



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 201 874**

⑫ Número de solicitud: 200102166

⑮ Int. Cl.7: **C12N 9/64**
C12Q 1/37
C07K 16/40
A61K 38/48

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **24.09.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2004**

Fecha de la concesión: **25.04.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.05.2005

⑰ Titular/es: **Universidad de Oviedo**
Plaza del Riego 4, Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑰ Inventor/es: **Cal Miguel, Santiago;**
Obaya González, Álvaro Jesús;
Llamazares Prada, María;
Garbaya Fernández, Cecilia y
López Otín, Carlos

⑰ Agente: **No consta**

⑰ Título: **Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-17.**

⑰ Resumen:

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-17.

La invención consiste en identificar fragmentos de genes humanos similares a secuencias de genes de proteínas ADAM, amplificarlos mediante PCR de ARN de tejidos humanos, extender la secuencia de los fragmentos obtenidos hacia los extremos 5' y 3' y determinar la secuencia de los clones de ADNc generados. La secuencia identificada es SEQ ID NO :1 y se ha denominado ADAMTS-17. La aplicación de dicha secuencia está relacionada fundamentalmente con la diagnosis y el tratamiento de anomalías en los procesos de angiogénesis, hemostasis, adhesión celular y remodelación tisular.

ES 2 201 874 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-17.

5 Campo de la invención

La invención se adscribe al campo de los procesos biológicos de adhesión celular y remodelación tisular, incluyendo los asociados a condiciones fisiológicas como la respuesta inmune, la angiogénesis, la coagulación, la cicatrización de heridas, los procesos reproductivos, la implantación embrionaria, o el desarrollo fetal, así como procesos patológicos incluyendo los tumorales, artríticos, cardiovasculares, hematológicos y neurodegenerativos. En concreto, la presente invención versa sobre una proteína humana que contiene dominios de adhesión celular y metaloproteasa, sobre el gen que la codifica, y sobre sus posibles inhibidores. Más particularmente, la presente invención aborda la identificación de la proteína humana llamada ADAMTS-17, y el análisis de su estructura y de sus posibles funciones normales y patológicas.

15 Estado de la técnica

Las proteínas denominadas ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase domain) o desintegrinas celulares, son una familia de enzimas que han adquirido una notable importancia dada su capacidad de participar en procesos biológicos que implican fenómenos de adhesión celular y proteolisis extracelular (Cell 90, 589, (1997)). Estas proteínas poseen una peculiar organización estructural con dominios de proenzima, metaloproteasa, desintegrina, rico en cisteína, factor de crecimiento epidérmico, transmembrana, y citoplasmático. Algunos de estos dominios son semejantes a los encontrados en una familia de proteínas aisladas de venenos de serpientes (Methods Enzymol. 248, 345, (1995)). Estas proteínas de serpientes junto con las ADAMs, constituyen la superfamilia de las repolisinas, caracterizadas por la presencia de una secuencia HEXXHXXGXXHD en su dominio catalítico.

Las ADAMs han sido identificadas en una variedad de tejidos de mamíferos, así como en otros organismos eucariotas como *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, pero no en plantas, levaduras o bacterias. Inicialmente, las ADAMs se asociaron a procesos reproductivos, pero posteriormente su espectro de funciones se ha extendido considerablemente (Curr. Opin. Cell Biol. 10, 654, (1998)). Así, la meltrina- α (ADAM-12) se ha implicado en fusión de mioblastos. Las meltrinas α y β también participan en procesos de diferenciación y actividad osteoblástica. Otras ADAMs como las denominadas MS2 y decisina, participan en distintos procesos de la respuesta inmune. Además, estudios recientes han permitido caracterizar las propiedades enzimáticas y especificidad de sustrato de varias ADAMs como ADAM-9, ADAM-10 o ADAM-17 que actúan como proteasas implicadas en el procesamiento proteolítico de sustratos celulares relevantes, incluyendo precursores de citoquinas y factores de crecimiento.

