

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 205 989**

②1 Número de solicitud: 200102167

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

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **24.09.2001**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2004**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.05.2004**

⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**  
**Plaza del Riego 4, Edificio Histórico**  
**33003 Oviedo, Asturias, ES**

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

⑦4 Agente: **No consta**

⑤4 Título: **Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15.**

⑤7 Resumen:

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15.

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-15. 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 2 205 989 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15.

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-15, y el análisis de su estructura y de sus posibles funciones normales y patológicas.

15 **Estado de la técnica**

Las proteínas denominadas ADAMs (**a** **d**isintegrin **and** **m**etalloproteínase 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 proteólisis 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 reprotolisinas, 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- $\alpha$  (ADAM-12) se ha implicado en fusión de mioblastos. Las meltrinas  $\alpha$  y  $\beta$  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 (RACE). 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 proteólisis. 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-15.

Un segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen de la ADAMTS-15.

Un tercer objeto de la invención es analizar la expresión del gen de la ADAMTS-15 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'-GTCGAATCTCTTCTTGGAGC-3') y AD-2 (5'-AGCTGCTCTGTCATTGAGGACG-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 hígado 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 un 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 hígado 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 ADTS15F (5'-ATGCTTCTGCTGGGCATCCTA-3') y ADTS15R (5'-TCAGCACGGCCTCAGGACGCA-3'). El análisis informático de la secuencia obtenida reveló la existencia de una fase abierta de lectura, que codifica una proteína de 950 aminoácidos a la que denominamos ADAMTS-15. 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-15 determinó la existencia de un prodominio en el que se localiza un residuo de cisteína (posición 174) 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 HEXHXXGXXHD (posiciones 361-372) 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 390) 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-15 La secuencia fue depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso AJ315733. 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-15. 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-15, se detectó un producto de amplificación en la genotecas de ADNc de hígado y riñón fetales. La confirmación de que se trataba de ADAMTS-15 se hizo mediante la secuenciación

## ES 2 205 989 A1

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-15 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 ADAMTS15 en las diversas genotecas de ADNc analizadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- 10 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.
  - 15 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.
- 20 2. Procedimiento de identificación de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque la secuencia génica identificada codifica una proteína humana denominada ADAMTS-15.
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.
- 25 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-15.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 10. Secuencia de aminoácidos completa o partes de la misma, reflejadas en SEQ ID NO:1.

45

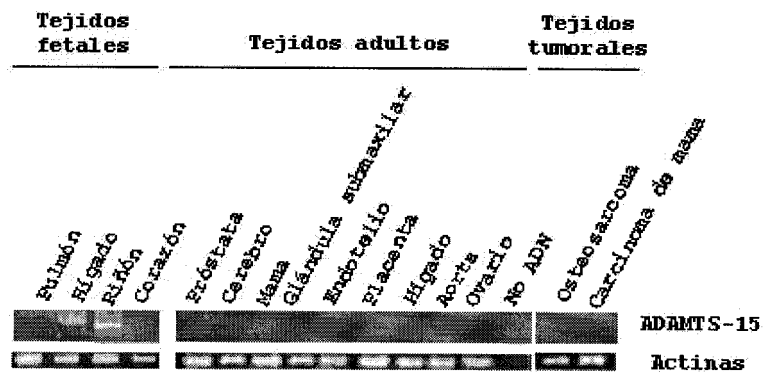
50

55

60

65

FIGURA 1



# ES 2 205 989 A1

## LISTAS 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

FACSIMIL: 34 (9)8 522 7126

#### TÍTULO DE LA INVENCION:

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15

NUMERO 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

NUMERO DE LA SOLICITUD:

FECHA DE PRESENTACIÓN:

#### INFORMACIÓN CONCERNIENTE A SEQ ID NO:1

#### CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2853

TIPO: ácido nucleico

NÚMERO DE HEBRAS: doble

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

#### FUENTE DE ORIGEN:

ORGANISMO: Homo Sapiens

TIPO DE CÉLULA:

