaaaaaa aaacaagtaa 900
 aagaacaggc catatttcag gtcaaaggct tcttccttct ggtaaattggg 950
 actgaagact ttcttacatc attattaana ggctaattgc tgaaccacta 1000
 30 gagtatatga actgtttgtg aatgatatta gccatagtct cctgaggtgt 1050
 ttccttgtgg cctgagtggt aacattggtt tgcttatgga gatgctgtaa 1100
 35 ctgacctagt gactcagctt atcctattgt gcatggctgt ctggaaagcc 1150
 agcgtacaag tggggctttg cctgccctgt gtacagaggg tgggtgggaa 1200
 40 agagtgaatt atttaatttt aaatgttata ataaagccaa tgtagttgag 1250
 accaaggaaa tgagcattga gaacacaaac ttgaagtctg gtgccagggt 1300
 45 tgttgacct cacacctgt ctctgagcca cccggaagtg acataaagga 1350
 cgctgtgtga tca 1363

<210> 18
 50 <211> 1953
 <212> ADN
 <213> Ratón

55 <400> 18

cccacgcgctc cggtgaccag ttatattgct atgaaaatgg tggagatgcc 50
 60 tcgtagaagg cgagtgctgg gtgcacatgt gacattttct tcagggagcg 100
 actcatgggtg agaccagaga gggctcttag cttgcaggac tggcttctgc 150
 agggcatctg tgtcctgctg ttaaaagcag gaggaggtgc ttgtctggga 200

65

ES 2 316 173 T3

gctttaagtg tgctgggctc atatcgtccc gtttgcaagg aattggggcca 250
 ccttgagagg ccatagttga tggctatggg acacacacac actttttcct 300
 5 taagtccacc aaaatgctg cctgtacaca cacacacaca cacacacaca 350
 cacacacaca cacacactgg ctggtttgct gatggaaccc ttagaccacc 400
 10 ctcccacccc caccctccc caagcatggc tgcaagtgtc agggcaccac 450
 accttcctct tcttgacatt tctttgaaca gacatcattt tgtaggatct 500
 15 aatttataca tttttttcag gtcataaaat gtgggatgaa catactttga 550
 accccagtgc cttcagggc cattgactag ggaggcactg tcttagggga 600
 caggtatgtg caaggcctta cccaccagtg gcttctcgtc gcaggtcatg 650
 20 tttgtggcac ttgttcttta aggtgagggc cttatgaccg actgttctga 700
 gacagccctg tgtcaggcaa gctctttcac agggttgtag gtatttccaa 750
 25 gacgccatag gaaccagaca gtgaatcata gctatcagtt tgctgtgggc 800
 aaggaacctc tttttggcca cctggtaaca aaattttatg tctgtaaatt 850
 30 ttttcttgct atttaaaaaa aaaaatcaat cttacgtttt tctgtaggaa 900
 aaaaaaaaaac aagtaaaaga acaggccata tttcaggtca aaggcttctt 950
 cctgctggta aatgggactg aagactttct tacatcatta ttaaaggct 1000
 35 aattgctgaa ccactagagt atatgaaactg tttgtgaatg atattagcca 1050
 tagtctcctg aggtgtttcc ttgtggcctg agtggtaaca ttgttttgct 1100
 40 tatggagatg ctgtaactga cctagtgact cagcttatcc tattgtgcat 1150
 ggctgtctgg aaagccagcg tacaagtggg gctttgcctg ccctgtgtac 1200
 45 agaggggtggg tgggaaagag tgaattattt aattttcaat gttataataa 1250
 agccaatgta gttgagacca aggaaatgag cattgagaac acaaacttga 1300
 agtctgggtg cagggttggt ggacctcaca ccctgtctct gagccacccg 1350
 50 gaagtgcacat aaaggacgct gtgtgatcaa gttctggaca cttttctggg 1400
 atgcgtacca ctggactatt tatgtcacia atctagtggg ttgacgctgc 1450
 55 cctgcaagtt ttcaatgtcc ctgcatccta tgaagtcata atgtctgact 1500
 gtactggagg ttttctgca ttttttactt ttogaaaata gaggtttggg 1550
 60 ctgagaattc taaacgcatg tgcttgggtg ggacgtcaag tcagggttct 1600
 catcaaagct gagaagtggc tggaaatgtc agcttgggtg ctggggcagg 1650

