

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 213 428**

② Número de solicitud: 200102193

⑤ Int. Cl.7: **C12N 9/64**
C12Q 1/37
C07K 16/40
A61K 38/48

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.09.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2004**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.08.2004

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**
Plaza del Riego, 4, Edf. 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

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Procedimiento de identificación de la proteína humana ADAMTS-19.**

㉖ 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 2 213 428 A1

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 (PACE). 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 estas 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-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 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-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 **caracte-**

rizado 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.

30

35

40

45

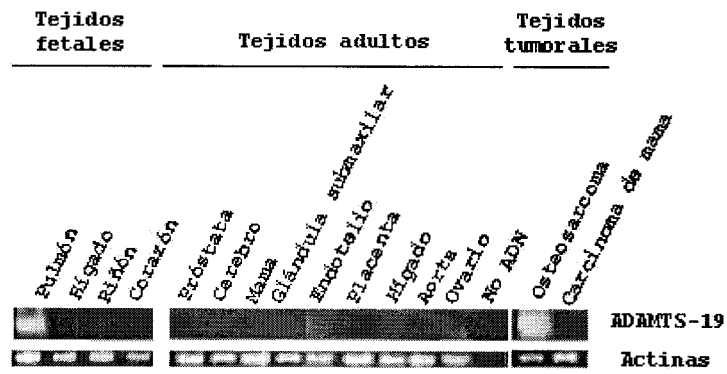
50

55

60

65

FIGURA 1



ES 2 213 428 A1

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL:

5 SOLICITANTE:

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

15 TÍTULO 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

NÚMERO DE LA SOLICITUD:

30 DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR

NÚMERO DE LA SOLICITUD:
FECHA DE PRESENTACIÓN:

35 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:

50 ORGANISMO: Homo Sapiens
TIPO DE CÉLULA:

FUENTE INMEDIATA:

55 GENOTECA: pulmón fetal
CLON:

CARACTERÍSTICA:

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

CARACTERÍSTICA:

65 NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante
LOCALIZACIÓN: 1..3672

CARACTERISTICA:

ES 2 213 428 A1

NOMBRE/CLAVE: codón de parada
LOCALIZACIÓN: 3673..3675

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

5	ATG CGC CTG ACT CAC ATC TGC TGC TGC TGC CTC CTT TAC CAG CTG GGG Met Arg Leu Thr His Ile Cys Cys Cys Cys Leu Leu Tyr Gln Leu Gly	48
	1 5 10 15	
10	TTC CTG TCG AAT GGG ATC GTT TCA GAG CTG CAG TTC GCC CCC GAC CGC Phe Leu Ser Asn Gly Ile Val Ser Glu Leu Gln Phe Ala Pro Asp Arg	96
15	20 25 30	
20	GAG GAG TGG GAA GTC GTG TTT CCT GCG CTC TGG CGC CGG GAG CCG GTG Glu Glu Trp Glu Val Val Phe Pro Ala Leu Trp Arg Arg Glu Pro Val	144
	35 40 45	
25	GAC CCG GCT GGC GGC AGC GGG GGC AGC GCG GAC CCG GGC TGG GTG CGC Asp Pro Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Asp Pro Gly Trp Val Arg	192
	50 55 60	
30	GGC GTT GGG GGC GGC GGA AGC GCC CGG GCG CAG GCT GCC GGC AGC TCA Gly Val Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Ala Gln Ala Ala Gly Ser Ser	240
35	65 70 75 80	
40	CGC GAG GTG CGC TCT GTG GCT CCG GTG CCT TTG GAG GAG CCC GTG GAG Arg Glu Val Arg Ser Val Ala Pro Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Glu	288
	85 90 95	
45	GGC CGA TCA GAG TCC CGG CTC CGG CCC CCG CCG CCG TCG GAG GGT GAG Gly Arg Ser Glu Ser Arg Leu Arg Pro Pro Pro Pro Ser Glu Gly Glu	336
	100 105 110	
50	GAG GAC GAG GAG CTC GAG TCG CAG GAG CTG CCG CGG GGA TCC AGC GGG Glu Asp Glu Glu Leu Glu Ser Gln Glu Leu Pro Arg Gly Ser Ser Gly	384
	115 120 125	
55	GCT GCC GCC TTG TCC CCG GGC GCC CCG GCC TCG TGG CAG CCG CCG CCT Ala Ala Ala Leu Ser Pro Gly Ala Pro Ala Ser Trp Gln Pro Pro Pro	432
60	130 135 140	
65	CCC CCG CAG CCG CCC CCG TCC CCG CCC CCG GCC CAG CAT GCC GAG CCG	480

