



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 211 256**

② Número de solicitud: 200102192

⑤ Int. Cl.7: **C12N 9/64**

C12Q 1/37

C07K 16/40

A61K 38/48

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.09.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2004**

Fecha de la concesión: **22.09.2005**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.10.2005

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

⑱ Inventor/es: **Cal Miguel, Santiago;
Obaya González, Álvaro Jesús;
Llamazares Prada, María;
Garabaya Fernández, Cecilia y
López Otín, Carlos**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19.

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-19. 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 2 211 256 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19.

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-19, y el análisis de su estructura y de sus posibles funciones normales y patológicas.

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 reprotinas, 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 fami-

lia, denominado ADAMTS-1, se identificó como consecuencia de su asociación con el desarrollo de caque-
xia 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 agreca-
nasa 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-19.

Un segundo objeto de la invención es analizar la expresión en tejidos humanos del gen de la ADAMTS-19.

Un tercer objeto de la invención es analizar la expresión del gen de la ADAMTS-19 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'-ACCTCCTCCACAAGTGGCATC-3') y AD-2 (5'-GCTTACTTGAGTGGGAATGTGTAG-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 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 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 ADTS19F (5'-ATGCGCCTGACTCACATCTGC-3') y ADTS19R (5'-TTATAAATAATGTAATTGCCA-3'). El análisis informático de la secuencia obtenida reveló la existencia de una fase abierta de lectura, que codifica una proteína de 1224 aminoácidos a la que denominamos ADAMTS-19. 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 péptido, los dominios metaloproteasa, desintegrina y rico en cisteína, así como diversas repeticiones tipo

trombospondina (TS).

Un análisis más detallado de la secuencia de aminoácidos deducida para la ADAMTS-19 determinó la existencia de un prodominio en el que se localiza un residuo de cisteína (posición 243) 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 estas enzimas. El dominio catalítico incluye la secuencia HEXXXHXGXXHD (posiciones 431-442) 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 reprotinas de las MMPs. Este dominio también posee el residuo de metionina (posición 445) que contribuye a formar la estructura Met-giro presente en reprotinas y MMPs. Tras el dominio catalítico puede reconocerse el dominio desintegrina, 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-19. La secuencia fue depositada en el banco de datos EMBL con el número de acceso AJ311904. 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-19. Con este fin, se realizaron reacciones de amplificación mediante técnicas de PCR de ADNc 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-19, se detectó un producto de amplificación en la genoteca de ADNc de pulmón fetal. La confirmación de que se trataba de ADAMTS-19 se hizo mediante 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-19 en muestras obtenidas de tumores humanos. Se realizó de forma similar a la anterior, utilizando ADNc de genotecas de carcinoma mamario y de osteosarcoma. En la figura 1 se muestra la amplificación del producto esperado en la genoteca de osteosarcoma.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis de la expresión de ADAMTS-19 en las diversas genotecas de ADNc analizadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19 **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-19.

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-19.

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

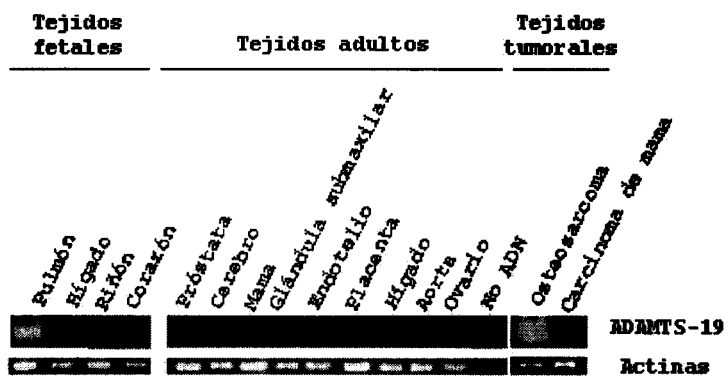
7. Utilización de la secuencia SEQ ID NO : 1 en la producción de anticuerpos.