La complejidad estructural y funcional de esta familia de proteínas se ha extendido considerablemente tras el reciente hallazgo de una serie de nuevas proteasas relacionadas con las ADAMs y caracterizadas por la presencia en su secuencia de aminoácidos de varias copias de dominios trombospondina (J. Biol. Chem. 274, 25555, (1999)). El primer miembro de esta familia, denominado ADAMTS-1, se identificó como consecuencia de su asociación con el desarrollo de caquexia tumoral y de varios procesos inflamatorios. Posteriormente, se identificó la ADAMTS-2, con actividad de procolágeno I amino-proteasa y cuya deficiencia origina el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIC (Am. J. Hum. Gen. 65, 308, (1999)). Otros miembros de la familia son las proteínas denominadas ADAMTS-4 y ADAMTS-11, las cuales poseen la actividad agreganasa responsable de la degradación del cartílago articular en enfermedades artríticas. Por otra parte la ADAMTS-8 y la ADAMTS-1 han sido identificadas como proteínas capaces de inhibir los procesos de angiogénesis. Finalmente, otras proteínas como las ADAMTS-3, ADAMTS-5, ADAMTS-6, ADAMTS-7 y ADAM-TS12 sólo se han caracterizado al nivel estructural y sus funciones todavía no han sido aclaradas. Todas estas proteínas tienen una organización similar en dominios, pero difieren sustancialmente de la estructura prototipo de las ADAMs. Así, las ADAMTS-s carecen del dominio de factor de crecimiento epidérmico, la región transmembrana, y la cola citoplasmática características de las ADAMs, pero contienen una serie de copias de trombospondina, que representan la característica distintiva de los miembros de esta familia de proteínas. El hallazgo de que las ADAMTS pueden estar implicadas en una amplia variedad de procesos biológicos y patológicos ha estimulado la búsqueda de nuevos componentes de la familia.

Una de las estrategias para la identificación de nuevas ADAMTS humanas consistiría en la aplicación de métodos de clonación por homología. Una de las múltiples formas de abordar este método, persigue en un primer paso la búsqueda en bancos de datos accesibles públicamente, de fragmentos de secuencias de nucleótidos de genes humanos generados de manera aleatoria y que tengan similitud con las secuencias de los genes de las desintegrinas ya conocidas. 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. Alternativamente, se puede extender la secuencia hacia los extremos 5' o 3' mediante técnicas de amplificación rápida de los extremos de los ADNcs (NACE). Finalmente, la secuenciación y posterior caracterización de los clones humanos aislados mediante técnicas estándar de Biología Molecular, permitiría confirmar la identificación de nuevas ADAMTS y definir el posible papel de las proteínas codificadas por dichos clones en procesos normales y patológicos de adhesión celular o proteolisis. 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 nueva proteína humana denominada ADAMTS-17.

Un segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen de la ADAMTS-17.

Un tercer objeto de la invención es analizar la expresión del gen de la ADAMTS-17 en tumores humanos.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la invención consistió en la identificación de un gen humano que pudiera codificar una nueva ADAM humana. Para ello la secuencia de aminoácidos de regiones conservadas en las ADAMs descritas 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 identificó en ADN genómico humano secuencias que podrían corresponder a regiones metaloproteasa y disintegrina de una nueva ADAMTS human. Para llevar a cabo su amplificación se sintetizaron dos oligonucleótidos, AD-1 (5'-CACGCAGCCTGGAGCAGGTG-3') y AD-2 (5'-AGGATGGCAATGGCTTCAGG-3'). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para amplificar el fragmento de ADNc correspondiente, empleando como molde DNA total aislado a partir de una genoteca de ADNc humano de pulmón fetal. Para ello se utilizaron 20 pmoles de cada oligonucleótido, aproximadamente 1 microgramo de ADNc, 0,2 mM dNTPs y 1,25 U de Taq DNA polimerasa en un volumen total de 50 microlitros de tampón ExpandLong 3 (Boehringer Mannheim). La amplificación se llevó a cabo en un aparato GeneAmp2400 de Perkin-Elmer, y consistió en 40 ciclos de desnaturalización (15 s, 94°C), hibridación (20 s, 64°C) y extensión (20 s, 72°C). El fragmento de DNA resultante, de 460 pares de bases (pb) se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior extracción con GeneClean. La identidad del fragmento amplificado se verificó mediante su clonación en el vector pUC18 y posterior secuenciación de nucleótidos mediante técnicas estándar de Biología Molecular. La traducción conceptual del fragmento clonado indicó que se trataba de una nuevo miembro de la familia ADAMTS.

