



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 204 209**

② Número de solicitud: 200001981

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/57**

C12N 15/12

C12N 9/64

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **31.07.2000**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.2004

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo
Plaza del Riego, nº4 (Edificio Histórico)
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑦ Inventor/es: **Balbín Felechosa, Milagros;
Fueyo Silva, Antonio y
López Otín, Carlos**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de identificación de las metaloproteasas murina mcol-a y mcol-b.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de identificación de las metaloproteasas murina mcol-a y mcol-b.

Procedimiento de identificación de las metaloproteasas murina mcol-a.

La invención consiste en identificar en librerías genómicas de ratón fragmentos de genes similares a secuencias de genes de metaloproteasas humanas, amplificarlos mediante PCR de RNA de tejidos murinos, extender la secuencia de los fragmentos obtenidos hacia los extremos 5' y 3' y determinar la secuencia de los clones de cDNA generados. La secuencia identificada es SEQ ID NO: 1 y se ha denominado Mcol-A. La aplicación de dicha secuencia está relacionada fundamentalmente con la diagnosis y el tratamiento de los procesos de destrucción tisular.

ES 2 204 209 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de las metaloproteasas murina mcol-a y mcol-b.

Procedimiento de identificación de las metaloproteasas murina mcol-a.

Campo de la invención

La invención se enmarca dentro del estudio de los procesos biológicos de remodelación tisular, incluyendo los asociados a condiciones fisiológicas como el desarrollo fetal, la implantación embrionaria, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, o los procesos reproductivos, así como procesos patológicos incluyendo los artríticos, tumorales, neurodegenerativos y cardiovasculares. En concreto, la presente invención versa sobre la identificación de una metaloproteasa de matriz extra-celular, sobre el gen que la codifica, y sobre sus posibles inhibidores. Más particularmente, la presente invención aborda la identificación de la proteasa murina denominada Mcol-A, y el análisis de su estructura y de sus posibles funciones normales y patológicas.

Estado de la técnica

La remodelación proteolítica de la matriz extracelular es un acontecimiento esencial en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Numerosos trabajos han permitido concluir que las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) desempeñan un papel fundamental en todos estos procesos (J. Biol. Chem. 274, 21491, (1999)). Estos enzimas constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que son capaces de degradar a pH neutro los diversos componentes proteicos de la matriz extracelular. Hasta el momento, se han identificado más de 20 MMPs que de acuerdo con su especificidad de sustrato, estructura primaria y localización celular, pueden clasificarse en cinco grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, MT-MMPs y otras. La mayoría de los miembros de la familia de las MMPs se organizan en tres dominios distintivos y bien definidos: un propéptido amino-terminal con un residuo conservado de cisteína implicado en el mantenimiento de la latencia enzimática; un dominio catalítico con un sitio de unión a zinc; y un dominio hemopexina localizado en la región carboxi-terminal.

La subfamilia de las colagenasas humanas consiste de tres miembros distintos: la colagenasa de fibroblastos (MMP-1), la colagenasa de neutrófilos (MMP-8) y la colagenasa-3 (MMP-13). La caracterización bioquímica de estas colagenasas ha revelado que todas comparten la capacidad de hidrolizar el colágeno fibrilar en un enlace peptídico específico, lo cual conduce a la generación de dos fragmentos, cuyos tamaños son aproximadamente de 3/4 y 1/4 del de la molécula intacta. Estos fragmentos se desnaturalizan espontáneamente a temperatura fisiológica, siendo entonces susceptibles de ser hidrolizados por otras MMPs. Es interesante destacar que las tres colagenasas humanas muestran distinta preferencia de sustrato frente a los distintos colágenos fibrilares. Así, la MMP-1 degrada preferentemente colágeno tipo III, la MMP-8 el colágeno tipo I y la MMP-13 degrada el colágeno tipo II 6 veces mejor que el I o el III. Estas observaciones han permitido proponer que las diferentes colagenasas humanas han evolucionado como enzimas especializados para participar en el remodelado de tejidos con diferente composición de colágenos. Asimismo, el hecho de que su distribución tisular y