65

ES 2 316 173 T3

ctccaaaatc gtcacctcaa gcatgcgtgc aagcaaactt ccgagaactc 1700
5 cgttttctgc tccgcagacg tgtgagcagc taccagaag tctcaagcca 1750
aaaggggagc ctcgctcgct ggctcctctg caggtgcctt atcgacctgt 1800
10 gctcttctct tttcccgtgt caaagatggt ggacaggatc ttgtacttga 1850
aacatactac aaatgagtta ctatgaaata aattctgacc tgtggaccga 1900
15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1950

aaa 1953

20 <210> 19
<211> 841
<212> ADN
25 <213> Ratón
<400> 19

cccacgcgtc cgcggacgcg tggttcaggg tccattgact agggaggcac 50
30 tgtcttaggg gacaggtatg tgcaaggcct taccaccag tggcttctcg 100
ctgcaggtea tgtttgtggc acttgttctt taaggtgagg gtcttatgac 150
35 cgactgttct gagacagccc tgtgtcaggc aagctcttcc acagggttgt 200
aggatattcc aagacgccat aggaaccaga cagtgaatca tagctatcag 250
40 tttgctgtgg gcaaggaacc tctttttggc cacctggtaa caaaatttta 300
tgtctgtaaa ttttttcttg ctatttaaaa aaaaaaatca atcttacggt 350
tttctgtagg aaaaaaaaaa acaagtaaaa gaacaggcca tatttcaggt 400
45 caaaggcttc ttctctgctgg taaatgggac tgaagacttt cttacatcat 450
tattaaaagg ctaattgctg aaccactaga gtatatgaac tgtttgtgaa 500
50 tgatattagc catagtctcc tgaggtggtt ccttgtggcc tgagtggtaa 550
cattgttttg cttatggaga tgctgtaact gacctagtga ctcagcttat 600
55 cctattgtgc atggctgtct ggaaagccag cgtacaagtg gggctttgcc 650
tgccctgtgt acagaggggtg ggtgggaaag agtgaattat ttaattttaa 700
60 atgttataat aaagccaatg tagttgagac caaggaaatg agcattgaga 750
acacaaactt gaagtctggt gccaggggtg ttggacctca caccctgtct 800
ctgagccacc cggaagtgac ataaaggacg ctgtgtgatc a 841

65 <210> 20
<211> 14

ES 2 316 173 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> Secuencia artificial
<222> 1-14
<223> La secuencia está sintetizada

10 <400> 20

tttgtacaa gctt 14

15 <210> 21
<211> 44
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <221> Secuencia artificial
<222> 1-44
<223> La secuencia está sintetizada

30 <400> 21

ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc aggt 44

35 <210> 22
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> Secuencia artificial
<222> 1-43
45 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 22

50 tgtagcgtga agacgacaga aaggcgtgg tgcggagggc ggt 43

<210> 23
<211> 10
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <221> Secuencia artificial
<222> 1-10
<223> La secuencia está sintetizada

65 <400> 23

acctgcccgg 10

ES 2 316 173 T3

	<210> 24	
	<211> 11	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
10	<222> 1-11	
	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 24	
15	accgcctcc g	11
	<210> 25	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-22	
30	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 25	
35	ctaatacgac tcaatatagg gc	22
	<210> 26	
	<211> 21	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-21	
	<223> La secuencia está sintetizada	
50	<400> 26	
	tgtagcgtga agacacaga a	21
55	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-22	
65	<223> La secuencia está sintetizada	