Con el fin de obtener una secuencia de ADNc que contuviera la información codificante de la proteína completa, a partir del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos AD-1 y AD-2 se llevó a cabo la extensión de sus extremos 5' y 3' mediante técnicas de amplificación rápida de extremos de ADNcs utilizando ARN de pulmón fetal humano y el método Marathon de Clontech. Tras una serie de amplificaciones sucesivas se obtuvo un fragmento que contenía un codón de terminación en la misma fase de lectura que el resto del ADNc identificado. Finalmente, el ADNc codificante completo se obtuvo por amplificación con los oligonucleótidos ADTS17F (5'-ATGTGTGACGGCGCCCTGCTG-3') y ADTS17R (5'-TCACGAGCTCGGCGGTGGCTG-3'). El análisis informático de la secuencia obtenida reveló la existencia de una fase abierta de lectura, que codifica una proteína de 1095 aminoácidos a la que denominamos ADAMTS-17. Su secuencia de aminoácidos, así como la secuencia nucleotídica que la codifica se muestra como SEQ ID NO: 1. La comparación de esta secuencia de aminoácidos con todas las secuencias presentes en los bancos de datos accesibles públicamente demostró la existencia de un grado significativo de similitud con otras ADAMs y más específicamente con miembros de la familia de las ADAMTS (J. Biol. Chem. 274, 25555, (1999)). Así, la proteína presenta todos los motivos característicos de estos enzimas incluyendo la secuencia señal, el propéptido, los dominios metaloproteasa, disintegrina y rico en cisteína, así como diversas repeticiones tipo trombospondina (TS).

Un análisis más detallado de la secuencia de aminoácidos deducida para la ADAMTS-17 determinó la existencia de un prodominio en el que se localiza un residuo de cisteína (posición 201) que podrían estar implicado en el mantenimiento de la latencia enzimática. Este prodominio termina en un motivo dibásico que podía corresponder al sitio de activación por furina, que poseen estos enzimas. El dominio catalítico incluye la secuencia HEXXHXXGXXHD (posiciones 389-400) implicado en la coordinación del átomo de zinc en el centro activo de las metaloproteasas, y con el residuo de ácido aspártico que permite distinguir las reprotolisinas de las MMPs. Este dominio también posee el residuo de metionina (posición 413) que contribuye a formar la estructura Met-giro presente en reprotolisinas y MMPs. Tras el dominio catalítico puede reconocerse el dominio disintegrina, similar en tamaño al de otras ADAMTS y con las ocho cisteínas altamente conservadas en dicha región. Finalmente, el dominio rico en cisteínas muestra un alto porcentaje de identidades (alrededor del 50%) con el dominio equivalente presente en otras ADAMTS incluyendo los diez residuos de cisteína conservados en todas ellas. Por todo ello, podemos concluir que la proteína identificada pertenece a la familia de las ADAMTS y ha sido denominada ADAMTS-17. La secuencia fue depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso AJ315735. Tanto el ADN aislado como el polipéptido codificado, representados en SEQ ID NO: 1, como secuencias parciales obtenidas de ambos, pueden sintetizarse químicamente también.

El segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen de la ADAMTS-17. Con este fin, se realizaron reacciones de amplificación mediante técnicas de PCR de ADNcs de diversas genotecas de tejidos humanos adultos (próstata, cerebros, mama, glándula submaxilar, endotelio, placenta, hígado, aorta, ovario) y fetales (corazón, pulmón, hígado y riñón). Para ellos se utilizaron 20 pmoles los oligonucleótidos específicos AD-1 y AD2. Para ello se utilizaron 20 pmoles de cada oligonucleótido, aproximadamente 1 microgramo de ADNc, 0,2 mM dNTPs y 1,25 U de Taq DNA polimerasa en un volumen total de 50 microlitros de tampón ExpandLong 3 (Boehringer Mannheim). La amplificación se llevó a cabo en un aparato GeneAmp2400 de Perkin-Elmer, y consistió en 40 ciclos de desnaturalización (15 s, 94°C), hibridación (20 s, 64°C) y extensión (20 s, 72°C). Como puede observarse en la figura 1, tras hibridación con la sonda de ADAMTS-17, se detectó un producto de amplificación en la genotecas de ADNc de pulmón fetal, así como de ovario adulto. La confirmación de que se trataba de ADAMTS17 se hizo mediante

ES 2 201 874 B1

la secuenciación directa del producto de amplificación y posterior traducción conceptual de la secuencia obtenida.

El tercer objeto de la invención consistió en el estudio de la expresión del gen de la ADAMTS-17 en muestras obtenidas de tumores humanos. Se realizó de forma similar a la anterior, utilizando ADNc de genotecas de carcinoma mamario y de osteosarcoma.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de la expresión de ADAMTS17 en las diversas genotecas de ADNc analizadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-17 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) Comparar la secuencia de nucleótidos de regiones conservadas en proteínas ADAMTS con las secuencias parciales de nucleótidos presentes en las bases de datos de genes expresados.
- b) Identificar fragmentos homólogos y amplificarlos mediante PCR de RNA 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 humano o como moldes informativos para extender la secuencia hacia los extremos 5' o 3'.
- d) Aislar los clones de ADNc obtenidos y determinar su secuencia completa de nucleótidos.