#### FUENTE INMEDIATA:

GENOTECA: hígado fetal

CLON:

#### CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación

LOCALIZACIÓN: 1..3

#### CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

LOCALIZACIÓN: 1..2850

#### CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: codón de parada

LOCALIZACIÓN: 2851..2853

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1 (Depositada en el GeneBank Database el 23 de Junio de 2001, con número de acceso AJ315733)

50

55

60

65

# ES 2 205 989 A1

48  
 ATG CTT CTG CTG GGC ATC CTA ACC CTG GCT TTC GCC GGG CGA ACC GCT  
 5 Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala  
 1 5 10 15  
 10 GGA GGC TCT GAG CCA GAG CGG GAG GTA GTC GTT CCC ATC CGA CTG GAC  
 96  
 Gly Gly Ser Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp  
 15 20 25 30  
 20 CCG GAC ATT AAC GGC CGC CGC TAC TAC TGG CGG GGT CCC GAG GAC TCC  
 144  
 Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser  
 35 40 45  
 25 GGG GAT CAG GGA CTC ATT TTT CAG ATC ACA GCA TTT CAG GAG GAC TTT  
 192  
 Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe  
 30 50 55 60  
 35 TAC CTA CAC CTG ACG CCG GAT GCT CAG TTC TTG GCT CCC GCC TTC TCC  
 240  
 Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser  
 65 70 75 80  
 40 ACT GAG CAT CTG GGC GTC CCC CTC CAG GGG CTC ACC GGG GGC TCT TCA  
 288  
 45 Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser  
 85 90 95  
 50 GAC CTG CGA CGC TGC TTC TAT TCT GGG GAC GTG AAC GCC GAG CCG GAC  
 336  
 Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp  
 55 100 105 110  
 60 TCG TTC GCT GCT GTG AGC CTG TGC GGG GGG CTC CGC GGA GCC TTT GGC  
 384  
 65



# ES 2 205 989 A1

Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly  
 115 120 125  
 5  
 TAC CGA GGC GCC GAG TAT GTC ATT AGC CCG CTG CCC AAT GCT AGC GCG  
 432  
 Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala  
 130 135 140  
 10  
 CCG GCG GCG CAG CGC AAC AGC CAG GGC GCA CAC CTT CTC CAG CGC CGG  
 480  
 Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg  
 145 150 155 160  
 15  
 GGT GTT CCG GGC GGG CCT TCC GGA GAC CCC ACC TCT CGC TGC GGG GTG  
 528  
 Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val  
 165 170 175  
 20  
 GCC TCG GGC TGG AAC CCC GCC ATC CTA CGG GCC CTG GAC CCT TAC AAG  
 576  
 Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys  
 180 185 190  
 25  
 CCG CGG CGG GCG GGC TTC GGG GAG AGT CGT AGC CGG CGC AGG TCT GGG  
 624  
 Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Arg Ser Gly  
 195 200 205  
 30  
 CGC GCC AAG CGT TTC GTG TCT ATC CCG CGG TAC GTG GAG ACG CTG GTG  
 672  
 Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val  
 210 215 220  
 35  
 GTC GCG GAC GAG TCA ATG GTC AAG TTC CAC GGC GCG GAC CTG GAA CAT  
 720  
 Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His  
 225 230 235 240  
 40  
 TAT CTG CTG ACG CTG CTG GCA ACG GCG GCG CGA CTC TAC CGC CAT CCC  
 768  
 Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro  
 245 250 255  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 205 989 A1

AGC ATC CTC AAC CCC ATC AAC ATC GTT GTG GTC AAG GTG CTG CTT CTT  
816  
5 Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu Leu  
260 265 270

AGA GAT CGT GAC TCC GGG CCC AAG GTC ACC GGC AAT GCG GCC CTG ACG  
864  
10 Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr  
15 275 280 285

CTG CGC AAC TTC TGT GCC TGG CAG AAG AAG CTG AAC AAA GTG AGT GAC  
912  
20 Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp  
290 295 300

