



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 149 672**

② Número de solicitud: 009800016

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 15/57

C12N 9/64

C12Q 1/37

A61K 38/48

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.01.1998**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2000**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.11.2000

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE OVIEDO
C/ San Francisco, 3
33071 Oviedo, Asturias, ES**

⑧ Inventor/es: **Pérez Freije, José María;
Velasco Cotarelo, Gloria;
Martín Pendas, Alberto;
Blay Albors, Pilar;
Balbín Felechosa, Milagros y
López Otín, Carlos**

⑨ Agente: **Elzaburu Márquez, Fernando**

④ Título: **Secuencia génica humana homóloga al gen AFC1 de levaduras implicado en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas.**

⑤ Resumen:

Secuencia génica humana homóloga al gen AFC1 de levaduras implicado en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas.

Secuencia génica humana homóloga al gen de levaduras implicado en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas. La invención consiste en identificar fragmentos homólogos de gen humano a AFC1 de *Saccharomyces cerevisiae*, amplificarlos mediante PCR de ARN total, utilizar los fragmentos amplificados como sondas para hibridar ADNc y determinar la secuencia de los clones de ADNc que hibriden con las sondas. La secuencia identificada es SEQ ID NO: 1. Las aplicaciones de dicha secuencia están relacionadas fundamentalmente con la diagnosis y el tratamiento de procesos oncogénicos.

ES 2 149 672 A1

DESCRIPCION

Secuencia génica humana homóloga al gen AFC1 de levaduras implicado en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas.

Campo de la invención

La invención se adscribe al campo de la oncología humana. En concreto la presente invención versa sobre las enzimas procesadoras de proteínas preniladas y sobre los genes que las codifican. Más particularmente, la presente invención aborda la identificación de las proteasas humanas, y de sus posibles inhibidores, encargadas de las modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas ras y otras relacionadas para activarse y poder desempeñar sus funciones patológicas.

Estado de la técnica

Las proteínas ras forman parte de una superfamilia de proteínas enlazantes de nucleótidos de guanina que, tras activarse por mutación, tienen la capacidad de transformar las células eucariotas. Las formas mutadas u oncogénicas de los genes ras se han encontrado en un porcentaje muy significativo de tumores humanos, alcanzando el 50 % en los carcinomas de colon y páncreas (Annu. Rev. Biochem., 56, 779, (1987)). Estas observaciones indican que los genes ras contribuyen al desarrollo de diversos tipos de tumores humanos, siendo por tanto dianas moleculares de intervención terapéutica.

Las proteínas ras se sintetizan en el citoplasma celular como moléculas precursoras que requieren diversas modificaciones post-traduccionales para insertarse en la membrana y desempeñar allí sus funciones biológicas. La primera de estas modificaciones consiste en la prenilación o farnesilación de un residuo de cisteína, localizado en la región carboxilo-terminal, y formando parte de una secuencia Cys-A-A-X, donde A suele ser un aminoácido alifático y X cualquier aminoácido. Tras la prenilación, los tres residuos adyacentes a la cisteína prenilada son eliminados proteolíticamente y el grupo carboxilo resultante es metilado. Hasta el momento se han identificado diversas proteínas que participan en las etapas de prenilación y metilación de las proteínas ras y de otras proteínas que experimentan modificaciones post-traduccionales análogas, y entre las que se pueden citar feromonas fúngicas como el factor-a de levadura, las subunidades γ de diversas proteínas G triméricas o pequeñas proteínas enlazantes de GTP implicadas en el tráfico vesicular celular (Annu. Rev. Biochem. 61, 355, (1992)). Sin embargo, actualmente no se conoce ninguna proteína humana responsable de la eliminación proteolítica de los residuos adyacentes a la cisteína prenilada, etapa esencial en la maduración de ras y proteínas relacionadas.