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



ES 2 211 256 B1

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

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

TITULO DE LA INVENCION: Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19
NÚMERO 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 NÚMERO DE LA SOLICITUD:
DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR
NÚMERO DE LA SOLICITUD:
35 FECHA DE PRESENTACIÓN:
INFORMACIÓN CONCERNIENTE A SEQ ID NO: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
40 LONGITUD: 3696
TIPO: ácido nucleico
NÚMERO DE HEBRAS: doble
CONFIGURACIÓN: lineal
45 TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

FUENTE DE ORIGEN:
ORGANISMO: Homo Sapiens
50 TIPO DE CÉLULA:
FUENTE INMEDIATA:
GENOTECA: pulmón fetal
55 CLON:
CARACTERÍSTICA:
NOMBRE/CLAVE: codón de iniciación
60 LOCALIZACIÓN: 1..3
CARACTERÍSTICA:
NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
65 LOCALIZACIÓN: 1..3672

ES 2 211 256 B1

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: codón de parada

LOCALIZACIÓN: 3673..3675

5

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO : 1 (Depositada en el GeneBank Database el 30 de julio de 2001, con número de acceso AJ311904)

10

```

ATG CGC CTG ACT CAC ATC TGC TGC TGC CTC CTT TAC CAG CTG GGG      48
Met Arg Leu Thr His Ile Cys Cys Cys Cys Leu Leu Tyr Gln Leu Gly
1           5           10           15
  
```

15

```

TTC CTG TCG AAT GGG ATC GTT TCA GAG CTG CAG TTC GCC CCC GAC CGC      96
Phe Leu Ser Asn Gly Ile Val Ser Glu Leu Gln Phe Ala Pro Asp Arg
           20           25           30
  
```

20

```

GAG GAG TGG GAA GTC GTG TTT CCT GCG CTC TGG CGC CGG GAG CCG GTG      144
Glu Glu Trp Glu Val Val Phe Pro Ala Leu Trp Arg Arg Glu Pro Val
           35           40           45
  
```

25

```

GAC CCG GCT GGC GGC AGC GGG GGC AGC GCG GAC CCG GGC TGG GTG CGC      192
Asp Pro Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Asp Pro Gly Trp Val Arg
           50           55           60
  
```

30

35

```

GGC GTT GGG GGC GGC GGA AGC GCC CGG GCG CAG GCT GCC GGC AGC TCA      240
Gly Val Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Ala Gln Ala Ala Gly Ser Ser
65           70           75           80
  
```

40

```

CGC GAG GTG CGC TCT GTG GCT CCG GTG CCT TTG GAG GAG CCC GTG GAG      288
Arg Glu Val Arg Ser Val Ala Pro Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Glu
           85           90           95
  
```

45

50

```

GGC CGA TCA GAG TCC CGG CTC CGG CCC CCG CCG CCG TCG GAG GGT GAG      336
Gly Arg Ser Glu Ser Arg Leu Arg Pro Pro Pro Pro Ser Glu Gly Glu
           100           105           110
  
```

55

```

GAG GAC GAG GAG CTC GAG TCG CAG GAG CTG CCG CGG GGA TCC AGC GGG      384
Glu Asp Glu Glu Leu Glu Ser Gln Glu Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly
           115           120           125
  
```

60

```

GCT GCC GCC TTG TCC CCG GGC GCC CCG GCC TCG TGG CAG CCG CCG CCT      432
Ala Ala Ala Leu Ser Pro Gly Ala Pro Ala Ser Trp Gln Pro Pro Pro
           130           135           140
  