mecanismos de regulación transcripcional sean diferentes apoyan la idea de que las diversas colagenasas puedan tener distintas funciones, tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Para poder corroborar esta hipótesis de forma experimental, es esencial contar con la disponibilidad de modelos animales en los cuales la actividad de los diferentes dos enzimas pueda ser manipulada de forma selectiva. Con este objetivo general, los autores de la presente invención han llevado a cabo una búsqueda de nuevos genes de metaloproteasas en genotecas murinas de DNA genómico utilizando como sonda el cDNA de la colagenasa de fibroblastos humana (MMP-1). Como resultado de esta búsqueda se han identificado dos nuevos miembros de la familia de las MMPs relacionados con la MMP-1 humana. Tras los pertinentes estudios experimentales han llegado a los objetivos que constituyen los diversos aspectos de la presente invención

Breve descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es identificar genes murinos que codifican proteínas relacionadas con la colagenasa de fibroblastos humana o MMP-1.

Un segundo objeto de la invención es analizar la expresión de los genes identificados durante el desarrollo embrionario.

Un tercer objeto de la invención es analizar la actividad colagenolítica de las proteínas recombinantes producidas en *E. coli*.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la invención consistió en la identificación de genes murinos que pudieran codificar proteínas relacionadas con la colagenasa de fibroblastos o MMP-1 humana. Para ello se utilizó el cDNA que codifica la MMP-1 humana como sonda para hibridar una genoteca genómica de ratón clonada en PACs (*P1 artificial chromosomes*). A partir de uno de los clones positivos obtenidos (PAC 528 C11), se realizaron análisis de restricción y se obtuvieron secuencias parciales de DNA de los fragmentos con hibridación positiva con la sonda de la MMP-1 humana. Estas secuencias permitieron identificar varios exones que codificaban una nueva MMP murina. A partir de la secuencia de nucleótidos de los posibles exones 1 y 10, se diseñaron y sintetizaron dos oligonucleótidos, que fueron utilizados para amplificar el fragmento de cDNA correspondiente, empleando como molde RNA total aislado a partir de embriones de ratón en distintos estadios de desarrollo. En primer lugar, se llevó a cabo una transcripción reversa de RNA a cDNA, utilizando el kit de RNA-PCR de PE Biosystems. La subsiguiente amplificación se realizó utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido, aproximadamente 1 microgramo de cDNA, 0,2 mM dNTPs y 1,25 U de Taq DNA polimerasa en un volumen total de 50 microlitros de tampón *ExpandLong 1* (Boehringer Mannheim), en un aparato GeneAmp2400 de PE Biosystems, y consistió en 40 ciclos de desnaturalización (15 s, 94°C), hibridación (20 s, 60°C) y extensión (50 s, 72°C). El fragmento de DNA resultante, se purificó por electroforesis en gel de agarosa y extracción con *GeneClean* y se subclonó en pUC18. La determinación de la secuencia de nucleótidos mediante técnicas estándar de Biología Molecular reveló una pauta abierta de lectura que codificaba una proteína de 464 aminoácidos con una posible masa molecular de 53.5 kDa, y que fue denominada Mcol-A (*Murine collagenase-like A*). Esta secuencia de aminoácidos, así como la secuencia nucleotídica que la codifica se

muestra como SEQ ID N°:1.