Una de las estrategias para la identificación de las proteasas humanas activadoras de proteínas preniladas consistiría en la búsqueda de proteínas homólogas en otras especies filogenéticamente alejadas, como son las levaduras, pero que también son capaces de desarrollar reacciones análogas de procesamiento proteolítico en secuencias Cys-A-A-X. En este sentido, cabe señalar que recientemente Boyartchuk et al., (Science 275, 1797,

(1997)) han descrito la existencia en *Saccharomyces cerevisiae* de dos proteínas (Afc-1 y Rce-1) que participan en la maduración proteolítica de proteínas preniladas. La proteína Afc-1 se ha descrito como una metaloproteasa que participa en el procesamiento de la feromona denominada factor-a. Por el contrario, la proteína Rce-1 puede contribuir al procesamiento proteolítico tanto de factor-a como de proteínas ras de levaduras. La descripción de estas dos proteínas abre la posibilidad de búsqueda de proteínas análogas en humanos a través de una estrategia de "clonación por homología". Una de las múltiples formas de abordar esta estrategia, persigue en un primer paso la búsqueda en bancos de datos accesibles públicamente, de fragmentos de secuencias de nucleótidos de genes humanos que tengan similitud con las secuencias de los genes AFC1 y RCE1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Tras su identificación, los hipotéticos fragmentos homólogos se pueden amplificar mediante PCR de ARN total de tejidos humanos en los que se sospeche la expresión de dichos genes, y utilizarlos como sondas para hibridar genotecas de ADNc preparadas a partir de ARN de los mismos tejidos. Finalmente, la secuenciación y posterior caracterización de los clones humanos aislados mediante técnicas estándar de Biología Molecular, permitiría confirmar el posible papel de las proteínas codificadas por dichos clones en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas. Basándose en esta idea, los autores de la invención, tras los pertinentes estudios experimentales, han llegado a los objetivos antes enumerados que constituyen los diversos aspectos de la presente invención.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es identificar el gen humano que codifica una proteína homóloga a la proteína Afc-1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Un segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen homólogo a AFC1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la invención consistió en la identificación de un gen humano que pudiera codificar una proteína homóloga a la proteína Afc-1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello la secuencia de aminoácidos descrita para esta proteína se comparó con la división de "Expressed Sequence Tags" (ESTs) de la base de datos GenBank utilizando el programa TBLASTN (J. Mol. Biol. 215, 403, (1990)). Se identificaron seis ESTs humanas solapantes, cuyos números de acceso son AA210930, F11310, Z43272, R54272, T35312 y N76181. Del solapamiento de estas ESTs, dedujimos una secuencia parcial de nucleótidos, que codifica un fragmento de una hipotética proteína humana con un grado de similitud de aproximadamente 40 % con la proteína Afc-1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína humana fue denominada tentativamente Face-1, (Farnesylated-proteins converting enzyme 1). Su secuencia de aminoácidos, así como la secuencia nucleotídica que la codifica se muestra como SEQ ID NO : 1.

A partir de esta secuencia diseñamos y sintetizamos dos oligonucleótidos,

AFC1 (5'-ATGAGGAGGTACTCGCTGTACTAGG-3')

y

AFC2 (5'-GCTGGAACATGCTGCCAGGAC-3').

Estos oligonucleótidos fueron utilizados para amplificar el fragmento de ADNc correspondiente utilizando como molde ADN total aislado a partir de una genoteca de ADNc humano de ovario, construida en Lambda DR2 (Clontech N° de Catálogo HL1146x). Para ello se utilizaron 20 pmoles de cada oligonucleótido, aproximadamente 1 microgramo de ADNc, 0,2 mM dNTPs y 1,25 U de Taq ADN polimerasa en un volumen total de 50 microlitros de "ExpandLong buffer 3" (Boehringer Mannheim). La amplificación se llevó a cabo en un aparato GeneAmp2400 de Perkin-Elmer, y consistió en ciclo inicial de desnaturalización (1 min, 94°C), 35 ciclos de desnaturalización (15 s, 94°C), hibridación (15 s, 60°C) y extensión (1 min, 72°C), seguidos de un ciclo final de extensión de 10 min a 72°C. El fragmento de ADN resultante, de 516 pares de bases (pb) se purificó por electroforesis en gel de agarosa y extracción con GeneClean. La identidad del fragmento amplificado con la secuencia parcial deducida para Face-1 fue verificada tras subclonarlo en pUC18 y determinar su secuencia de nucleótidos mediante técnicas estándar de Biología Molecular.