```

65

```

CCC CCG CAG CCG CCC CCG TCC CCG CCC CCG GCC CAG CAT GCC GAG CCG      480
  
```

ES 2 211 256 B1

	Pro	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Gln	His	Ala	Glu	Pro	
	145					150					155					160	
5	GAT	GGC	GAC	GAA	GTG	TTG	CTG	CGG	ATC	CCG	GCC	TTC	TCT	CGG	GAC	CTG	528
	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Leu	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Phe	Ser	Arg	Asp	Leu	
10				165					170						175		
	TAC	CTG	CTG	CTC	CGG	AGA	GAC	GGC	CGC	TTC	CTG	GCG	CCG	CGC	TTC	GCA	576
	Tyr	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Asp	Gly	Arg	Phe	Leu	Ala	Pro	Arg	Phe	Ala	
15				180					185						190		
	GTG	GAA	CAG	CGG	CCA	AAT	CCC	GGC	CCC	GGC	CCC	ACG	GGG	GCA	GCA	TCC	624
20	Val	Glu	Gln	Arg	Pro	Asn	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gly	Ala	Ala	Ser	
			195					200						205			
	GCC	CCG	CAA	CCT	CCC	GCG	CCA	CCA	GAC	GCA	GGC	TGC	TTC	TAC	ACC	GGA	672
	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Asp	Ala	Gly	Cys	Phe	Tyr	Thr	Gly	
25			210					215						220			
30	GCT	GTG	CTG	CGG	CAC	CCT	GGC	TCG	CTG	GCT	TCT	TTC	AGC	ACC	TGT	GGA	720
	Ala	Val	Leu	Arg	His	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Cys	Gly	
35			225			230					235				240		
	GGT	GGC	CTG	ATG	GGA	TTT	ATA	CAG	CTC	AAT	GAG	GAC	TTC	ATA	TTT	ATT	768
	Gly	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Asn	Glu	Asp	Phe	Ile	Phe	Ile	
40				245						250					255		
	GAG	CCA	CTC	AAT	GAT	ACA	ATG	GCC	ATA	ACA	GGT	CAC	CCA	CAC	CGT	GTA	816
45	Glu	Pro	Leu	Asn	Asp	Thr	Met	Ala	Ile	Thr	Gly	His	Pro	His	Arg	Val	
			260						265					270			
	TAT	AGG	CAG	AAA	AGG	TCC	ATG	GAG	GAA	AAG	GTC	ACA	GAG	AAG	TCA	GCT	864
	Tyr	Arg	Gln	Lys	Arg	Ser	Met	Glu	Glu	Lys	Val	Thr	Glu	Lys	Ser	Ala	
50			275						280					285			
55	CTT	CAC	AGT	CAT	TAC	TGT	GGT	ATC	ATT	TCA	GAT	AAA	GGA	AGA	CCT	AGG	912
	Leu	His	Ser	His	Tyr	Cys	Gly	Ile	Ile	Ser	Asp	Lys	Gly	Arg	Pro	Arg	
60			290					295					300				
	TCT	AGA	AAA	ATA	GCA	GAA	AGT	GGA	AGA	GGG	AAA	CGA	TAT	TCA	TAC	AAA	960
	Ser	Arg	Lys	Ile	Ala	Glu	Ser	Gly	Arg	Gly	Lys	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Lys	
65			305			310					315				320		

ES 2 211 256 B1

5	TTA CCT CAA GAA TAC AAC ATA GAG ACT GTA GTG GTT GCA GAC CCA GCA Leu Pro Gln Glu Tyr Asn Ile Glu Thr Val Val Val Ala Asp Pro Ala 325 330 335	1008
10	ATG GTT TCC TAT CAT GGA GCA GAT GCA GCC AGG AGA TTC ATT CTA ACC Met Val Ser Tyr His Gly Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ile Leu Thr 340 345 350	1056
15	ATC TTA AAT ATG GTA TTT AAC CTT TTC CAA CAC AAG AGT CTG GGT GTG Ile Leu Asn Met Val Phe Asn Leu Phe Gln His Lys Ser Leu Gly Val 355 360 365	1104
20	CAG GTC AAT CTT CGT GTG ATA AAG CTT ATT CTG CTC CAT GAA ACT CCA Gln Val Asn Leu Arg Val Ile Lys Leu Ile Leu Leu His Glu Thr Pro 370 375 380	1152
25	CCA GAA CTA TAT ATT GGG CAT CAT GGA GAA AAA ATG CTA GAG AGT TTT Pro Glu Leu Tyr Ile Gly His His Gly Glu Lys Met Leu Glu Ser Phe 385 390 395 400	1200
30	TGT AAG TGG CAA CAT GAA GAA TTT GGC AAA AAG AAT GAT ATA CAT TTA Cys Lys Trp Gln His Glu Glu Phe Gly Lys Lys Asn Asp Ile His Leu 405 410 415	1248
35	GAG ATG TCA ACA AAC TGG GGG GAA GAC ATG ACT TCA GTG GAT GCA GCT Glu Met Ser Thr Asn Trp Gly Glu Asp Met Thr Ser Val Asp Ala Ala 420 425 430	1296
40	ATA CTT ATA ACA AGG AAA GAT TTC TGT GTG CAC AAA GAT GAA CCA TGT Ile Leu Ile Thr Arg Lys Asp Phe Cys Val His Lys Asp Glu Pro Cys 435 440 445	1344
45	GAT ACT GTT GGT ATA GCT TAC TTG AGT GGA ATG TGT AGT GAA AAG AGA Asp Thr Val Gly Ile Ala Tyr Leu Ser Gly Met Cys Ser Glu Lys Arg 450 455 460	1392
50	AAA TGT ATT ATT GCT GAA GAC AAT GGC TTG AAT CTT GCT TTT ACA ATT Lys Cys Ile Ile Ala Glu Asp Asn Gly Leu Asn Leu Ala Phe Thr Ile 465 470 475 480	1440
55	GCT CAT GAA ATG GGT CAC AAC ATG GGC ATT AAC CAT GAC AAT GAC CAC 1488	1488