La comparación con todas las secuencias presentes en los bancos de datos accesibles públicamente demostró la existencia de un grado significativo de similitud con otras MMPs, siendo el máximo grado el que presenta con la MMP-1 humana (58% de identidades en aminoácidos y 74% en nucleótidos). El análisis detallado de las secuencias también reveló que la Mcol-A presenta todas las características estructurales propias de una MMP típica. Así, la proteína presenta una secuencia amino-terminal adyacente a la metionina iniciadora y rica en aminoácidos hidrofóbicos que correspondería a la secuencia señal que dirige a estas proteínas a la ruta secretora. Esta secuencia es seguida por un prodominio con el locus de activación que contiene el residuo de cisteína (en posición 88) esencial para el mantenimiento de la latencia enzimática. La secuencia identificada posee un dominio catalítico de alrededor de 170 residuos incluyendo la secuencia HEXGHXXGXXHS (en posiciones 214-225) implicada en la unión de iones metálicos. El dominio catalítico también contiene un residuo de metionina, localizado a siete aminoácidos de distancia del sitio de unión al zinc, y conservado en todas las MMPs. Finalmente, la secuencia identificada posee un fragmento C-terminal de unos 200 aminoácidos, cuya secuencia presenta similitud con la hemopexina. Tanto el ADN aislado como el polipéptido codificado, representado en SEQ ID N°:1, como secuencias parciales obtenidas de ambos, pueden sintetizarse químicamente también.

El segundo objeto de la invención es analizar la expresión del gene Mcol-A durante el desarrollo embrionario murino. Con este fin se transfirió a una membrana de nylon el RNA separado electroforéticamente procedente de embriones de ratón en distintas fases de desarrollo. Tras una prehibridación a 42°C durante tres horas en formamida al 40%, 5x PBS/EDTA (1 x=NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), 10x disolución de Denhardt (1x= Albúmina de suero bovino, 0,02%, polivinilpirrolidona, 0,02%, ficoll, 0,02%), SDS 2% y DNA de esperma de salmón 100 mg/ml, se añadieron las sondas radiactivas y se hibridaron 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 Mcol-A, se detectó hibridación específica en RNA procedente de saco vitelino y de tejido uterino adyacente de especímenes de 9.5 y 10.5 días de desarrollo embrionario, así como en placenta de 13.5, 15.5 y 17.5 días de desarrollo. Esta expresión también fue comprobada en experimentos de PCR acoplada a transcripción reversa, como se muestra en la figura 1b.

La expresión restringida de Mcol-A en placenta y tejido uterino extraembrionario está de acuerdo con su posible implicación en procesos de implantación y desarrollo embrionarios, mientras que su expresión anómala en estos tejidos puede ser responsable de problemas de infertilidad, abortos o enfermedades como la preeclampsia. La falta de expresión significativa del gen estudiado en los demás tejidos normales analizados está de acuerdo con el patrón de expresión de muchas MMPs, que sólo se expresan en procesos de remodelación tisular tanto normales como patológicos.

El tercer objeto de la invención consistió en analizar la actividad colagenolítica de la proteína recombinante producida en *E. coli*. Para llevar a cabo estos estudios, en primer lugar se subclonó el fragmento de cDNA que codifica el prodominio, el dominio catalítico y el dominio hemopexina de la proteína Mcol-A en el vector de expresión pRSETB (Invitrogen). Este fragmento fue generado por amplificación mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos 5'-ggctcgagaTTCCCTGTGATTCA GGAT y 5'-ggaattcTTAGCAGTTGAACCAAGTATTAAT. La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 15s), hibridación (56°C, 15s) y extensión (68°C, 2 min), utilizando el kit *Expand Long High Fidelity* (Roche Molecular Biochemicals) en un termociclador GeneAmp 9700 PCR system (PE Biosystems). El producto amplificado por PCR se digirió con *EcoRI* y *XhoI* y se subclonó en el vector de expresión pRSETB previamente digerido con los mismos enzimas. El vector de expresión generado se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para llevar a cabo la producción de proteína recombinante, las bacterias transformadas con los vectores de expresión se cultivaron en 200 ml de medio 2YT conteniendo ampicilina y cloranfenicol. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.6, se indujeron añadiendo 0.5 mM de isopropil-1 -tio-b-D-galactopiranosido (IPTG), y continuando la incubación durante 3 a 20 h a 30°C. La producción de proteína fue monitorizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Los cuerpos de inclusión se produjeron tras incubar los cultivos a 37°C durante una noche, tras lo cual se purificaron y se solubilizaron en tampón 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 M cloruro de guanidinio y 5 mM 2-mercaptoetanol y se diluyeron en el tampón de plegamiento (20 mM Tris/H₂SO₄, pH 7.5, 5 mM Ca SO₄, 100 mM Na₂SO₄, 0.5 μM ZnSO₄, 2% glicerol, 0.05% NaN₃). Finalmente, la proteína recombinante fue purificada utilizando una columna de afinidad de agarosa y Ni-NTA. La actividad enzimática de la proteína recombinante Mcol-A frente a colágenos fibrilares se monitorizó mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS. Los ensayos se efectuaron en tampón 50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl y 0.05% (v/v) Brij 35, pH 7.6 durante 16 h a 37°C. La relación enzima/sustrato (w/w) utilizada fue de 1/10.

