

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 005**

21 Número de solicitud: 200930437

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **10.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2011**

Fecha de la concesión: **07.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **18.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**HOTTER CORRIPIO, GEORGINA;
VIÑAS, JOSE LUIS y
SOLA MARTINEZ, ANNA**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **USO DE ANHIDRASA CARBÓNICA II PARA LA ELABORACIÓN DE UN MEDICAMENTO.**

57 Resumen:

Uso de anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de la anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperusión o toxina, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano, preferiblemente, el riñón. En una realización preferida, la toxina es cisplatino.

ES 2 351 005 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de la anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxina, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano, preferiblemente, el riñón. En una realización preferida, la toxina es cisplatino.

10 Estado de la técnica anterior

La patología de origen isquémico es la principal causa de muerte en los países desarrollados. En el caso del riñón, el fallo renal agudo (FRA) es una enfermedad que conlleva una mortalidad de más del 50%, cifra que no ha experimentado cambios significativos en las 4 últimas décadas. Normalmente los pacientes con síntomas clínicos de fallo renal, son tratados después de que el daño se haya desarrollado, excepto en el caso de pacientes a los que se les va practicar un trasplante renal. Puesto que la enfermedad está desarrollada cuando el paciente llega al hospital, se requiere urgentemente disponer de vías de curación mediante la estimulación del proceso regenerativo y curativo en general.

20 El desarrollo de nuevos y potentes fármacos ha supuesto un avance importante en el tratamiento de enfermedades hasta hace poco tiempo mortales. Sin embargo, algunos de estos tratamientos son causa de una elevada morbilidad por la toxicidad que producen. La consecuencia de la toxicidad renal de estos fármacos y de otros agentes tóxicos a los que se puede estar accidentalmente expuesto (sales de metales pesados, hidrocarburos, toxinas vegetales o bacterianas) es asimismo la aparición del FRA.

25 El cisplatino ha demostrado ser un efectivo agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades neoplásicas. Desafortunadamente, el tratamiento con cisplatino está asociado a una elevada toxicidad lo que obliga a una reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento. Uno de los efectos adversos más importantes del cisplatino es la nefrotoxicidad; la insuficiencia renal dosis-dependiente y acumulativa es la principal toxicidad limitante de dosis. Aproximadamente el 25 al 35% de los pacientes desarrollan nefrotoxicidad después de una sola dosis de cisplatino. La toxicidad renal se hace más prolongada y grave tras la repetición de ciclos de tratamiento, por lo que, es esencial comprobar que la función renal se ha normalizado antes de iniciar un nuevo tratamiento con cisplatino. La nefrotoxicidad puede prevenirse manteniendo una hidratación adecuada antes, durante y después de la perfusión intravenosa de cisplatino. La diuresis forzada mediante hidratación o mediante hidratación y administración de un diurético antes y después del tratamiento con cisplatino reduce el riesgo de nefrotoxicidad. No obstante, puede aparecer nefrotoxicidad incluso empleando estos procedimientos.

Las medidas terapéuticas empleadas hasta ahora para la regeneración del riñón dañado han sido: la aplicación de factores de crecimiento (Hirschberg *et al.* *Kidney Int.* 1999, 55:2423-2432; Miller y Padanilam. Chapter 17: Molecular responses and growth factors, in : Atlas of diseases of the kidney, Robert W Schrier, p. 17.1-17.16, Blackwell Science Press, Philadelphia, USA. 1999) o ensayos con células madre (Brodsky *et al.* *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002, 282: F1140-F1149; Kale *et al.* *J Clin Invest.* 2003, 112:42-49; Lin F *et al.* *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14:1188-1199; Gupta *et al.* *Kidney Int.* 2002, 62: 1285-1290; Oliver *et al.* *Clin Invest.* 2004, 114: 795-803), pero no se ha conseguido el resultado regenerativo deseado. Existe por tanto la necesidad de disponer de terapias que permitan reducir el daño renal y potenciar la regeneración.

Explicación de la invención

50 La presente invención se refiere al uso de la anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxina, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano, preferiblemente, el riñón. En una realización preferida, la toxina es cisplatino.