Con objeto de obtener una secuencia de ADNc que contuviera la información codificante de la proteína Face-1 completa, el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos AFC1 y AFC2, anteriormente descrito, se marcó radiactivamente y se hibridó con 10⁶ clones de la genoteca de ADNc de ovario antes citada siguiendo procedimientos estándar. Se obtuvieron 11 clones de fago lambda que hibridaban específicamente con la sonda utilizada. El ADN de los fagos aislados fue convertido en los plásmidos pDR2 correspondientes por excisión in vivo, siguiendo las instrucciones del proveedor de la genoteca. Los plásmidos pDR2 recombinantes fueron analizados mediante Southern blot, análisis que nos condujo a seleccionar el clon 1.3a, por ser el que contenía el inserto de mayor longitud. La secuencia de nucleótidos de este plásmido se determinó por el método de terminadores de cadena descrito por Sanger (PNAS, 74, 5463, (1977)). La secuenciación reveló la existencia de una fase abierta de lectura, que codifica una proteína de 475 aminoácidos a la que denominamos Face-1 humana. La comparación de esta secuencia de aminoácidos con todas las secuencias presentes en los bancos de datos accesibles públicamente demostró que el mayor grado de similitud (40%) correspondía a la proteína Afc-1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo se detectó un grado significativo de similitud con la denominada proteína hipotética p59 de *Schizosaccharomyces pombe* y con una proteína de *Escherichia coli* de función desconocida y denominada htpX. Un análisis más detallado de la secuencia de aminoácidos de Face-1 reveló la presencia de motivos estructurales que permiten

clasificarla como una metaloproteasa de la familia de las gluzincinas (Methods Enzymol. 248, 183, (1995)). Así, en posición 335 se encuentra la secuencia HELGH, que corresponde perfectamente con la secuencia HEXXH presente en las metaloproteasas e implicada en la unión de iones metálicos. Además, en posición 415 se encuentra un residuo de glutámico, conservado en la secuencia de Afc-1, p59 y htpX, y que forma parte asimismo del sitio de unión al metal. A cuatro residuos de distancia de este ácido glutámico se encuentra un residuo de ácido aspártico, esencial para la actividad catalítica de estas proteasas (Eur. J. Biochem. 221, 475, (1994)). La existencia de una única proteína humana con estas propiedades nos lleva a concluir que Face-1 es el homólogo humano de la proteína Afc-1 de *Saccharomyces cerevisiae* y por tanto es presumible su participación en la maduración proteolítica de proteínas preniladas.

El segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen homólogo a AFC1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Con este fin, dos membranas conteniendo ARN poliadenilado procedente de múltiples tejidos humanos (leucocitos, colon, intestino delgado, ovario, testículo, próstata, timo, bazo, páncreas, riñón, músculo esquelético, hígado, pulmón, placenta, cerebro y corazón) se hibridaron con la sonda de Face-1 marcada radiactivamente. Dos microgramos de ARN poliadenilado de los tejidos indicados se hibridaron con el ADNc de Face-1. Tras una prehibridación a 42°C durante tres horas en formamida al 40%, 5x PBS/EDTA (1x=NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), 10x Solución de Denhardt (1x= Albúmina de suero bovino, 0,02%, polivinilpirrolidona, 0,02%, ficoll, 0,02%), SDS 2% y ADN de esperma de salmón 100 mg/ml, se añadió la sonda y se hibridó durante 20 horas en las mismas condiciones. Los filtros se lavaron con 1x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7,0) conteniendo SDS al 0,1% durante 2 horas a 50°C, y finalmente se expusieron a autorradiografía (Fig. 1). Como puede observarse en la figura 1A, tras hibridación con la sonda de Face-1, se detectó un ARN mensajero de aproximadamente 3,5 kilobases en todos los tejidos analizados. La expresión ubicua del gen Face-1 es consistente con la amplia distribución tisular de proteínas preniladas, lo cual implica a su vez la necesidad de que las proteasas responsables de su maduración estén presentes en todos los tejidos del organismo.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis Northern de la expresión en tejidos humanos de los genes Face-1 (A), Face-2 (B) y un control de Actina (C) que se expresa en todos los tejidos. A la izquierda se indica el tamaño de los ARNs utilizados como marcadores. (1) Leucocitos, (2) colon, (3) intestino, (4) ovario, (5) testículo, (6) próstata, (7) timo, (8) bazo, (9) páncreas, (10) riñón, (11) músculo, (12) hígado, (13) pulmón, (14) placenta, (15) cerebro y (16) corazón.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de secuencias génicas humanas homólogas a los genes de levaduras implicados en el procesamiento proteolítico de proteínas preniladas **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) Comparar la secuencia de nucleótidos del gen AFC1 de *Saccharomyces cerevisiae* con las secuencias parciales de nucleótidos presentes en las bases de datos de genes expresados.
- b) Identificar fragmentos homólogos y amplificarlos mediante PCR de ARN total de tejidos humanos en los que se puedan expresar dichas secuencias génicas.
- c) Utilizar los fragmentos amplificados como sondas para hibridar genotecas de ADNc preparadas a partir de ARN de tejidos humanos.
- d) Aislar los clones de ADNc que hibriden con las sondas y determinar su secuencia completa de nucleótidos.

2. Procedimiento de identificación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque las

secuencias génicas identificadas codifican proteasas procesadoras de proteínas ras y otras relacionadas.

3. Procedimiento de identificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la secuencia génica identificada y su secuencia de aminoácidos deducida son SEQ ID NO: 1.

4. Secuencia génica SEQ ID NO: 1 y sus mutaciones, derivados o secuencias parciales, que codifiquen para una actividad enzimática proteolítica de proteínas preniladas.

5. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en el diseño de inhibidores de la actividad enzimática proteolítica de proteínas preniladas.

6. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de proteínas recombinantes o sintéticas.

7. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de anticuerpos.

8. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de sistemas de detección de proteínas proteolíticas de proteínas preniladas y/o de los genes que codifican para las mismas.

9. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de composiciones activas en el tratamiento de procesos patológicos mediados por proteínas ras u otras proteínas preniladas, y/o por genes que codifican para las mismas.