AAG CAC CCC GAG TAC TGG GAC ACT GCC ATC CTC TTC ACC AGG CAG GAC  
960  
25 Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp  
30 305 310 315 320

CTG TGT GGA GCC ACC ACC TGT GAC ACC CTG GGC ATG GCT GAT GTG GGT  
1008  
35 Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly  
325 330 335

ACC ATG TGT GAC CCC AAG AGA AGC TGC TCT GTC ATT GAG GAC GAT GGG  
1056  
40 Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly  
45 340 345 350

CTT CCA TCA GCC TTC ACC ACT GCC CAC GAG CTG GGC CAC GTG TTC AAC  
1104  
50 Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn  
55 355 360 365

ATG CCC CAT GAC AAT GTG AAA GTC TGT GAG GAG GTG TTT GGG AAG CTC  
1152  
60 Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu  
370 375 380

65

# ES 2 205 989 A1

CGA GCC AAC CAC ATG ATG TCC CCG ACC CTC ATC CAG ATC GAC CGT GCC  
 1200  
 5 Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala  
 385 390 395 400

AAC CCC TGG TCA GCC TGC AGT GCT GCC ATC ATC ACC GAC TTC CTG GAC  
 1248  
 10 Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp  
 15 405 410 415

AGC GGG CAC GGT GAC TGC CTC CTG GAC CAA CCC AGC AAG CCC ATC TCC  
 1296  
 20 Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser  
 420 425 430

CTG CCC GAG GAT CTG CCG GGC GCC AGC TAC ACC CTG AGC CAG CAG TGC  
 1344  
 25 Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys  
 30 435 440 445

GAG CTG GCT TTT GGC GTG GGC TCC AAG CCC TGT CCT TAC ATG CAG TAC  
 1392  
 35 Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr  
 450 455 460

TGC ACC AAG CTG TGG TGC ACC GGG AAG GCC AAG GGA CAG ATG GTG TGC  
 1440  
 40 Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys  
 45 465 470 475 480

CAG ACC CGC CAC TTC CCC TGG GCC GAT GGC ACC AGC TGT GGC GAG GGC  
 1488  
 50 Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly  
 55 485 490 495

AAG CTC TGC CTC AAA GGG GCC TGC GTG GAG AGA CAC AAC CTC AAC AAG  
 1536  
 60 Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys  
 500 505 510

CAC AGG GTG GAT GGT TCC TGG GCC AAA TGG GAT CCC TAT GGC CCC TGC  
 1584

# ES 2 205 989 A1

His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys  
                   515                                  520                                  525

5

TCG CGC ACA TGT GGT GGG GGC GTG CAG CTG GCC AGG AGG CAG TGC ACC  
 1632

10
   
 Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr  
                   530                                  535                                  540

15

AAC CCC ACC CCT GCC AAC GGG GGC AAG TAC TGC GAG GGA GTG AGG GTG  
 1680

20
   
 Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val  
                   545                                  550                                  555                                  560

25

AAA TAC CGA TCC TGC AAC CTG GAG CCC TGC CCC AGC TCA GCC TCC GGA  
 1728

30
   
 Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly  
                                   565                                  570                                  575

35

AAG AGC TTC CGG GAG GAG CAG TGT GAG GCT TTC AAC GGC TAC AAC CAC  
 1776

40
   
 Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His  
                                   580                                  585                                  590

45

AGC ACC AAC CGG CTC ACT CTC GCC GTG GCA TGG GTG CCC AAG TAC TCC  
 1824

50
   
 Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser  
                   595                                  600                                  605

55

GGC GTG TCT CCC GGG GAC AAG TGC AAG CTC ATC TGC CGA GCC AAT GGC  
 1872

60
   
 Gly Val Ser Pro Gly Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly  
                   610                                  615                                  620

65

ACT GGC TAC TTC TAT GTG CTG GCA CCC AAG GTG GTG GAC GGC ACG CTG  
 1920

70
   
 Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu  
                   625                                  630                                  635                                  640