Los estudios realizados señalaron que la proteína recombinante se activa autoproteolíticamente, lo cual indica que está correctamente plegada y posee actividad enzimática. La proteína Mcol-A es capaz de hidrolizar las moléculas de colágeno tipo II generando fragmentos de 3/4 y 1/4 del tamaño de las moléculas originales (Fig. 2).

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis Northern de la expresión del gen Mcol-A en tejidos embrionarios de ratón. a) Se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturizantes muestras de 20 μg de RNA total procedente de embrión completo (WE), saco vitelino (YS) o placenta (P). Tras la electroforesis, se transfirieron a membranas de nylon y se analizaron por hibridación con la sonda correspondiente al cDNA completo de Mcol-A marcada radiactivamente. Los filtros se sometieron a autorradiografía a -70°C durante 7 días utilizando películas y pantallas Kodak BIOMAX MS. b) Experimentos de PCR acoplada a transcripción reversa de RNA (RT-PCR) se llevaron a cabo utilizando

1 μg de RNA procedente de embriones completos o placenta en diferentes estadios de desarrollo. La reacción se llevó a cabo en 50 μl de volumen utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar Mcol-A. 20 μl del producto final se separaron en electroforesis de agarosa al 2%. La calle *BI* muestra un experimento de RT-PCR sin RNA molde añadido. La calle de marcadores corresponde a *Marker V* de Boehringer

Mannheim.

Figura 2. Análisis de la actividad de Mcol-A recombinante sobre colágeno tipo II. El producto de digestión se analizó en electroforesis de poliacrilamida-SDS bajo condiciones reductoras y teñido con azul de Coomassie (calle 1). La calle 2 es colágeno tipo II incubado sólo con los tampones de digestión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de la metaloproteasa murina Mcol-A **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) Hibridar una genoteca genómica de ratón clonada en PACs (*P1 artificial chromosomes*) con la sonda de la MMP-1 humana.
- b) A partir de los clones positivos obtenidos, realizar análisis de restricción y obtener secuencias parciales de DNA de los fragmentos con hibridación positiva con la sonda de la MMP-1 humana. Identificar fragmentos homólogos y amplificarlos mediante PCR de RNA total de tejidos murinos en los que se puedan expresar dichas secuencias génicas.
- c) Utilizar los fragmentos amplificados como sondas para hibridar genotecas de cDNA murino o como moldes informativos para extender la secuencia hacia los extremos 5' o 3'.
- d) Aislar los clones de cDNA obtenidos y determinar su secuencia completa de nucleótidos.

2. Procedimiento de identificación de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque la secuen-

cia génica identificada codifica la metaloproteasa denominada Mcol-A.

3. Procedimiento de identificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la secuencia génica identificada y su secuencia de aminoácidos deducida es SEQ ID N°: 1.