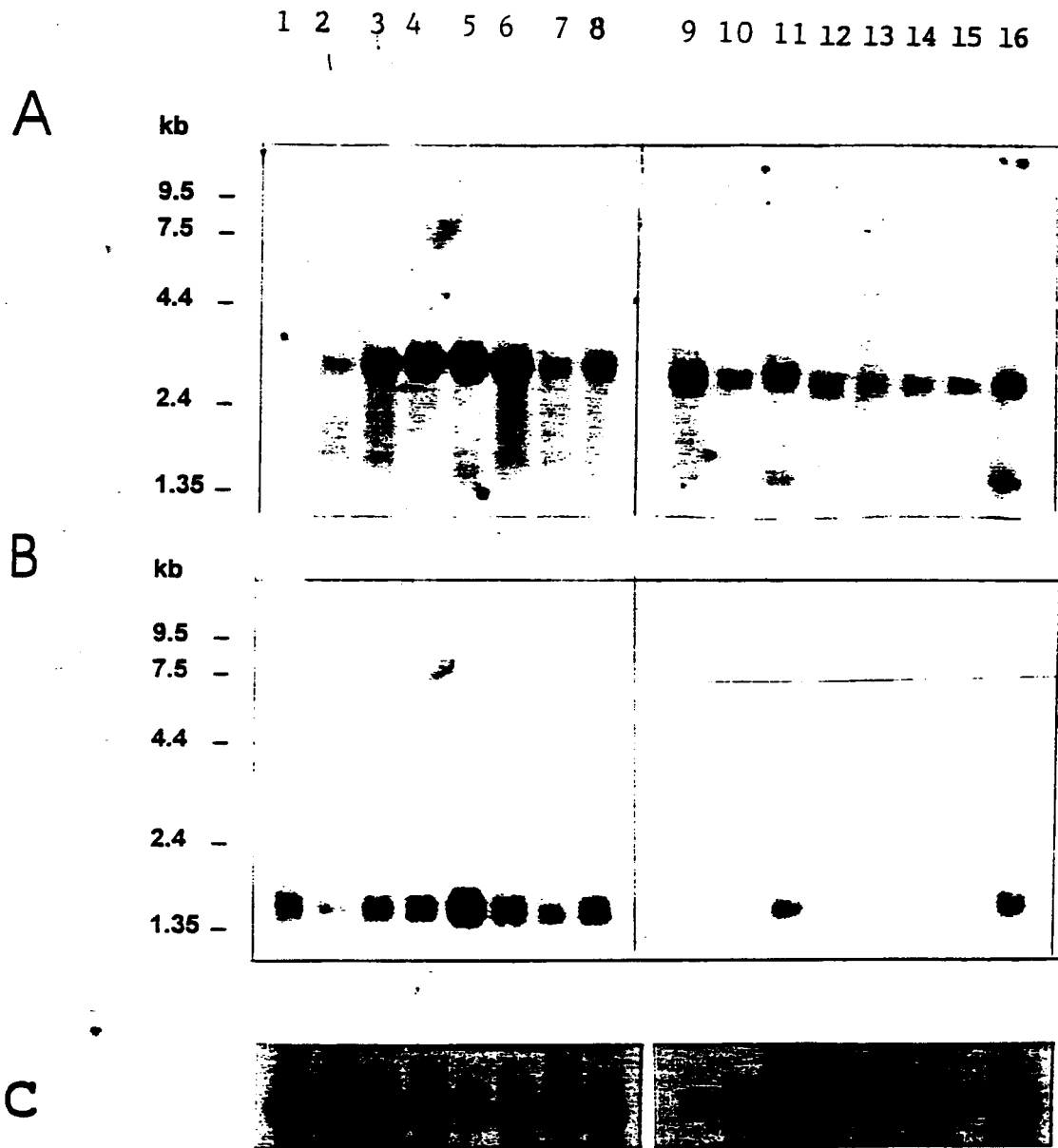


Figura 1

ES 2 149 672 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Oviedo
<120> Secuencia génica humana homóloga al gen AFC1
de levadura implicado en el procedimiento
proteolítico de proteínas preniladas
<130> P-98897
<140> 9800016
<141> 08.01.98
<160> 1
<170> Windows, Word
<210> SEQ ID NO: 1
<211> 2966
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<223> GENOTECA: LAMBDA DR2, Clontech HL1146x
<223> CLON: A-1.2a
<223> codón de iniciación
<222> 34...36
<223> secuencia codificante
<222> 34...1458
<223> codón de parada
<222> 1459...1461
<400>

GCACGCTGAA GGAGCCGGCG GAACCGGGTG GCC ATG GGG ATG TGG GCA TCG CTG 54
Met Gly Met Trp Ala Ser Leu
1 5
GAC GCT TTG TGG GAG ATG CCG GCC GAG AAG CGT ATC TTC GGG GCC GTG 102
Asp Ala Leu Trp Glu Met Pro Ala Glu Lys Arg Ile Phe Gly Ala Val
10 15 20
CTG CTC TTT TCC TGG ACA GTG TAT CTT TGG GAG ACC TTC CTA GCA CAG 150
Leu Leu Phe Ser Trp Thr Val Tyr Leu Trp Glu Thr Phe Leu Ala Gln
25 30 35