55 La anhidrasa carbónica es una metaloenzima ampliamente distribuida por todo el organismo (corteza renal, tejidos gliales, ojo, eritrocitos, etc.) que cataliza reversiblemente la conversión de anhídrido carbónico y agua a ácido carbónico. Esta enzima presenta cuatro isoformas. De ellas, la anhidrasa carbónica II (CAII, del inglés *carbonic anhydrase II*) es la isoenzima más activa y su secuencia de aminoácidos en humanos es la SEQ ID NO: 1 (Número de referencia del Genbank: NP_000058).

60 En los ejemplos de la presente solicitud de patente se demuestra la capacidad de CAII para inducir la regeneración e inhibir la apoptosis tanto en un modelo experimental *in vivo* de isquemia-reperfusión renal como en un modelo experimental *in vitro* de daño inducido por la toxina cisplatino. Estos análisis ponen de manifiesto la utilidad de CAII para prevenir y/o tratar daños en un tejido o un órgano.

65 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de una variante de la misma o de un fragmento de las anteriores para la elaboración de un medicamento.

Los términos “proteína”, “secuencia de aminoácidos”, “polipéptido” o “péptido”, se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos que no alteren sustancialmente su función. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación o fosforilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es sustancialmente homóloga a la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha proteína de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos un 70%, preferiblemente de, al menos, un 80%, más preferiblemente de, al menos, un 90%, y más preferiblemente de al menos un 95%.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, 1, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, significa que la proteína en cuestión mantiene la capacidad de inducir regeneración. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el Ejemplo 1 que acompaña a esta descripción.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término fragmento se refiere a un péptido que comprende una porción de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos comprendida dentro de dicha SEQ ID NO: 1; o un péptido que comprende una porción de una variante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1; siempre y cuando dicho fragmento o péptido sea funcionalmente equivalente.

La proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido (de aquí en adelante, polinucleótido de la invención) que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, una variante de la misma o un fragmento de las anteriores para la elaboración de un medicamento.

Los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN o RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN o DNA).

En una realización preferida de este segundo aspecto, el polinucleótido de la invención comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 que corresponde a la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína CAII humana (Número de referencia del *Genbank*: NG_007287).

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de una construcción génica (de aquí en adelante, construcción génica de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención para la elaboración de un medicamento.

La construcción génica de la invención puede comprender el polinucleótido de la invención, operativamente unido a, una secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión.

“Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” al polinucleótido, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del polinucleótido.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Dichas secuencias de control incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de iniciación, señales de terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

En una realización preferida de este segundo aspecto, la construcción génica de la invención comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,

- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- 5 d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

10 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del DNA situada en posición 5’ con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

15 En una realización particular, las secuencias de control de expresión son funcionales en células y organismos procariontes, por ejemplo, pero sin limitarse, bacterias; mientras que en otra realización particular, dichas secuencias de control de expresión son funcionales en células y organismos eucariontes, por ejemplo, células animales. Preferiblemente, las secuencias de control son funcionales en células de mamífero, y más preferiblemente, en células humanas.

20 El polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención pueden ser introducidos al interior de una célula, denominada célula hospedadora, por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

25 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un vector (de aquí en adelante, vector de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención para la elaboración de un medicamento.

30 Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector”, se refiere a un sistema utilizado para introducir un ácido nucleico exógeno al interior de una célula procariota o eucariota, permitiendo de este modo la vehiculización del ácido nucleico al interior de la célula.

35 Existen numerosos vectores virales y no virales conocidos en el estado de la técnica. Vectores virales incluyen, pero no están limitados a los siguientes: vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales y vectores derivados de coronavirus. Vectores de tipo no viral incluyen, pero no están limitados a los siguientes: *gene gun*, liposomas, poliaminas, péptidos, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-polición, proteínas y sistemas de transferencia génica mediados por receptor.

40 En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el vector es un vector de expresión génica. El término vector de “expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que se puede integrar otra molécula de ácido nucleico, sin que pierda la capacidad de autorreplicación y que, además, es adecuado para expresar dicho ácido nucleico integrado en el mismo tras ser introducido en una célula hospedadora. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente.

45 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora (de aquí en adelante, célula de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención o el vector de la invención, y que es capaz de expresar la proteína de la invención.