4. Secuencias génicas de SEQ ID N°: 1 y sus polimorfismos, mutaciones, derivados o secuencias parciales, que codifiquen enzimas con actividad proteolítica.

5. Utilización de la secuencia SEQ ID N°: 1 en el diseño de inhibidores de la actividad proteolítica de metaloproteasas.

6. Utilización de la secuencia SEQ ID N°: 1 en la producción de proteínas recombinantes o sintéticas.

7. Utilización de la secuencia SEQ ID N°: 1 en la producción de anticuerpos.

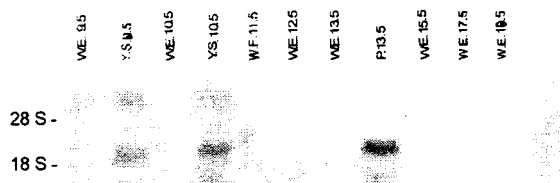
8. Utilización de la secuencia SEQ ID N°: 1 en la producción de sistemas de detección de proteínas con actividad proteolítica y/o de los genes que codifican para las mismas.

9. Utilización de la secuencia SEQ ID N°: 1 en la producción de composiciones activas en el tratamiento de procesos patológicos mediados por proteasas, y/o por genes que codifican para las mismas.

10. Secuencia de aminoácidos completa o partes de la misma, reflejadas en la SEQ ID N°:1.

Figura 1

A



B

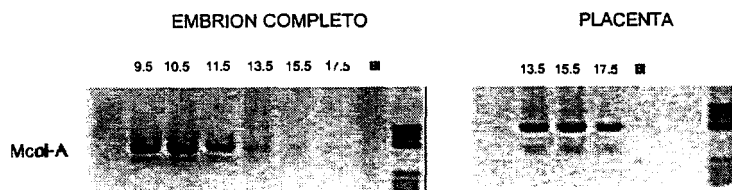


Figura 2



ES 2 204 209 A1

LISTAS DE SECUENCIAS

Listado de secuencias

5	<110> Universidad de Oviedo Balbín, Milagros Fueyo, Antonio López-Otín, Carlos	
	<120> Procedimiento de identificación de la metaloproteasa murina Mco1A	
10	<150> P200001981 <151> 2000-07-31 <160> 1 <210> SEQ ID N°:1 <211> 1525 <212> DNA	
15	<213> Mus musculus <220><221> CDS <222> (11)..(1405) <400> 1	
20	aagcttcgac atg cca agc ctt cct ttg ctg ttg ctt ctc tgg gct gct Met Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Trp Ala Ala 1 5 10	49
25	agc tca tac agt ttc cct gtg ttt cac aac gga gac cgg caa aat gtg Ser Ser Tyr Ser Phe Pro Val Phe His Asn Gly Asp Arg Gln Asn Val 15 20 25	97
30	gag aca gtc tgg aaa tac ctg gaa aac tac tac aac ttg ggc aaa aac Glu Thr Val Trp Lys Tyr Leu Glu Asn Tyr Tyr Asn Leu Gly Lys Asn 30 35 40 45	145
35	atg caa gca aaa aac gtg aat ggc aag gag atg atg gct gaa aag ctg Met Gln Ala Lys Asn Val Asn Gly Lys Glu Met Met Ala Glu Lys Leu 50 55 60	193
40	agg caa atg cag cag tta ttt ggg ctg aaa gtg act gga aat tca gat Arg Gln Met Gln Gln Leu Phe Gly Leu Lys Val Thr Gly Asn Ser Asp 65 70 75	241
45	cct gaa acc ctg aga gct atg aag aag ccc agg tgt ggg gtg cct gat Pro Glu Thr Leu Arg Ala Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp 80 85 90	289
50	gtg gcc cca tat gcc att act cac aac aat cct cgt tgg acc aaa aca Val Ala Pro Tyr Ala Ile Thr His Asn Asn Pro Arg Trp Thr Lys Thr 95 100 105	337
55	cat ctg aca tac agc att tta aac tac aca cca tat ttg cca aaa gca His Leu Thr Tyr Ser Ile Leu Asn Tyr Thr Pro Tyr Leu Pro Lys Ala 110 115 120 125	385
60	gtt gtg gaa gat gcc atc gcg aga gcc ttt aga gtc tgg agt gat gtg Val Val Glu Asp Ala Ile Ala Arg Ala Phe Arg Val Trp Ser Asp Val 130 135 140	433
65	aca cca ctt acg ttc caa aga gtc ttt gag gag gaa ggc gat att gtg Thr Pro Leu Thr Phe Gln Arg Val Phe Glu Glu Glu Gly Asp Ile Val 145 150 155	481