ES 2 149 672 A1

CGG CAG AGA AGG ATA TAT AAA ACA ACA ACT CAT GTA CCA CCG GAG TTA	198
Arg Gln Arg Arg Ile Tyr Lys Thr Thr Thr His Val Pro Pro Glu Leu	
40 45 50 55	
GGA CAG ATC ATG GAT TCT GAA ACA TTT GAG AAA TCT CGA CTC TAT CAA	246
Gly Gln Ile Met Asp Ser Glu Thr Phe Glu Lys Ser Arg Leu Tyr Gln	
60 65 70	
CTG GAT AAA AGC ACT TTC AGC TTC TGG TCA GGA CTC TAT TCA GAG ACT	294
Leu Asp Lys Ser Thr Phe Ser Phe Trp Ser Gly Leu Tyr Ser Glu Thr	
75 80 85	
GAA GGC ACT CTT ATT CTT CTC TTT GGA GGA ATA CCT TAT CTC TGG AGA	342
Glu Gly Thr Leu Ile Leu Leu Phe Gly Gly Ile Pro Tyr Leu Trp Arg	
90 95 100	
CTT TCT GGA CGG TTC TGT GGT TAT GCT GGC TTT GGA CCA GAA TAT GAG	390
Leu Ser Gly Arg Phe Cys Gly Tyr Ala Gly Phe Gly Pro Glu Tyr Glu	
105 110 115	
ATC ACT CAG TCC CTG GTG TTT CTG CTG TTG GCT ACA CTT TTC AGT GCA	438
Ile Thr Gln Ser Leu Val Phe Leu Leu Leu Ala Thr Leu Phe Ser Ala	
120 125 130 135	
TTG ACT GGT TTG CCA TGG AGT CTT TAT AAT ACT TTT GTG ATA GAA GAA	486
Leu Thr Gly Leu Pro Trp Ser Leu Tyr Asn Thr Phe Val Ile Glu Glu	
140 145 150	
AAA CAT GGC TTC AAT CAA CAG ACT TTG GGG TTC TTC ATG AAA GAT GCA	534
Lys His Gly Phe Asn Gln Gln Thr Leu Gly Phe Phe Met Lys Asp Ala	
155 160 165	
ATC AAG AAA TTT GTT GTG ACT CAG TGT ATT TTG TTG CCT GTG TCT TCA	582
Ile Lys Lys Phe Val Val Thr Gln Cys Ile Leu Leu Pro Val Ser Ser	
170 175 180	
CTT CTA CTT TAC ATT ATT AAA ATT GGG GGT GAC TAT TTT TTT ATT TAT	630
Leu Leu Leu Tyr Ile Ile Lys Ile Gly Gly Asp Tyr Phe Phe Ile Tyr	
185 190 195	
GCC TGG CTG TTC ACA TTA GTT GTG TCT CTG GTT CTT GTC ACA ATC TAT	678
Ala Trp Leu Phe Thr Leu Val Val Ser Leu Val Leu Val Thr Ile Tyr	
200 205 210 215	
GCT GAT TAT ATT GCC CCT TTA TTT GAC AAA TTC ACA CCT CTG CCT GAG	726
Ala Asp Tyr Ile Ala Pro Leu Phe Asp Lys Phe Thr Pro Leu Pro Glu	
220 225 230	