50 La célula de la invención puede ser procariota o eucariota. Preferiblemente, la célula de la invención es una célula animal, más preferiblemente, una célula de mamífero y aún más preferiblemente, una célula humana.

El polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

55 Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un daño en un tejido o un órgano.

60 Una realización más preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un daño causado por isquemia, isquemia- reperusión o toxina en un tejido o un órgano.

65 El término “isquemia” se refiere a una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en un tejido o un órgano, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno. El conjunto de los daños que sufre el tejido o el órgano debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia”.

El término “reperusión” se refiere a la restauración del suministro de sangre a un tejido o un órgano que está isquémico como consecuencia de una disminución del riego normal de sangre. La recuperación del riego sanguíneo restaura el aporte de oxígeno y nutrientes al tejido, permitiendo la recuperación del tejido o del órgano isquémico. Sin embargo, la reperusión en sí misma puede lesionar el tejido o el órgano isquémico, ocasionando lo que se conoce como “daño causado por reperusión”.

La expresión “daño por isquemia-reperusión” se refiere al conjunto de los daños que sufre un tejido o un órgano debido a una disminución del riego sanguíneo (isquemia) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperusión).

La expresión “daño causado por toxina” se refiere al conjunto de los daños que sufre un tejido o un órgano como consecuencia de su exposición a una o más toxinas como, por ejemplo, pero sin limitarse, un antibiótico, un anestésico, un quimioterapéutico, un contraste radiológico, un metal pesado, un fungicida, un pesticida, un solvente orgánico, un veneno animal, un tóxico fúngico o un tóxico de origen endógeno.

El cisplatino (cis-diamino dicloro platino II) ha demostrado ser un efectivo agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades neoplásicas. Desafortunadamente, la exposición de los pacientes a cisplatino está asociada a nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, toxicidad gastrointestinal, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad, entre otros efectos secundarios.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un daño causado por cisplatino en un tejido o un órgano.

En una realización preferida de la presente invención, el tejido es un epitelio. Un epitelio animal es un tejido formado por una o varias capas de células en estrecho contacto, que reviste la superficie, cavidades y conductos del organismo, la epidermis y la capa externa de las mucosas, y la porción secretora de las glándulas. En una realización más preferida, el epitelio se selecciona de la lista que comprende: epitelio renal, epitelio hepático, epitelio pulmonar, epitelio gástrico, epitelio intestinal, epitelio auditivo, epitelio pancreático, epitelio de transición urinario, epitelio uterino o epidermis de la piel. En una realización aún más preferida, el epitelio es el epitelio renal.

En una realización preferida de la presente invención, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel. En una realización más preferida, el órgano es el riñón.

La isquemia renal consiste en una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno al riñón, como consecuencia, por ejemplo, pero sin limitarse de una disminución del volumen sanguíneo total, una redistribución de la sangre o una obstrucción. La disminución del riego sanguíneo puede ser unilateral, cuando afecta únicamente a un riñón, o bilateral, cuando afecta a los dos riñones. El conjunto de los daños que sufre el epitelio renal o el riñón debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia renal”.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño causado por isquemia en el epitelio renal o en el riñón, es decir, del daño causado por isquemia renal.

La expresión “daño por isquemia-reperusión renal” se refiere al conjunto de los daños que sufre el riñón debido a una disminución del riego sanguíneo (isquemia renal) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperusión).

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño causado por isquemia-reperusión en el epitelio renal o en el riñón, es decir, del daño causado por isquemia-reperusión renal.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño que sufre el epitelio renal o el riñón causado por toxina como, por ejemplo, pero sin limitarse, un antibiótico, un anestésico, un quimioterapéutico, un contraste radiológico, un metal pesado, un fungicida, un pesticida, un solvente orgánico, un veneno animal, un tóxico fúngico o un tóxico de origen endógeno.