ES 2 204 209 A1

5	<p>ctc tcc ttc cac aga gga gac cat ggt gac aac aac cca ttt gat gga 529 Leu Ser Phe His Arg Gly Asp His Gly Asp Asn Asn Pro Phe Asp Gly 160 165 170</p>
10	<p>cct aac tat aag ctt gct cac act ttc cag cca ggc cca ggt ttg ggg 577 Pro Asn Tyr Lys Leu Ala His Thr Phe Gln Pro Gly Pro Gly Leu Gly 175 180 185</p>
15	<p>ggt gat gtt cat tat gac ctt gat gag acg tgg acc aac agc agt gaa 625 Gly Asp Val His Tyr Asp Leu Asp Glu Thr Trp Thr Asn Ser Ser Glu 190 195 200 205</p>
20	<p>aat ttc aac ttg ttc tat gtt acg gct cat gaa ctg ggt cac tcc ctt 673 Asn Phe Asn Leu Phe Tyr Val Thr Ala His Glu Leu Gly His Ser Leu 210 215 220</p>
25	<p>ggg ctc act cat tct agt gat ata gga gca cta atg ttc ccc agt tac 721 Gly Leu Thr His Ser Ser Asp Ile Gly Ala Leu Met Phe Pro Ser Tyr 225 230 235</p>
30	<p>acg tgg tac act gaa gac ttt gtg cta aac cag gat gat att aat cgc 769 Thr Trp Tyr Thr Glu Asp Phe Val Leu Asn Gln Asp Asp Ile Asn Arg 240 245 250</p>
35	<p>atc cag gac tta tat gga cct tcc cca aat ccc atc cag cca aca ggt 817 Ile Gln Asp Leu Tyr Gly Pro Ser Pro Asn Pro Ile Gln Pro Thr Gly 255 260 265</p>
40	<p>gca aca aca cca cat cca tgt aat ggt gat cta acc ttt gat gct ata 865 Ala Thr Thr Pro His Pro Cys Asn Gly Asp Leu Thr Phe Asp Ala Ile 270 275 280 285</p>
45	<p>act aca ttt agg gga gag gtg ttt ttc ttc aaa ggc agg ttc tac att 913 Thr Thr Phe Arg Gly Glu Val Phe Phe Phe Lys Gly Arg Phe Tyr Ile 290 295 300</p>
50	<p>cgg gta aat aga ttc atg cca gaa cct gag ctc aat tta ata ggt att 961 Arg Val Asn Arg Phe Met Pro Glu Pro Glu Leu Asn Leu Ile Gly Ile 305 310 315</p>
55	<p>ctc tgg cca aat ctt cca gtt aaa ctt gac gct gct tat gaa gct agt 1009 Leu Trp Pro Asn Leu Pro Val Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Glu Ala Ser 320 325 330</p>
60	<p>atg ata gat caa gtc cgc tat ttc aaa ggc agc aaa gta tgg gct gtt 1057 Met Ile Asp Gln Val Arg Tyr Phe Lys Gly Ser Lys Val Trp Ala Val 335 340 345</p>
65	<p>caa gag cag agt gta ctg aga gga ttc ccc aga gac atc cac agt ttc 1105 Gln Glu Gln Ser Val Leu Arg Gly Phe Pro Arg Asp Ile His Ser Phe 350 355 360 365</p>
70	<p>ttt ggc ttc cct agc aat gtg aca cac att gat gct gct gtt tgt gag 1153 Phe Gly Phe Pro Ser Asn Val Thr His Ile Asp Ala Ala Val Cys Glu 370 375 380</p>
75	<p>gaa gag act gga aaa aca tac ttc ttt gtt gac cac atg tac tgg agg 1201 Glu Glu Thr Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Asp His Met Tyr Trp Arg 385 390 395</p>