ES 2 149 672 A1

GGA AAG CTT AAA GAA GAA ATT GAA GTA ATG GCA AAG AGT ATT GAC TTT	774
Gly Lys Leu Lys Glu Glu Ile Glu Val Met Ala Lys Ser Ile Asp Phe	
235 240 245	
CCT TTG ACG AAG GTG TAT GTT GTG GAA GGA TCT AAA CGC TCT TCC CAC	822
Pro Leu Thr Lys Val Tyr Val Val Glu Gly Ser Lys Arg Ser Ser His	
250 255 260	
AGC AAT GCT TAT TTT TAT GGC TTC TTC AAG AAC AAG CGA ATA GTT TTG	870
Ser Asn Ala Tyr Phe Tyr Gly Phe Phe Lys Asn Lys Arg Ile Val Leu	
265 270 275	
TTT GAC ACT CTA CTA GAA GAG TAC TCT GTA CTA AAC AAA GAC ATC CAG	918
Phe Asp Thr Leu Leu Glu Glu Tyr Ser Val Leu Asn Lys Asp Ile Gln	
280 285 290 295	
GAG GAT TCT GGC ATG GAA CCC CGC AAT GAG GAA GAA GGG AAC AGT GAA	966
Glu Asp Ser Gly Met Glu Pro Arg Asn Glu Glu Glu Gly Asn Ser Glu	
300 305 310	
GAA ATA AAA GCT AAA GTT AAA AAT AAG AAA CAA GGA TGT AAA AAT GAG	1014
Glu Ile Lys Ala Lys Val Lys Asn Lys Lys Gln Gly Cys Lys Asn Glu	
315 320 325	
GAG GTA CTC GCT GTA CTA GGC CAT GAA CTG GGG CAC TGG AAG TTG GGA	1062
Glu Val Leu Ala Val Leu Gly His Glu Leu Gly His Trp Lys Leu Gly	
330 335 340	
CAT ACA GTC AAA AAT ATC ATT ATT AGC CAG ATG AAT TCT TTC CTG TGT	1110
His Thr Val Lys Asn Ile Ile Ile Ser Gln Met Asn Ser Phe Leu Cys	
345 350 355	
TTT TTT TTA TTT GCT GTA TTA ATT GGT CGA AAG GAG CTT TTT GCT GCA	1158
Phe Phe Leu Phe Ala Val Leu Ile Gly Arg Lys Glu Leu Phe Ala Ala	
360 365 370 375	
TTT GGT TTT TAT GAT AGC CAA CCC ACT CTT ATT GGA CTA TTG ATC ATC	1206
Phe Gly Phe Tyr Asp Ser Gln Pro Thr Leu Ile Gly Leu Leu Ile Ile	
380 385 390	
TTC CAG TTT ATT TTT TCA CCT TAC AAT GAG GTT CTT TCT TTT TGC CTA	1254
Phe Gln Phe Ile Phe Ser Pro Tyr Asn Glu Val Leu Ser Phe Cys Leu	
395 400 405	
ACA GTC CTA AGC CGC AGA TTT GAG TTT CAA GCT GAT GCA TTT GCC AAG	1302
Thr Val Leu Ser Arg Arg Phe Glu Phe Gln Ala Asp Ala Phe Ala Lys	
410 415 420	
AAA CTT GGG AAG GCT AAA GAC TTA TAT TCT GCT TTA ATC AAA CTT AAC	1350
Lys Leu Gly Lys Ala Lys Asp Leu Tyr Ser Ala Leu Ile Lys Leu Asn	
425 430 435	