75

TGC TCT CCT GAC TCC ACC TCC GTC TGT GTC CAA GGC AAG TGC ATC AAG  
 1968

80
   
 Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys  
                                   645                                  650                                  655

# ES 2 205 989 A1

GCT GGC TGT GAT GGG AAC CTG GGC TCC AAG AAG AGA TTC GAC AAG TGT  
 2016  
 5 Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys  
                     660                    665                    670

GGG GTG TGT GGG GGA GAC AAT AAG AGC TGC AAG AAG GTG ACT GGA CTC  
 2064  
 10 Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu  
 15                    675                    680                    685

TTC ACC AAG CCC ATG CAT GGC TAC AAT TTC GTG GTG GCC ATC CCC GCA  
 2112  
 20 Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala  
                     690                    695                    700

GGC GCC TCA AGC ATC GAC ATC CGC CAG CGC GGT TAC AAA GGG CTG ATC  
 2160  
 25 Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile  
 30                    705                    710                    715                    720

GGG GAT GAC AAC TAC CTG GCT CTG AAG AAC AGC CAA GGC AAG TAC CTG  
 2208  
 35 Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu  
                                     725                    730                    735

CTC AAC GGG CAT TTC GTG GTG TCG GCG GTG GAG CGG GAC CTG GTG GTG  
 2256  
 45 Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val  
                                     740                    745                    750

AAG GGC AGT CTG CTG CGG TAC AGC GGC ACG GGC ACA GCG GTG GAG AGC  
 2304  
 50 Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser  
 55                    755                    760                    765

CTG CAG GCT TCC CGG CCC ATC CTG GAG CCG CTG ACC GTG GAG GTC CTC  
 2352  
 60 Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu  
                     770                    775                    780

65

# ES 2 205 989 A1

TCC GTG GGG AAG ATG ACA CCG CCC CGG GTC CGC TAC TCC TTC TAT CTG  
 2400  
 5 Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu  
 785 790 795 800

CCC AAA GAG CCT CGG GAG GAC AAG TCC TCT CAT CCC AAG GAC CCC CGG  
 2448  
 10 Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg  
 805 810 815

GGA CCC TCT GTC TTG CAC AAC AGC GTC CTC AGC CTC TCC AAC CAG GTG  
 2496  
 20 Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val  
 820 825 830

GAG CAG CCG GAC GAC AGG CCC CCT GCA CGC TGG GTG GCT GGC AGC TGG  
 2544  
 25 Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp  
 835 840 845

GGG CCG TGC TCC GCG AGC TGC GGC AGT GGC CTG CAG AAG CGG GCG GTG  
 2592  
 35 Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val  
 850 855 860

GAC TGC CGG GGC TCC GCC GGG CAG CGC ACG GTC CCT GCC TGT GAT GCA  
 2640  
 40 Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala  
 865 870 875 880

GCC CAT CGG CCC GTG GAG ACA CAA GCC TGC GGG GAG CCC TGC CCC ACC  
 2688  
 50 Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr  
 885 890 895

TGG GAG CTC AGC GCC TGG TCA CCC TGC TCC AAG AGC TGC GGC CGG GGA  
 2736  
 55 Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly  
 900 905 910

TTT CAG AGG CGC TCA CTC AAG TGT GTG GGC CAC GGA GGC CGG CTG CTG  
 2784  
 65

# ES 2 205 989 A1

Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu  
915 920 925

5

GCC CGG GAC CAG TGC AAC TTG CAC CGC AAG CCC CAG GAG CTG GAC TTC  
2832

10

Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe  
930 935 940

15

TGC GTC CTG AGG CCG TGC TGA  
2853

20

Cys Val Leu Arg Pro Cys  
945 950

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 205 989

② Nº de solicitud: 200102167

③ Fecha de presentación de la solicitud: **24.09.2001**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ 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                       |

#### 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

02.04.2004

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1