

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

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **24.09.2001**

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

Fecha de la concesión: **27.07.2005**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2005**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2005

73 Titular/es: **Universidad de Oviedo
Plaza del Riego nº 4, Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

72 Inventor/es: **Santiago Cal, Miguel;
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 B1

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

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 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 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- 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 (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 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 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 HEXXHXXGXXHD (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

ES 2 205 989 B1

ADNc de hígado y riñón fetales. La confirmación de que se trataba de ADAMTS-15 se hizo mediante la secuenciación directa del producto de amplificación y posterior traducción conceptual de la secuencia obtenida.

5 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

10 Figura 1. Análisis de la expresión de ADAMTS15 en las diversas genotecas de ADNc analizadas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 205 989 B1

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 mol-
- 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.

35 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.

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

45

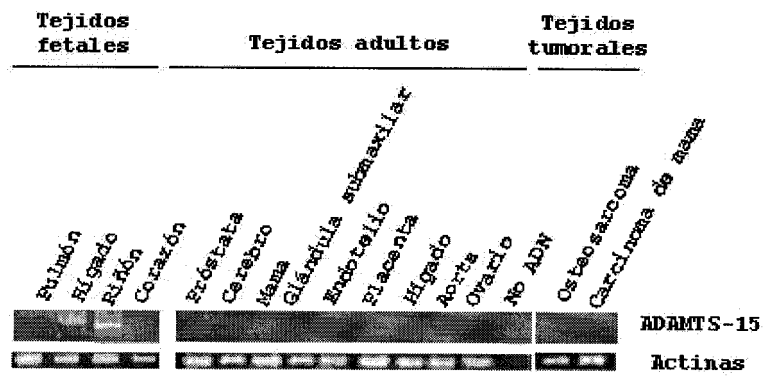
50

55

60

65

FIGURA 1



ES 2 205 989 B1

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

5 SOLICITANTE:
NOMBRE: Universidad de Oviedo
CALLE: San Francisco, 3
10 CIUDAD: Oviedo
PAÍS: España
CÓDIGO POSTAL: 33003
TELÉFONO: 34 (9) 8 510 4058
15 FACSIMIL: 34 (9)8 522 7126

TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-15

NUMERO DE SECUENCIAS: 1

20 FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
TIPO DE MEDIO: Disco flexible
ORDENADOR: PC IBM compatible
25 SISTEMA OPERATIVO: Windows 97
SOPORTE LÓGICO: Microsoft Word 7.0

DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

30 NUMERO DE LA SOLICITUD:

DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR

NUMERO DE LA SOLICITUD:

35 FECHA DE PRESENTACIÓN:

INFORMACIÓN CONCERNIENTE A SEQ ID NO: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 LONGITUD: 2853
TIPO: ácido nucleico
NÚMERO DE HEBRAS: doble
45 CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

FUENTE DE ORIGEN:

50 ORGANISMO: *Homo Sapiens*
TIPO DE CÉLULA:

FUENTE INMEDIATA:

55 GENOTECA: hígado fetal
CLON:

CARACTERÍSTICA:

60 NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación
LOCALIZACIÓN: 1..3

CARACTERÍSTICA:

65 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
LOCALIZACIÓN: 1..2850

CARACTERÍSTICA:

ES 2 205 989 B1

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)

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

ES 2 205 989 B1

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 B1

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

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

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

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

35 CTG TGT GGA GCC ACC ACC TGT GAC ACC CTG GGC ATG GCT GAT GTG GGT
 1008
 Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly
 40 325 330 335

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

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

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

65

ES 2 205 989 B1

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 B1

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 B1

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
40 725 730 735

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
65 770 775 780

ES 2 205 989 B1

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 B1

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