ES 2 211 256 B1

	Ala His Glu Met Gly His Asn Met Gly Ile Asn His Asp Asn Asp His		485		490		495	
5	CCA TCG TGT GCT GAT GGT CTT CAT ATC ATG TCT GGT GAA TGG ATT AAA							1536
	Pro Ser Cys Ala Asp Gly Leu His Ile Met Ser Gly Glu Trp Ile Lys							
10			500		505		510	
	GGA CAG AAT CTT GGT GAC GTT TCA TGG TCT CGA TGT AGC AAG GAA GAT							1584
15	Gly Gln Asn Leu Gly Asp Val Ser Trp Ser Arg Cys Ser Lys Glu Asp		515		520		525	
	TTG GAA AGA TTT CTC AGG TCA AAG GCC AGT AAC TGC TTG CTA CAA ACA							1632
20	Leu Glu Arg Phe Leu Arg Ser Lys Ala Ser Asn Cys Leu Leu Gln Thr		530		535		540	
	AAT CCG CAG AGT GTC AAT TCT GTG ATG GTT CCC TCC AAG CTG CCA GGG							1680
25	Asn Pro Gln Ser Val Asn Ser Val Met Val Pro Ser Lys Leu Pro Gly		545		550		555	560
30								
	ATG ACA TAC ACT GCT GAT GAA CAA TGC CAG ATC CTT TTT GGG CCA TTG							1728
35	Met Thr Tyr Thr Ala Asp Glu Gln Cys Gln Ile Leu Phe Gly Pro Leu		565		570		575	
	GCT TCT TTT TGT CAG GAG ATG CAG CAT GTT ATT TGC ACA GGA TTA TGG							1776
40	Ala Ser Phe Cys Gln Glu Met Gln His Val Ile Cys Thr Gly Leu Trp		580		585		590	
	TGC AAG GTA GAA GGT GAG AAA GAA TGC AGA ACC AAG CTA GAC CCA CCA							1824
45	Cys Lys Val Glu Gly Glu Lys Glu Cys Arg Thr Lys Leu Asp Pro Pro		595		600		605	
	ATG GAT GGA ACT GAC TGT GAC CTT GGT AAG TGG TGT AAG GCT GGA GAA							1872
50	Met Asp Gly Thr Asp Cys Asp Leu Gly Lys Trp Cys Lys Ala Gly Glu		610		615		620	
55								
	TGT ACC AGC AGG ACC TCA GCA CCT GAA CAT CTG GCC GGA GAG TGG AGC							1920
60	Cys Thr Ser Arg Thr Ser Ala Pro Glu His Leu Ala Gly Glu Trp Ser		625		630		635	640
	CTG TGG AGT CCT TGT AGC CGA ACC TGC AGT GCT GGG ATC AGC AGT CGA							1968
65	Leu Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Ser Ala Gly Ile Ser Ser Arg		645		650		655	