ES 2 213 428 A1

	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
15	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			
		180	185	190
20	GTG GAA CAG CGG CCA AAT CCC GGC CCC GGC CCC ACG GGG GCA GCA TCC	624		
	Val Glu Gln Arg Pro Asn Pro Gly Pro Gly Pro Thr Gly Ala Ala Ser			
		195	200	205
25	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			
		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
40	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			
		245	250	255
45	GAG CCA CTC AAT GAT ACA ATG GCC ATA ACA GGT CAC CCA CAC CGT GTA	816		
	Glu Pro Leu Asn Asp Thr Met Ala Ile Thr Gly His Pro His Arg Val			
		260	265	270
50	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			
		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
65	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			
	305	310	315	320

ES 2 213 428 A1

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

ES 2 213 428 A1

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
 Gly Gln Asn Leu Gly Asp Val Ser Trp Ser Arg Cys Ser Lys Glu Asp
 15 515 520 525

TTG GAA AGA TTT CTC AGG TCA AAG GCC AGT AAC TGC TTG CTA CAA ACA 1632
 Leu Glu Arg Phe Leu Arg Ser Lys Ala Ser Asn Cys Leu Leu Gln Thr
 20 530 535 540

AAT CCG CAG AGT GTC AAT TCT GTG ATG GTT CCC TCC AAG CTG CCA GGG 1680
 Asn Pro Gln Ser Val Asn Ser Val Met Val Pro Ser Lys Leu Pro Gly
 25 545 550 555 560

ATG ACA TAC ACT GCT GAT GAA CAA TGC CAG ATC CTT TTT GGG CCA TTG 1728
 Met Thr Tyr Thr Ala Asp Glu Gln Cys Gln Ile Leu Phe Gly Pro Leu
 30 565 570 575

GCT TCT TTT TGT CAG GAG ATG CAG CAT GTT ATT TGC ACA GGA TTA TGG 1776
 Ala Ser Phe Cys Gln Glu Met Gln His Val Ile Cys Thr Gly Leu Trp
 35 580 585 590

TGC AAG GTA GAA GGT GAG AAA GAA TGC AGA ACC AAG CTA GAC CCA CCA 1824
 Cys Lys Val Glu Gly Glu Lys Glu Cys Arg Thr Lys Leu Asp Pro Pro
 40 595 600 605

ATG GAT GGA ACT GAC TGT GAC CTT GGT AAG TGG TGT AAG GCT GGA GAA 1872
 Met Asp Gly Thr Asp Cys Asp Leu Gly Lys Trp Cys Lys Ala Gly Glu
 45 610 615 620

TGT ACC AGC AGG ACC TCA GCA CCT GAA CAT CTG GCC GGA GAG TGG AGC 1920
 Cys Thr Ser Arg Thr Ser Ala Pro Glu His Leu Ala Gly Glu Trp Ser
 50 625 630 635 640

CTG TGG AGT CCT TGT AGC CGA ACC TGC AGT GCT GGG ATC AGC AGT CGA 1968
 Leu Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Ser Ala Gly Ile Ser Ser Arg
 55 645 650 655

ES 2 213 428 A1

	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	
10	CCC AGA AAA CAA TAC AGA ATA TGT GAG AAT CCA CCT TGT CCT GCA GGT	2064
	Pro Arg Lys Gln Tyr Arg Ile Cys Glu Asn Pro Pro Cys Pro Ala Gly	
	675 680 685	
15	TTG CCT GGA TTC AGA GAC TGG CAA TGT CAG GCT TAT AGT GTT AGA ACT	2112
	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	
30	AAA CCA TGT GCC TTG TTT TGC TCT CCT GTT GGA AAA GAA CAG CCT ATT	2208
	Lys Pro Cys Ala Leu Phe Cys Ser Pro Val Gly Lys Glu Gln Pro Ile	
	725 730 735	
35	CTT CTA TCA GAA AAA GTG ATG GAT GGA ACT TCT TGT GGC TAT CAG GGA	2256
	Leu Leu Ser Glu Lys Val Met Asp Gly Thr Ser Cys Gly Tyr Gln Gly	
	740 745 750	
40	TTA GAT ATC TGT GCA AAT GGC AGG TGC CAG AAA GTT GGC TGT GAT GGT	2304
	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	
55	AAT GGA AAA TCA TGC AAG ATC ATT AAA GGG GAT TTT AAT CAC ACC AGA	2400
	Asn Gly Lys Ser Cys Lys Ile Ile Lys Gly Asp Phe Asn His Thr Arg	
	785 790 795 800	
60	GGA GCA GGT TAT GTA GAA GTG CTG GTG ATA CCT GCT GGA GCA AGA AGA	2448
	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 2 213 428 A1