ES 2 316 173 T3

	<400> 27	
	tcgagcggcc gcccggcag gt	22
5	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
15	<222> 1-22	
	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 28	
20	agggcgtggt gcgaggcg gt	22
	<210> 29	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-20	
35	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 29	
40	accacgtcc atgcatcac	20
	<210> 30	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-20	
	<223> La secuencia está sintetizada	
55	<400> 30	
	tccaccacc tgttctgta	20
60	<210> 31	
	<211> 163	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<221> Secuencia artificial	

ES 2 316 173 T3

<222> 1-163
<223> La secuencia está sintetizada

5 <400> 31
tgtaatacga ctcactatag ggcgaattgg gcccgacgtc gcatgctccc 50
ggccgccatg gccgcgggat taccactagt gcggccgcct gcaggtcgac 100
10 **catatgggag agctcccaac gcggttgatg catagcttga gtattctata 150**
gtgtcaccta aat 163

15 <210> 32
<211> 163
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Secuencia artificial
25 <222> 1-163
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 32
30 **atttaggtga cactatagaa tactcaagct atgcatccaa cgcggtggga 50**
gctctcccat atggtcgacc tgcaggcggc cgcactagtg attatcccgc 100
35 **ggccatggcg gccgggagca tgcgacgtcg ggcccaattc gccctatagt 150**
gagtcgtatt aca 163

<210> 33
40 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> Secuencia artificial
<222> 1-24
50 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 33

55 cagagggtgg gtgggaaaga gtga

<210> 34
<211> 24
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <221> Artificial
<222> 1-24
<223> La secuencia está sintetizada

24

ES 2 316 173 T3

	<400> 34	
	cacagcgtcc ttatgtcac tcc	24
5	<210> 35	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
15	<222> 1-23	
	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 35	
20	gtggcccatg ctctggcaga ggg	23
	<210> 36	
25	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-24	
35	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 36	
40	gactggagca aggtcgtcct cgcc	24
	<210> 37	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-24	
	<223> La secuencia está sintetizada	
55	<400> 37	
	gcaccaccca caaggaagcc atcc	24
60	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<221> Secuencia artificial	

ES 2 316 173 T3

	<222> 1-24	
	<223> La secuencia está sintetizada	
5	<400> 38	
	gacgaaaggg aagccggcat cacc	24
10	<210> 39	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-24	
20	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 39	
25	gagaaggtcg tgttcgagca aacc	24
	<210> 40	
	<211> 24	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<221> Secuencia artificial	
	<222> 1-24	
	<223> La secuencia está sintetizada	
40	<400> 40	
	cttctcgtgt acttctctgtg cctg	24
45	<210> 41	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Secuencia artificial	
55	<222> 1-24	
	<223> La secuencia está sintetizada	
	<400> 41	
60	cacgtcagct ggcgttgcca gctc	24
	<210> 42	
65	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 316 173 T3

<220>
<221> Secuencia artificial
<222> 1-50
5 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 42

10 caactctcg gccgtggtgt ctgtagatgg gcggcctgtg agactccagc 50

<210> 43
<211> 24
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <221> Secuencia artificial
<222> 1-24
<223> La secuencia está sintetizada

25 <400> 43

gcacacacgc atggaggcaa gctc 24

30 <210> 44
<211> 24
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Secuencia artificial
40 <222> 1-24
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 44
45 gccatctgt ttacagctcc acca 24

<210> 45
50 <211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> Secuencia artificial
<222> 1-50
<223> La secuencia está sintetizada
60

<400> 45

65 ctctgacct ttggggtgc cacttcccag gacgacct gcctgcccac 50

<210> 46
<211> 177

ES 2 316 173 T3

<212> ADN
<213> Humano

5 <400> 46

gaccctccct ggccgccttt gtctactggc cgtgcggccc ggaaccgcca 50
ctctccaggg ccggggacgc gcccgagct gtcggtgaca gtcctccct 100
accgcaacc tccggggcgg aggggcggtc gggccgggcc ctgctagccc 150
gcgaccgcaa gcccgcgctc gcggatc 177