Uno de los efectos adversos más importantes del tratamiento con el agente quimioterapéutico cisplatino es la nefrotoxicidad. De hecho, la insuficiencia renal dosis-dependiente y acumulativa es la principal toxicidad limitante

de dosis. Aproximadamente el 25 al 35% de los pacientes desarrollan nefrotoxicidad después de una sola dosis de cisplatino. Los cambios más comúnmente observados son una caída en la tasa de filtración glomerular reflejada por una elevación en la creatinina sérica y una reducción en el flujo renal plasmático efectivo. La toxicidad renal se hace más prolongada y grave tras la repetición de ciclos de tratamiento, por lo que, es esencial comprobar que la función renal se ha normalizado antes de iniciar un nuevo tratamiento con cisplatino.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del daño que sufre el epitelio renal o el riñón como consecuencia de su exposición a cisplatino, es decir, del daño renal causado por cisplatino.

La aparición de nefrotoxicidad causada por cisplatino puede ser intensificada por el tratamiento concomitante con antihipertensivos que contengan, por ejemplo, pero sin limitarse, furosemida, hidralazina, diazóxido, y propranolol. La administración concomitante de otros medicamentos como, por ejemplo, pero sin limitarse cefalosporinas, aminoglucósidos o Anfotericina B o medios de contraste potencian los efectos nefrotóxicos del cisplatino. La presente invención es, por tanto, útil para la prevención y/o el tratamiento de un daño como consecuencia de la exposición del epitelio renal o del riñón a cisplatino en combinación con otra u otras toxinas, tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, las mencionadas anteriormente.

Como consecuencia de los daños causados por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina en un órgano puede producirse un fallo agudo orgánico. Los términos “fallo agudo”, “fallo orgánico agudo” o “fracaso orgánico agudo”, se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro brusco de la función de un determinado órgano.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina. En una realización preferida de la presente invención, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, páncreas, vejiga, útero o piel. En una realización más preferida, el órgano es el riñón.

Como consecuencia de un daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina en el riñón puede producirse un fallo renal agudo (FRA). Los términos “fallo renal agudo”, “fracaso renal agudo” o “insuficiencia renal aguda (IRA)” se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro brusco de la función renal que tiene como consecuencia una disminución del filtrado glomerular y una acumulación de productos nitrogenados séricos (como, por ejemplo, urea o creatinina), pudiendo también producirse alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y del equilibrio ácido base. El FRA puede clasificarse en tres grandes grupos: FRA funcional, FRA parenquimatoso o FRA obstructivo. En el FRA funcional existe una inadecuada perfusión renal que compromete el filtrado glomerular, pero el parénquima glomerular está íntegro. La insuficiencia renal que se produce durante el FRA funcional es reversible tras restaurar el flujo plasmático, pero si persiste la situación que lo ha desencadenado evolucionará hacia un FRA parenquimatoso. En el FRA parenquimatoso la causa del deterioro de la función renal es un daño en las diferentes estructuras anatómicas renales, que da lugar a diferentes síndromes clínicos: el túbulo (necrosis tubular aguda), el glomérulo (necrosis glomerular), el intersticio tubular (necrosis tubular intersticial) o los vasos sanguíneos. En el FRA obstructivo se produce un aumento de la presión en la vía urinaria, que se transmite retrógradamente, comprometiendo el filtrado glomerular normal, como consecuencia de la obstrucción de alguno de los conductos del riñón.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un FRA causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un FRA causado como consecuencia de la exposición del epitelio renal o del riñón a cisplatino.

Una de las situaciones más frecuentes de daño causado por isquemia-reperfusión tiene lugar en el trasplante de órganos. De hecho, el fallo orgánico agudo es una de las primeras causas por las que se produce el rechazo de órganos transplantados.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. En una realización preferida de la presente invención, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel. En una realización más preferida, el órgano es el riñón.

El FRA asociado al daño causado por isquemia-reperfusión es una de las principales causas por las que se produce el retraso inicial en la función o el rechazo de un riñón transplantado.

Una realización preferida de la presente invención, se refiere al uso de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, la variante de la misma o el fragmento de las anteriores, el polinucleótido de la invención, la construcción génica de la invención, el vector de la invención o la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica (de aquí en adelante, composición farmacéutica de la invención) que comprende la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, una variante de la misma o un fragmento de las anteriores, el polipéptido de la invención, la construcción génica de la invención o la célula de la invención.