	Ile Lys Val Val Glu Glu Lys Pro Ala His Ser Tyr Leu Ala Leu Arg	
	820 825 830	
5		
	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
15	Gly Ala Phe Asn Leu Ala Gly Thr Thr Val His Tyr Val Arg Arg Gly	
	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	
30		
	TAC ACT ATC CCA TCA GAC CCT CTT CCA GAA AAC CAG AGC TCT AAA GCA	2736
	Tyr Thr Ile Pro Ser Asp Pro Leu Pro Glu Asn Gln Ser Ser Lys Ala	
35	900 905 910	
	CCT GAG CCC CTC TTC ATG TGG ACA CAC ACA AGC TGG GAA GAT TGC GAT	2784
40	Pro Glu Pro Leu Phe Met Trp Thr His Thr Ser Trp Glu Asp Cys Asp	
	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	
50		
	ATC ATG AGC AAA AAT ATC AGC ATT GTG GAC AAT GAG AAA TGC AAA TAC	2880
	Ile Met Ser Lys Asn Ile Ser Ile Val Asp Asn Glu Lys Cys Lys Tyr	
55	945 950 955 960	
	TTA ACC AAG CCA GAG CCA CAG ATT CGA AAG TGC AAT GAG CAA CCA TGT	2928
60	Leu Thr Lys Pro Glu Pro Gln Ile Arg Lys Cys Asn Glu Gln Pro Cys	
	965 970 975	
	CAA ACA AGG TGG ATG ATG ACA GAA TGG ACC CCT TGT TCA CGA ACT TGT	2976
65	Gln Thr Arg Trp Met Met Thr Glu Trp Thr Pro Cys Ser Arg Thr Cys	
	980 985 990	

ES 2 213 428 A1

	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	
5	995 1000 1005	
	AAT GGA ACA CTG ATT AGA GCC CGA GAG AGG GAC TGC ATT GGG CCC AAG	3072
10	Asn Gly Thr Leu Ile Arg Ala Arg Glu Arg Asp Cys Ile Gly Pro Lys	
	1010 1015 1020	
	CCC GCC TCT GCC CAG CGC TGT GAG GGC CAG GAC TGC ATG ACC GTG TGG	3120
15	Pro Ala Ser Ala Gln Arg Cys Glu Gly Gln Asp Cys Met Thr Val Trp	
	1025 1030 1035 1040	
	GAG GCG GGA GTG TGG TCT GAG TTT TCA GTC AAG TGT GGC AAA GGC ATA	3168
20	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
30	Arg His Arg Thr Val Arg Cys Thr Asn Pro Arg Lys Lys Cys Val Leu	
	1060 1065 1070	
	TCT ACC AGA CCC AGG GAG GCT GAA GAC TGT GAG GAT TAT TCA AAA TGC	3264
35	Ser Thr Arg Pro Arg Glu Ala Glu Asp Cys Glu Asp Tyr Ser Lys Cys	
	1075 1080 1085	
	TAT GTG TGG CGA ATG GGT GAC TGG TCT AAG TGC TCA ATT ACC TGT GGC	3312
40	Tyr Val Trp Arg Met Gly Asp Trp Ser Lys Cys Ser Ile Thr Cys Gly	
	1090 1095 1100	
	AAA GGA ATG CAG TCC CGT GTA ATC CAA TGC ATG CAT AAG ATC ACA GGA	3360
45	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
55	Arg His Gly Asn Glu Cys Phe Ser Ser Glu Lys Pro Ala Ala Tyr Arg	
	1125 1130 1135	
	CCA TGC CAT CTT CAA CCC TGC AAT GAG AAA ATT AAT GTA AAT ACC ATA	3456
60	Pro Cys His Leu Gln Pro Cys Asn Glu Lys Ile Asn Val Asn Thr Ile	
	1140 1145 1150	
	ACA TCA CCC AGA CTG GCT GCT CTG ACT TTC AAG TGC CTG GGA GAT CAG	3504
65		

ES 2 213 428 A1

	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	
25	AGC TCT TGG CAA TTA CAT TAT TTA TAA ACA CAC ACA CTA GCA TGT TTT			3696
	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 2 213 428

② Nº de solicitud: 200102193

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.09.2001**

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

16.06.2004

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1