ES 2 211 256 B1

	GAG CGC AAA TGT CCT GGG CTA GAT TCT GAA GCA AGG GAT TGT AAT GGT		2016
	Glu Arg Lys Cys Pro Gly Leu Asp Ser Glu Ala Arg Asp Cys Asn Gly		
5	660		665
			670
	CCC AGA AAA CAA TAC AGA ATA TGT GAG AAT CCA CCT TGT CCT GCA GGT		2064
10	Pro Arg Lys Gln Tyr Arg Ile Cys Glu Asn Pro Pro Cys Pro Ala Gly		
	675	680	685
	TTG CCT GGA TTC AGA GAC TGG CAA TGT CAG GCT TAT AGT GTT AGA ACT		2112
15	Leu Pro Gly Phe Arg Asp Trp Gln Cys Gln Ala Tyr Ser Val Arg Thr		
	690	695	700
20	TCC TCC CCA AAG CAT ATA CTT CAG TGG CAA GCT GTC CTG GAT GAA GAA		2160
	Ser Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Trp Gln Ala Val Leu Asp Glu Glu		
25	705	710	715
			720
	AAA CCA TGT GCC TTG TTT TGC TCT CCT GTT GGA AAA GAA CAG CCT ATT		2208
30	Lys Pro Cys Ala Leu Phe Cys Ser Pro Val Gly Lys Glu Gln Pro Ile		
	725	730	735
	CTT CTA TCA GAA AAA GTG ATG GAT GGA ACT TCT TGT GGC TAT CAG GGA		2256
35	Leu Leu Ser Glu Lys Val Met Asp Gly Thr Ser Cys Gly Tyr Gln Gly		
	740	745	750
	TTA GAT ATC TGT GCA AAT GGC AGG TGC CAG AAA GTT GGC TGT GAT GGT		2304
40	Leu Asp Ile Cys Ala Asn Gly Arg Cys Gln Lys Val Gly Cys Asp Gly		
	755	760	765
45	TTA TTA GGG TCT CTT GCA AGA GAA GAT CAT TGT GGT GTA TGC AAT GGC		2352
	Leu Leu Gly Ser Leu Ala Arg Glu Asp His Cys Gly Val Cys Asn Gly		
50	770	775	780
	AAT GGA AAA TCA TGC AAG ATC ATT AAA GGG GAT TTT AAT CAC ACC AGA		2400
55	Asn Gly Lys Ser Cys Lys Ile Ile Lys Gly Asp Phe Asn His Thr Arg		
	785	790	795
			800
	GGA GCA GGT TAT GTA GAA GTG CTG GTG ATA CCT GCT GGA GCA AGA AGA		2448
60	Gly Ala Gly Tyr Val Glu Val Leu Val Ile Pro Ala Gly Ala Arg Arg		
	805	810	815
65	ATC AAA GTT GTG GAG GAA AAG CCG GCA CAT AGC TAT TTA GCT CTC CGA		2496

ES 2 211 256 B1

	Ile Lys Val Val Glu Glu Lys Pro Ala His Ser Tyr Leu Ala Leu Arg	
	820	825
5		830
	GAT GCT GGC AAA CAG TCT ATT AAT AGT GAC TGG AAG ATT GAA CAC TCT	2544
	Asp Ala Gly Lys Gln Ser Ile Asn Ser Asp Trp Lys Ile Glu His Ser	
10	835	840
		845
	GGA GCC TTC AAT TTG GCT GGA ACT ACC GTT CAT TAT GTA AGA CGA GGC	2592
	Gly Ala Phe Asn Leu Ala Gly Thr Thr Val His Tyr Val Arg Arg Gly	
15	850	855
		860
	CTC TGG GAG AAG ATC TCT GCC AAA GGT CCT ACT ACA GCA CCT TTA CAT	2640
20	Leu Trp Glu Lys Ile Ser Ala Lys Gly Pro Thr Thr Ala Pro Leu His	
	865	870
		875
		880
	CTT CTG GTG CTC CTG TTT CAG GAT CAG AAT TAT GGT CTT CAC TAT GAA	2688
25	Leu Leu Val Leu Leu Phe Gln Asp Gln Asn Tyr Gly Leu His Tyr Glu	
	885	890
		895
	TAC ACT ATC CCA TCA GAC CCT CTT CCA GAA AAC CAG AGC TCT AAA GCA	2736
30	Tyr Thr Ile Pro Ser Asp Pro Leu Pro Glu Asn Gln Ser Ser Lys Ala	
	900	905
		910
35		
	CCT GAG CCC CTC TTC ATG TGG ACA CAC ACA AGC TGG GAA GAT TGC GAT	2784
	Pro Glu Pro Leu Phe Met Trp Thr His Thr Ser Trp Glu Asp Cys Asp	
40	915	920
		925
	GCC ACT TGT GGA GGA GGA GAA AGG AAG ACA ACA GTG TCC TGC ACA AAA	2832
45	Ala Thr Cys Gly Gly Gly Glu Arg Lys Thr Thr Val Ser Cys Thr Lys	
	930	935
		940
	ATC ATG AGC AAA AAT ATC AGC ATT GTG GAC AAT GAG AAA TGC AAA TAC	2880
50	Ile Met Ser Lys Asn Ile Ser Ile Val Asp Asn Glu Lys Cys Lys Tyr	
	945	950
		955
		960
	TTA ACC AAG CCA GAG CCA CAG ATT CGA AAG TGC AAT GAG CAA CCA TGT	2928
55	Leu Thr Lys Pro Glu Pro Gln Ile Arg Lys Cys Asn Glu Gln Pro Cys	
	965	970
		975
60		
	CAA ACA AGG TGG ATG ATG ACA GAA TGG ACC CCT TGT TCA CGA ACT TGT	2976
	Gln Thr Arg Trp Met Met Thr Glu Trp Thr Pro Cys Ser Arg Thr Cys	
	980	985
		990
65		