ES 2 204 209 A1

Lys Leu Ala His Thr Phe Gln Pro Gly Pro Gly Leu Gly Gly Asp Val
 180 185 190
 5 His Tyr Asp Leu Asp Glu Thr Trp Thr Asn Ser Ser Glu Asn Phe Asn
 195 200 205
 Leu Phe Tyr Val Thr Ala His Glu Leu Gly His Ser Leu Gly Leu Thr
 210 215 220
 10 His Ser Ser Asp Ile Gly Ala Leu Met Phe Pro Ser Tyr Thr Trp Tyr
 225 230 235 240
 Thr Glu Asp Phe Val Leu Asn Gln Asp Asp Ile Asn Arg Ile Gln Asp
 245 250 255
 15 Leu Tyr Gly Pro Ser Pro Asn Pro Ile Gln Pro Thr Gly Ala Thr Thr
 260 265 270
 Pro His Pro Cys Asn Gly Asp Leu Thr Phe Asp Ala Ile Thr Thr Phe
 275 280 285
 20 Arg Gly Glu Val Phe Phe Phe Lys Gly Arg Phe Tyr Ile Arg Val Asn
 290 295 300
 Arg Phe Met Pro Glu Pro Glu Leu Asn Leu Ile Gly Ile Leu Trp Pro
 305 310 315 320
 Asn Leu Pro Val Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Glu Ala Ser Met Ile Asp
 325 330 335
 25 Gln Val Arg Tyr Phe Lys Gly Ser Lys Val Trp Ala Val Gln Glu Gln
 340 345 350
 Ser Val Leu Arg Gly Phe Pro Arg Asp Ile His Ser Phe Phe Gly Phe
 355 360 365
 30 Pro Ser Asn Val Thr His Ile Asp Ala Ala Val Cys Glu Glu Glu Thr
 370 375 380
 Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Val Asp His Met Tyr Trp Arg Tyr Asp Glu
 385 390 395 400
 35 Asn Thr Gln Ser Met Asp Pro Gly Tyr Pro Arg Leu Thr Ala Glu Asp
 405 410 415
 Phe Pro Gly Ile Asp Asp Lys Val Asp Asp Val Phe Gln Lys Gly Glu
 420 425 430
 40 Asn Phe Tyr Phe Phe His Gln Ser Val Gln His Arg Phe Asn Leu Gln
 435 440 445
 Ile Arg Arg Val Asp Asp Ser Arg Asp Ser Ser Thr Trp Phe Asn Cys
 450 455 460

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 204 209

② N° de solicitud: 200001981

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/57, 15/12, 9/64

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHORPP, M. et al. "Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene". BIOCHEM J., 1995, Vol. 308, páginas 211-217, todo el documento.	1-10
A	GACK, S. et al. "Phenotypic alterations in Fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1994, Vol. 269, N° 14, páginas 10363-10369, todo el documento.	1-10
A	QUINN, C.O. et al. "Rat collagenase", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1990, Vol. 265, N° 36, páginas 22342-22347, todo el documento.	1-10
A	CATERINA, J. et al. "Isolation, characterization and chromosomal location of the mouse enamelysin gene", GENOMICS, 1999, Vol. 62, páginas 308-311, todo el documento.	1-10

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

12.03.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1