2. Procedimiento de identificación de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque la secuencia génica identificada codifica una proteína humana denominada ADAMTS-17.

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 de SEQ ID NO: 1 y sus polimorfismos, transcritos alternativos, mutaciones, derivados o secuencias parciales, que codifiquen un enzima con actividad proteolítica o de regulación de procesos de adhesión celular, homeostasis y angiogénesis.

5. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en el diseño de inhibidores de la actividad de la ADAMTS-17.

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

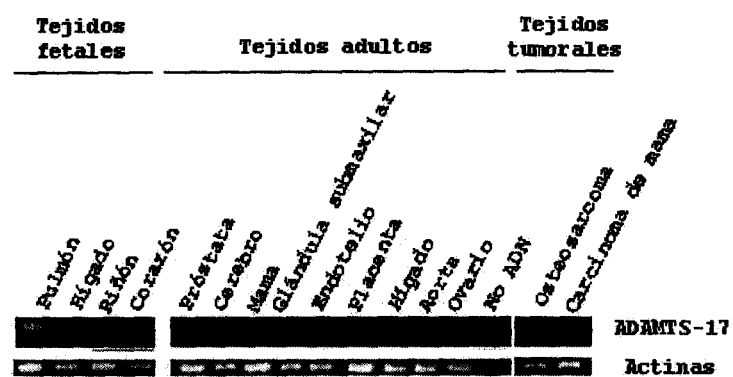
7. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de anticuerpos.

8. Utilización de la secuencia SEQ ID NO: 1 en la producción de sistemas de detección de proteínas con alguna de las actividades descritas para las ADAMTS-s 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 ADAMTS-s, y/o por genes que codifican para las mismas.

10. Secuencia de aminoácidos completa o partes de la misma, reflejadas en SEQ ID NO: 1.

FIGURA 1



LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

SOLICITANTE:

NOMBRE: Universidad de Oviedo

CALLE: San Francisco, 3

CIUDAD: Oviedo

PAÍS: España

CÓDIGO POSTAL: 33003

TELÉFONO: 34 (9)8 510 4058

FACSÍMIL: 34 (9)8 522 7126

TÍTULO DE LA INVENCION: Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-17

NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE MEDIO: Disco flexible

ORDENADOR: PC IBM compatible

SISTEMA OPERATIVO: Windows 97

SOPORTE LÓGICO: Microsoft Word 7.0

DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

NUMERO DE LA SOLICITUD:

DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR

NÚMERO DE LA SOLICITUD:

FECHA DE PRESENTACIÓN:

INFORMACIÓN CONCERNIENTE A SEQ ID NO: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 3695

TIPO: ácido nucleico

NUMERO DE HEBRAS: doble

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

FUENTE DE ORIGEN:

ORGANISMO: *Homo Sapiens*

TIPO DE CÉLULA:

FUENTE INMEDIATA:

GENOTECA: pulmón fetal

CLON:

ES 2 201 874 B1

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación

LOCALIZACION: 1..3

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

LOCALIZACIÓN: 1..3250

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: codón de parada

LOCALIZACIÓN: 3251..3253

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1 (Depositada en el GeneBank Database el 23 de Junio de 2001, con número de acceso AJ315735)

ATG TGT GAC GGC GCC CTG CTG CCT CCG CTC GTC CTG CCC GTG CTG CTG 48

Met Cys Asp Gly Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val Leu Pro Val Leu Leu