ES 2 149 672 A1

AAA GAT AAC TTG GGA TTC CCT GTT TCT GAC TGG TTG TTC TCA ATG TGG 1398
 Lys Asp Asn Leu Gly Phe Pro Val Ser Asp Trp Leu Phe Ser Met Trp
 440 445 450 455
 CAT TAT TCT CAT CCT CCA CTG CTA GAG AGA CTT CAA GCT TTG AAA ACT 1446
 His Tyr Ser His Pro Pro Leu Leu Glu Arg Leu Gln Ala Leu Lys Thr
 460 465 470
 ATG AAG CAA CAC TGAGATGTCC AGGATCTGTG ACTGAAGACA TTTCTGATTA TT 1500
 Met Lys Gln His
 475
 TCTGTCCTGG GCAGCATGTT CCAGCTCTTG ATGTTTTTAA ACTTTTTTTT AGAAGAAAAA 1560
 TTAAGTACAG AAAAGCCCAG ATTTAAATAC ATTTAATATG TCATTTTAAA AATGATTTTA 1620
 ATAATTCATT TCTTAAAACA CTGAATGAAT TTTGAAGCTT AATGTTTTTA AAGGCATAGT 1680
 TTTTATCTTTG ACATCTAATT TACCATCAAG TTGTAAAATT ATTTGGAAAA ATACAGAACT 1740
 CGTTTTATTT GTATACTTAT ATGGAATCTG CATGTGAGGT GTTTGAGGGC ATATGTTTGA 1800
 AAGAGGGAGC ATCACCACAG GAATCCTTCT GTGAGGTGGA AACAGTGGTC CTGAATCATT 1860
 GTGCTCACAC CTAACCTGAA ATCTGGTCTT ACTTTCATGC TGTTATGATT TCACCTGGTG 1920
 AATCAGTGTT TAAATAAGA AAGGTAATAG TTGGTAAGGC CAATGTTATT TAAATGAAAG 1980
 TAGTTAGAAA AATGCTCTCC TATTCTACCA AATTTTTAAT TTCTTTCTTC CCCTTTCTTG 2040
 CTACACAGTG ATCAAGAGTT TCTCATAGTG CTTTGAAGTT AGAAATTATG TATAGGATAT 2100
 TTTAAATCAT TGAGTTTTGT GGGGTTTTTT TGTTTGTGTTG TTTCTTTTGT TTTTTGGAAA 2160
 ATCCGTGTCT TTATCTTTTT TCCCACGTG GTAGATATGA TCCCATTGGA GGTA AATTGT 2220
 AGCTTCTTCT CATTATGCA GTAAATAATA CATCCTTTCA CTCAGCAGAG ATGGCCATAT 2280
 TAAACACGTT TTGCTATGTT AAAAGTGGCA GAACAGGAAA GACGAATTAA AAATAACATT 2340
 TTTTAAGCGA CATAAGGATG AAATACTGAT GAATCTCTGT GACATTACAG GGAAAAAAT 2400
 ATAGTTTTCT ATCTCTTTCA AGGGCAGAAG AGTTTTTATT TTTATTTTTG TAATTTTTATC 2460
 TGTAAGTCAT AAATATTACT TAATCAGGCC TGATTCTACT TTTGAAAATT ACAGTTCTTG 2520
 AAATGCAGAT AATGTTTACT TTGAAAACAA ATGTCATGAA TGATTTCCAG TTTTAAAGC 2580
 TATATGTTTC ACTGCTTCAT ATCTCTGTCC ACTTCTGAA TGAGAACTTA TTTTGTGCCT 2640
 AGAGCTCTCA CTCACTGATA ATGCTTATTA CCTTCTGGGC ATTTATTCCA AAGTGGGATC 2700
 AACTGTACGC CTTTGGTATC TGACCATAAA GTCTTTCCTC CGCTGACATT TGGGTGATGT 2760
 CTTTACATGG AAATATAATA AAAATAAAAA TCTAGTTTAA TACTGCATTA TTTATTTTCC 2820
 TAAGGCTAAA GAGGAGCAGT CCTATGCTTT TATTCAGCAT CCTTTATCTG TGACTTCATG 2880
 CTCTGATAAC TGCCTTTCCT TCCTTCTGTG CCTTTGAATA CAAATTCAG TTCTGCAAAA 2940
 GTGAAACATT AAACATTGCC AACGCA 2966



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 15/57, 9/64, C12Q 1/37, A61K 38/48

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FUJIMURA-KAMADA, K. et al. "A novel membrane-associated metalloprotease, Step 24, is required for the first step of NH ₂ -terminal processing of the yeast a-Factor precursor", THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 1997, Vol. 136, N.º 2, páginas 271-285. Todo el documento.	1-4
X	BOYARTCHUK, V.L. et al. "Modulation of Ras and a-Factor function by carboxylterminal proteolysis", SCIENCE, 1997, Vol. 275, páginas 1796-1800. Todo el documento.	4,9
Y	Todo el documento.	1-3
Y	BASSET, D.E. et al. "Genome cross-referencing and XREF db: Implications for the identification and analysis of genes mutated in human disease", NATURE GENETICS, 1997, Vol. 15, páginas 339-344. Todo el documento.	1-3
A	ASHBY, M.N. et al. "Ras and a-Factor converting enzyme", METHODS IN ENZYMOLOGY, 1995, Vol. 250, páginas 235-251. Todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

29.09.2000

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1