15 <210> 47
<211> 774
<212> ADN
<213> Humano

20 <400> 47

gaccctccct ggccgccttt gtctactggc cgtgcggccc ggaaccgcca 50
ctctccaggg ccggggacgc gcccgagct gtcggtgaca gtcctccct 100
accgcaacc tccggggcgg aggggcggtc gggccgggcc ctgctagccc 150
gcgaccgcaa gcccgcgctc gcggatcgat gccccgcag cagggggacc 200
ccgcgttccc cgaccgctgc gaggcgcctc cggtgccgcc gcgtcgggag 250
cgcggtggac gcgggggacg cgggcctggg gagccggggg gccgggggag 300
tgcggggggt gccgaggggc gcggcgtcaa gtgcgtgctg gtcggcgacg 350
gcgcggtggg caagacgagc ctggtggtga gttacaccac caacggctac 400
cccaccgagt acatccctac tgccttcgac aacttctccg cggtggtgct 450
tgtggatggg cggcccgtga gactccaact ctgtgacact gccggacagg 500
atgaatttga caagctgagg cctctctgct acaccaacac agacatcttc 550
ctgctctgct tcagtgtcgt gagccctca tccttcaga acgtcagtga 600
gaaatgggtg ccggagattc gatgccactg tcccaaagcc cccatcatcc 650
tagttggaac gcagtcggat ctgagagaag atgtcaaagt cctcattgag 700
ttggacaaat gcaaagaaaa gccagtcct gaagaggcgg ctaagctgtg 750
cgccgaggaa atcaaagccg cctc 774

60 <210> 48
<211> 840
<212> ADN
65 <213> Humano

ES 2 316 173 T3

<400> 48

5 caacttctcc gcggtggtgt ctgtggatgg gcggcccggtg agactccaac 50
tctgtgacac tgccggacag gatgaatttg acaagctgag gcctctctgc 100
10 tacaccaaca cagacatctt cctgctctgc ttcagtgtcg tgagcccctc 150
atccttccag aacgtcagtg agaaatgggt gccggagatt cgatgccact 200
15 gtcccaaagc ccccatcatc ctagttggaa cgcagtcgga tctcagagaa 250
gatgtcaaag tcctcattga gttggacaaa tgcaaagaaa agccagtgcc 300
20 tgaagaggcg gctaagctgt gcgccgagga aatcaaagcc gcctcctaca 350
tcgagtgttc agccttgact caaaaaaacc tcaaagaggt ctttgatgca 400
25 gccatcgteg ctggcattca atactcggac actcagcaac agccaaagaa 450
gtctaaaagc aggactccag ataaaatgaa aaacctctcc aagtccctggt 500
30 ggaagaagta ctgctgtttc gtatgatgct ggcaagacac ccagaaaggc 550
tattttcaga tgaaatcgat attagaagct atattagctg aaacaactcc 600
35 ttttactgcg tagaacctat atcgagagtg tgtgtatatg tattatagga 650
40 ggagctctca attttatgta ttctttctgc ctttaatttt cttgtttggt 700
tgagcttagg gatgagatac ttatgcaaga tatttttgaa gtaaattaa 750
45 catttttcac atctctggaa atttagagtt ctagacctct ggttaattta 800
tatctaatat gaagaagaca cctctaactt ggatgttaag 840

50

<210> 49

<211> 47

<212> ADN

55

<213> Secuencia Artificial

<220>

60

<221> Secuencia Artificial

<222> 1-47

<223> La secuencia está sintetizada

65

<400> 49

ggattctaat acgactcact atagggcagc gttgactcag aaaaacc

47

ES 2 316 173 T3

<210> 50
<211> 48
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Secuencia Artificial
10 <222> 1-48
<223> La secuencia está sintetizada

<400> 50
15
ctatgaaatt aaccctcact aaaggagca tatgaatttc agccctaa 48

<210> 51
20 <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-48
30 <223> La secuencia está sintetizada

<400> 51
35 ggattctaatt acgactcact ataggcacg cacatctgtt tccgtttt 48

<210> 52
<211> 47
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-47
<223> La secuencia está sintetizada

50 <400> 52
ctatgaaatt aaccctcact aaaggacca tccccgtct ctaccta 47

55

60

65