1 5 10 15

CTG CTG GTT TGG GGA CTG GAC CCG GGC ACA GCT GTC GGC GAC GCG GCG 96

Leu Leu Val Trp Gly Leu Asp Pro Gly Thr Ala Val Gly Asp Ala Ala

20 25 30

GCC GAC GTG GAG GTG GTG CTC CCG TGG CGG GTG CGC CCC GAC GAC GTG 144

Ala Asp Val Glu Val Val Leu Pro Trp Arg Val Arg Pro Asp Asp Val

35 40 45

CAC CTG CCG CCG CTG CCC GCA GCC CCC GGG CCC CGA CGG CGG CGA CGC 192

His Leu Pro Pro Leu Pro Ala Ala Pro Gly Pro Arg Arg Arg Arg Arg

50 55 60

CCC CGC ACG CCC CCA GCC GCC CCG CGC GCC CGG CCC GGA GAG CGC GCC 240

Pro Arg Thr Pro Pro Ala Ala Pro Arg Ala Arg Pro Gly Glu Arg Ala

65 70 75 80

CTG CTG CTG CAC CTG CCG GCC TTC GGG CGC GAC CTG TAC CTT CAG CTG 288

Leu Leu Leu His Leu Pro Ala Phe Gly Arg Asp Leu Tyr Leu Gln Leu

85 90 95

CGC CGC GAC CTG CGC TTC CTG TCC CGA GGC TTC GAG GTG GAG GAG GCG 336

Arg Arg Asp Leu Arg Phe Leu Ser Arg Gly Phe Glu Val Glu Glu Ala

100 105 110

GGC GCG GCC CGG CGC CGC GGC CGC CCC GCC GAG CTG TGC TTC TAC TCG 384

Gly Ala Ala Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala Glu Leu Cys Phe Tyr Ser

115 120 125

GGC CGT GTG CTC GGC CAC CCC GGC TCC CTC GTC TCG CTC AGC GCC TGC 432

Gly Arg Val Leu Gly His Pro Gly Ser Leu Val Ser Leu Ser Ala Cys

130 135 140

ES 2 201 874 B1

5	GGC GCC GCC GGC GGC CTG GTT GGC CTC ATT CAG CTT GGG CAG GAG CAG Gly Ala Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu Ile Gln Leu Gly Gln Glu Gln 145 150 155 160	480
10	GTG CTA ATC CAG CCC CTC AAC AAC TCC CAG GGC CCA TTC AGT GGA CGA Val Leu Ile Gln Pro Leu Asn Asn Ser Gln Gly Pro Phe Ser Gly Arg 165 170 175	528
15	GAA CAT CTG ATC AGG CGC AAA TGG TCC TTG ACC CCC AGC CCT TCT GCT Glu His Leu Ile Arg Arg Lys Trp Ser Leu Thr Pro Ser Pro Ser Ala 180 185 190	576
20	GAG GCC CAG AGA CCT GAG CAG CTC TGC AAG GTT CTA ACA GAA AAG AAG Glu Ala Gln Arg Pro Glu Gln Leu Cys Lys Val Leu Thr Glu Lys Lys 195 200 205	624
25	AAG CCG ACG TGG GGC AGG CCT TCG CGG GAC TGG CGG GAG CGG AGG AAC Lys Pro Thr Trp Gly Arg Pro Ser Arg Asp Trp Arg Glu Arg Arg Asn 210 215 220	672
30	GCT ATC CGG CTC ACC AGC GAG CAC ACG GTG GAG ACC CTG GTG GTG GCC Ala Ile Arg Leu Thr Ser Glu His Thr Val Glu Thr Leu Val Val Ala 225 230 235 240	720
35	GAC GCC GAC ATG GTG CAG TAC CAC GGG GCC GAG GCC GCC CAG AGG TTC Asp Ala Asp Met Val Gln Tyr His Gly Ala Glu Ala Ala Gln Arg Phe 245 250 255	768
40	ATC CTG ACC GTC ATG AAC ATG GTA TAC AAT ATG TTT CAG CAC CAG AGC Ile Leu Thr Val Met Asn Met Val Tyr Asn Met Phe Gln His Gln Ser 260 265 270	816
45	CTG GGG ATT AAA ATT AAC ATT CAA GTG ACC AAG CTT GTC CTG CTA CGA Leu Gly Ile Lys Ile Asn Ile Gln Val Thr Lys Leu Val Leu Leu Arg 275 280 285	864
50	CAA CGT CCC GCT AAG TTG TCC ATT GGG CAC CAT GGT GAG CGG TCC CTG Gln Arg Pro Ala Lys Leu Ser Ile Gly His His Gly Glu Arg Ser Leu 290 295 300	912
55	GAG AGC TTC TGT CAC TGG CAG AAC GAG GAG TAT GGA GGA GCG CGA TAC	960