ES 2 211 256 B1

5 GGA AAA GGA ATG CAG AGC AGA CAA GTG GCC TGT ACC CAA CAA CTG AGC 3024
 Gly Lys Gly Met Gln Ser Arg Gln Val Ala Cys Thr Gln Gln Leu Ser
 995 1000 1005

10 AAT GGA ACA CTG ATT AGA GCC CGA GAG AGG GAC TGC ATT GGG CCC AAG 3072
 Asn Gly Thr Leu Ile Arg Ala Arg Glu Arg Asp Cys Ile Gly Pro Lys
 1010 1015 1020

15 CCC GCC TCT GCC CAG CGC TGT GAG GGC CAG GAC TGC ATG ACC GTG TGG 3120
 Pro Ala Ser Ala Gln Arg Cys Glu Gly Gln Asp Cys Met Thr Val Trp
 1025 1030 1035 1040

20 GAG GCG GGA GTG TGG TCT GAG TTT TCA GTC AAG TGT GGC AAA GGC ATA 3168
 Glu Ala Gly Val Trp Ser Glu Phe Ser Val Lys Cys Gly Lys Gly Ile
 1045 1050 1055

25 CGT CAT CGG ACC GTT AGA TGT ACC AAC CCA AGA AAG AAG TGT GTC CTC 3216
 Arg His Arg Thr Val Arg Cys Thr Asn Pro Arg Lys Lys Cys Val Leu
 1060 1065 1070

30 TCT ACC AGA CCC AGG GAG GCT GAA GAC TGT GAG GAT TAT TCA AAA TGC 3264
 Ser Thr Arg Pro Arg Glu Ala Glu Asp Cys Glu Asp Tyr Ser Lys Cys
 1075 1080 1085

35 TAT GTG TGG CGA ATG GGT GAC TGG TCT AAG TGC TCA ATT ACC TGT GGC 3312
 Tyr Val Trp Arg Met Gly Asp Trp Ser Lys Cys Ser Ile Thr Cys Gly
 1090 1095 1100

45 AAA GGA ATG CAG TCC CGT GTA ATC CAA TGC ATG CAT AAG ATC ACA GGA 3360
 Lys Gly Met Gln Ser Arg Val Ile Gln Cys Met His Lys Ile Thr Gly
 1105 1110 1115 1120

50 AGA CAT GGA AAT GAA TGT TTT TCC TCA GAA AAA CCT GCA GCA TAC AGG 3408
 Arg His Gly Asn Glu Cys Phe Ser Ser Glu Lys Pro Ala Ala Tyr Arg
 1125 1130 1135

55 CCA TGC CAT CTT CAA CCC TGC AAT GAG AAA ATT AAT GTA AAT ACC ATA 3456
 Pro Cys His Leu Gln Pro Cys Asn Glu Lys Ile Asn Val Asn Thr Ile
 1140 1145 1150

65 ACA TCA CCC AGA CTG GCT GCT CTG ACT TTC AAG TGC CTG GGA GAT CAG 3504

ES 2 211 256 B1

	Thr Ser Pro Arg Leu Ala Ala Leu Thr Phe Lys Cys Leu Gly Asp Gln		
	1155	1160	1165
5			
	TGG CCA GTG TAC TGC CGA GTG ATA CGT GAA AAG AAC CTA TGT CAG GAC		3552
	Trp Pro Val Tyr Cys Arg Val Ile Arg Glu Lys Asn Leu Cys Gln Asp		
10	1170	1175	1180
	ATG CGG TGG TAT CAG CGC TGC TGT GAA ACA TGC AGG GAC TTC TAT GCC		3600
15	Met Arg Trp Tyr Gln Arg Cys Cys Glu Thr Cys Arg Asp Phe Tyr Ala		
	1185	1190	1195
			1200
	CAA AAG CTG CAG CAG AAG AGT TGA CCT CTA GCA GGC TGG CTG GAT CAC		3648
20	Gln Lys Leu Gln Gln Lys Ser End Pro Leu Ala Gly Trp Leu Asp His		
	1205	1210	1215
	AGC TCT TGG CAA TTA CAT TAT TTA TAA ACA CAC ACA CTA GCA TGT TTT		3696
25	Ser Ser Trp Gln Leu His Tyr Leu		
	1220	1224	
30			
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 211 256

② Nº de solicitud: 200102192

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.09.2001**

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

03.05.2004

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1