ES 2 201 874 B1

	Glu Ser Phe Cys His Trp Gln Asn Glu Glu Tyr Gly Gly Ala Arg Tyr	
	305 310 315 320	
5		
	CTC GGC AAT AAC CAG GTT CCC GGC GGG AAG GAC GAC CCG CCC CTG GTG	1008
	Leu Gly Asn Asn Gln Val Pro Gly Gly Lys Asp Asp Pro Pro Leu Val	
10	325 330 335	
	GAT GCT GCT GTG TTT GTG ACC AGG ACA GAT TTC TGT GTA CAC AAA GAT	1056
	Asp Ala Ala Val Phe Val Thr Arg Thr Asp Phe Cys Val His Lys Asp	
15	340 345 350	
	GAA CCG TGT GAC ACT GTT GGA ATT GCT TAC TTA GGA GGT GTG TGC AGT	1104
20	Glu Pro Cys Asp Thr Val Gly Ile Ala Tyr Leu Gly Gly Val Cys Ser	
	355 360 365	
	GCT AAG AGG AAG TGT GTG CTT GCC GAA GAC AAT GGT CTC AAT TTG GCC	1152
25	Ala Lys Arg Lys Cys Val Leu Ala Glu Asp Asn Gly Leu Asn Leu Ala	
	370 375 380	
30		
	TTT ACC ATC GCC CAT GAG CTG GGC CAC AAC TTG GGC ATG AAC CAC GAC	1200
	Phe Thr Ile Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp	
35	385 390 395 400	
	GAT GAC CAC TCA TCT TGC GCT GGC AGG TCC CAC ATC ATG TCA GGA GAG	1248
40	Asp Asp His Ser Ser Cys Ala Gly Arg Ser His Ile Met Ser Gly Glu	
	405 410 415	
	TGG GTG AAA GGC CGG AAC CCA AGT GAC CTC TCT TGG TCC TCC TGC AGC	1296
45	Trp Val Lys Gly Arg Asn Pro Ser Asp Leu Ser Trp Ser Ser Cys Ser	
	420 425 430	
	CGA GAT GAC CTT GAA AAC TTC CTC AAG TCA AAA GTC AGC ACC TGC TTG	1344
50	Arg Asp Asp Leu Glu Asn Phe Leu Lys Ser Lys Val Ser Thr Cys Leu	
	435 440 445	
55		
	CTA GTC ACG GAC CCC AGA AGC CAG CAC ACA GTA CGC CTC CCG CAC AAG	1392
	Leu Val Thr Asp Pro Arg Ser Gln His Thr Val Arg Leu Pro His Lys	
60	450 455 460	
	CTG CCG GGC ATG CAC TAC AGT GCC AAC GAG CAG TGC CAG ATC CTG TTT	1440
65	Leu Pro Gly Met His Tyr Ser Ala Asn Glu Gln Cys Gln Ile Leu Phe	
	465 470 475 480	

ES 2 201 874 B1

5	GGC ATG AAT GCC ACC TTC TGC AGA AAC ATG GAG CAT CTA ATG TGT GCT Gly Met Asn Ala Thr Phe Cys Arg Asn Met Glu His Leu Met Cys Ala	1488
	485 490 495	
10	GGA CTG TGG TGC CTG GTA GAA GGA GAC ACA TCC TGC AAG ACC AAG CTG Gly Leu Trp Cys Leu Val Glu Gly Asp Thr Ser Cys Lys Thr Lys Leu	1536
	500 505 510	
15	GAC CCT CCC CTG GAT GGC ACC GAG TGT GGG GCA GAC AAG TGG TGC CGC Asp Pro Pro Leu Asp Gly Thr Glu Cys Gly Ala Asp Lys Trp Cys Arg	1584
	515 520 525	
20	GCG GGG GAG TGC GTG AGC AAG ACG CCC ATC CCG GAG CAT GTG GAC GGA Ala Gly Glu Cys Val Ser Lys Thr Pro Ile Pro Glu His Val Asp Gly	1632
25	530 535 540	
30	GAC TGG AGC CCG TGG GGC GCC TGG AGC ATG TGC AGC CGA ACA TGT GGG Asp Trp Ser Pro Trp Gly Ala Trp Ser Met Cys Ser Arg Thr Cys Gly	1680
	545 550 555 560	
35	ACG GGA GCC CGC TTC AGG CAG AGG AAA TGT GAC AAC CCC CCC CCT GGG Thr Gly Ala Arg Phe Arg Gln Arg Lys Cys Asp Asn Pro Pro Pro Gly	1728
	565 570 575	
40	CCT GGA GGC ACA CAC TGC CCG GGT GCC AGT GTA GAA CAT GCG GTC TGC Pro Gly Gly Thr His Cys Pro Gly Ala Ser Val Glu His Ala Val Cys	1776
	580 585 590	
45	GAG AAC CTG CCC TGC CCC AAG GGT CTG CCC AGC TTC CGG GAC CAG CAG Glu Asn Leu Pro Cys Pro Lys Gly Leu Pro Ser Phe Arg Asp Gln Gln	1824
50	595 600 605	
55	TGC CAG GCA CAC GAC CGG CTG AGC CCC AAG AAG AAA GGC CTG CTG ACA Cys Gln Ala His Asp Arg Leu Ser Pro Lys Lys Lys Gly Leu Leu Thr	1872
	610 615 620	
60	GCC GTG GTG GTT GAC GAT AAG CCA TGT GAA CTC TAC TGC TCG CCC CTC Ala Val Val Val Asp Asp Lys Pro Cys Glu Leu Tyr Cys Ser Pro Leu	1920
	625 630 635 640	
65	GGG AAG GAG TCC CCA CTG CTG GTG GCC GAC AGG GTC CTG GAC GGT ACA	1968

ES 2 201 874 B1

	Gly Lys Glu Ser Pro Leu Leu Val Ala Asp Arg Val Leu Asp Gly Thr	
	645 650 655	
5		
	CCC TGC GGG CCC TAC GAG ACT GAT CTC TGC GTG CAC GGC AAG TGC CAG	2016
	Pro Cys Gly Pro Tyr Glu Thr Asp Leu Cys Val His Gly Lys Cys Gln	
10	660 665 670	
	AAA ATC GGC TGT GAC GGC ATC ATC GGG TCT GCA GCC AAA GAG GAC AGA	2064
15	Lys Ile Gly Cys Asp Gly Ile Ile Gly Ser Ala Ala Lys Glu Asp Arg	
	675 680 685	
	TGC GGG GTC TGC AGC GGG GAC GGC AAG ACC TGC CAC TTG GTG AAG GGC	2112
20	Cys Gly Val Cys Ser Gly Asp Gly Lys Thr Cys His Leu Val Lys Gly	
	690 695 700	
	GAC TTC AGC CAC GCC CGG GGG ACA GCT CTC AAA GAC TCG GGT AAG GGG	2160
25	Asp Phe Ser His Ala Arg Gly Thr Ala Leu Lys Asp Ser Gly Lys Gly	
	705 710 715 720	
30		
	TCC ATC AAC AGT GAC TGG AAG ATA GAG CTC CCC GGA GAG TTC CAG ATT	2208
	Ser Ile Asn Ser Asp Trp Lys Ile Glu Leu Pro Gly Glu Phe Gln Ile	
35	725 730 735	
	GCA GGC ACA ACT GTT CGC TAT GTG AGA AGG GGG CTG TGG GAG AAG ATC	2256
40	Ala Gly Thr Thr Val Arg Tyr Val Arg Arg Gly Leu Trp Glu Lys Ile	
	740 745 750	
	TCT GCC AAG GGA CCA ACC AAA CTA CCG CTG CAC TTG ATG GTG TTG TTA	2304
45	Ser Ala Lys Gly Pro Thr Lys Leu Pro Leu His Leu Met Val Leu Leu	
	755 760 765	
	TTT CAC GAC CAA GAT TAT GGA ATT CAT TAT GAA TAC ACT GTT CCT GTA	2352
50	Phe His Asp Gln Asp Tyr Gly Ile His Tyr Glu Tyr Thr Val Pro Val	
	770 775 780	
55		
	AAC CGC ACT GCG GAA AAT CAA AGC GAA CCA GAA AAA CCG CAG GAC TCT	2400
	Asn Arg Thr Ala Glu Asn Gln Ser Glu Pro Glu Lys Pro Gln Asp Ser	
60	785 790 795 800	
	TTG TTC ATC TGG ACC CAC AGC GGC TGG GAA GGG TGC AGT GTG CAG TGC	2448
65	Leu Phe Ile Trp Thr His Ser Gly Trp Glu Gly Cys Ser Val Gln Cys	
	805 810 815	

ES 2 201 874 B1

5	GGC GGA GGG GAG CGC AGA ACC ATC GTC TCG TGT ACA CGG ATT GTC AAC Gly Gly Gly Glu Arg Arg Thr Ile Val Ser Cys Thr Arg Ile Val Asn 820 825 830	2496
10	AAG ACC ACA ACT CTG GTG AAC GAC AGT GAC TGC CCT CAA GCA AGC CGC Lys Thr Thr Thr Leu Val Asn Asp Ser Asp Cys Pro Gln Ala Ser Arg 835 840 845	2544
15	CCA GAG CCC CAG GTC CGA AGG TGC AAC TTG CAC CCC TGC CAG TCA CGG Pro Glu Pro Gln Val Arg Arg Cys Asn Leu His Pro Cys Gln Ser Arg 850 855 860	2592
20	TGG GTG GCA GGC CCG TGG AGC CCC TGC TCG GCG ACC TGT GAG AAA GGC Trp Val Ala Gly Pro Trp Ser Pro Cys Ser Ala Thr Cys Glu Lys Gly 865 870 875 880	2640
25	TTC CAG CAC CGG GAG GTG ACC TGC GTG TAC CAG CTG CAG AAC GGC ACA Phe Gln His Arg Glu Val Thr Cys Val Tyr Gln Leu Gln Asn Gly Thr 885 890 895	2688
30	CAC GTC GCT ACG CGG CCC CTC TAC TGC CCG GGC CCC CGG CCG GCG GCA His Val Ala Thr Arg Pro Leu Tyr Cys Pro Gly Pro Arg Pro Ala Ala 900 905 910	2736
35	GTG CAG AGC TGT GAA GGC CAG GAC TGC CTG TCC ATC TGG GAG GCG TCT Val Gln Ser Cys Glu Gly Gln Asp Cys Leu Ser Ile Trp Glu Ala Ser 915 920 925	2784
40	GAG TGG TCA CAG TGC TCT GCC AGC TGT GGT AAA GGG GTG TGG AAA CGG Glu Trp Ser Gln Cys Ser Ala Ser Cys Gly Lys Gly Val Trp Lys Arg 930 935 940	2832
45	ACC GTG GCG TGC ACC AAC TCA CAA GGG AAA TGC GAC GCA TCC ACG AGG Thr Val Ala Cys Thr Asn Ser Gln Gly Lys Cys Asp Ala Ser Thr Arg 945 950 955 960	2880
50	CCG AGA GCC GAG GAG GCC TGC GAG GAC TAC TCA GGC TGC TAC GAG TGG Pro Arg Ala Glu Glu Ala Cys Glu Asp Tyr Ser Gly Cys Tyr Glu Trp 965 970 975	2928
55	AAA ACT GGG GAC TGG TCT ACG TGC TCG TCG ACC TGC GGG AAG GGC CTG	2976

ES 2 201 874 B1

	Lys Thr Gly Asp Trp Ser Thr Cys Ser Ser Thr Cys Gly Lys Gly Leu	
	980 985 990	
5		
	CAG TCC CGG GTG GTG CAG TGC ATG CAC AAG GTC ACA GGG CGC CAC GGC	3024
	Gln Ser Arg Val Val Gln Cys Met His Lys Val Thr Gly Arg His Gly	
10	995 1000 1005	
	AGC GAG TGC CCC GCC CTC TCG AAG CCT GCC CCC TAC AGA CAG TGC TAC	3072
15	Ser Glu Cys Pro Ala Leu Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Arg Gln Cys Tyr	
	1010 1015 1020	
	CAG GAG GTC TGC AAC GAC AGG ATC AAC GCC AAC ACC ATC ACC TCC CCC	3120
20	Gln Glu Val Cys Asn Asp Arg Ile Asn Ala Asn Thr Ile Thr Ser Pro	
	1025 1030 1035 1040	
25	CGC CTT GCT GCT CTG ACC TAC AAA TGC ACA CGA GAC CAG TGG ACG GTA	3168
	Arg Leu Ala Ala Leu Thr Tyr Lys Cys Thr Arg Asp Gln Trp Thr Val	
	1045 1050 1055	
30		
	TAT TGC CGG GTC ATC CGA GAA AAG AAC CTC TGC CAG GAC ATG CGG TGG	3216
	Tyr Cys Arg Val Ile Arg Glu Lys Asn Leu Cys Gln Asp Met Arg Trp	
35	1060 1065 1070	
	TAC CAG CGC TGC TGC CAG ACC TGC AGG GAC TTC TAT GCA AAC AAG ATG	3264
40	Tyr Gln Arg Cys Cys Gln Thr Cys Arg Asp Phe Tyr Ala Asn Lys Met	
	1075 1080 1085	
	CGC CAG CCA CCG CCG AGC TCG TGA CACGCAGTCC CAAGGGTCGC TCAA	3312
45	Arg Gln Pro Pro Pro Ser Ser	
	1090 1095	
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 201 874

⑫ Nº de solicitud: 200102166

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.09.2001**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.7:** C12N 9/64, C12Q 1/37, C07K 16/40, A61K 38/48

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0053774 A2 (NEUROCRINE BIOSCIENCE) 14.09.2000, descripción; reivindicaciones.	1-10
X	EP 1004647 A (KUREHA CHEMICAL IND) 31.05.2000, páginas 16-20; reivindicaciones.	1-10
X	WO 0134785 A1 (YAMANOUCHI PHAR. CO. LTD) 17.05.2001	1-10
X	WO 0159133 A (MERCK PATENT GMBH) 16.08.2001	4,10
X	WO 0053774 A (CLARK MELODY) 14.09.2000, ejemplo 3; reivindicación 1.	1,4,10

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 nº:

Fecha de realización del informe

10.02.2004

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1