Una realización preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de un daño en un tejido o en un órgano. Una realización más preferida, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de un daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina en un tejido o un órgano. Una realización aún más preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de un daño causado por cisplatino en un tejido o un órgano. En una realización preferida, el tejido es un epitelio. En una realización más preferida, el epitelio se selecciona de la lista que comprende: epitelio renal, epitelio hepático, epitelio pulmonar, epitelio gástrico, epitelio intestinal, epitelio auditivo, epitelio pancreático, epitelio de transición urinario, epitelio uterino o epidermis de la piel. En una realización aún más preferida, el epitelio es el epitelio renal. En una realización preferida, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel. En una realización más preferida, el órgano es el riñón.

Una realización preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina. Preferiblemente, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente, el órgano es el riñón.

Una realización más preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de FRA causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina.

Una realización preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento de un FRA causado como consecuencia de la exposición del epitelio renal o del riñón a cisplatino.

Otra realización preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. Preferiblemente, el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente, el órgano es el riñón.

Una realización más preferida de este aspecto, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención comprende además otro principio activo. En una realización más preferida de este aspecto, la composición farmacéutica comprende junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, además, otro principio activo.

Como se emplea aquí, los términos “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Tales formulaciones pueden administrarse a un animal y, más preferiblemente, a un mamífero, incluyendo a un humano, por una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraauricular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular o tópica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, edad, peso, sexo o tolerancia del animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéuticamente efectiva que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada entre otras causas, por las características propias de dicha composición

farmacéutica y del efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” o “vehículos” farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra el análisis *in vivo* del efecto de CAII sobre la regeneración renal. A. Efecto de CAII sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración PCNA. B. Efecto de CAII sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración Estamina. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $n=5$; * $p<0,05$ vs I/R; + $p<0,05$ vs I/R+ CAII.

Figura 2. Muestra el análisis *in vivo* del efecto de CAII sobre la incidencia de apoptosis en el daño renal, evaluada mediante la medida de la actividad de la caspasa 3. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p<0,05$; $n=5$; * $p<0,05$ vs control; + $p<0,05$ vs I/R.

Figura 3. Muestra el análisis *in vivo* del efecto de CAII en la expresión de Eritropoyetina (EPO). Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p<0,05$; $n=5$; * $p<0,05$ vs control; + $p<0,05$ vs I/R.

Figura 4. Muestra el análisis *in vitro* del efecto de CAII sobre la regeneración renal. A. Efecto de CAII sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración PCNA. B. Efecto de CAII sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración Ki67. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p<0,05$; $n=5$; * $p<0,05$ vs cis; + $p<0,05$ vs cis+ CAII.

Figura 5. Muestra el análisis *in vitro* del efecto de CAII sobre la incidencia de apoptosis en el daño renal, evaluada mediante la medida de la actividad de la caspasa 3. Datos representados como la media $\pm$ SEM; $p<0,05$; $n=5$; * $p<0,05$ vs control; + $p<0,05$ vs cisplatino.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Análisis in vivo del efecto de CAII sobre la regeneración y daño celular en la lesión renal inducida por isquemia-reperfusión

Materiales y métodos empleados

Modelo in vivo de isquemia reperfusion renal

Se utilizaron ratones de la cepa Swiss, machos de un peso aproximadamente de 25-30 g (Charles River, Francia). Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del comité ético del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (CSIC) y siguieron las pautas de la Unión Europea. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, la temperatura fue de 21-22°C, la humedad relativa del 70% y los ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de pienso AO4 (Panlab, Barcelona) y agua de la red de Barcelona *ad libitum*.

Los animales fueron anestesiados con Isoflurane, se colocaron en posición supina y se mantuvo la temperatura corporal entre 36 y 37°C. Después de realizar una laparotomía media para acceder al riñón apartando cuidadosamente el paquete intestinal, se indujo la isquemia bilateral mediante el clampaje de ambos pedículos arteriovenosos renales durante 45 minutos con un *clamp* microvascular no-traumático. Posteriormente se inició el período de reperfusion, con la retirada del *clamp* y se verificó visualmente con la observación del regreso del flujo sanguíneo al riñón. A continuación se suturó a el animal y se administró Buprex subcutáneo (4,16 μ g/100 g de peso).

Animales sujetos a una operación *sham* fueron utilizados como controles. Durante todo el proceso de operación, los animales fueron bien hidratados y la temperatura corporal se mantuvo alrededor de 37°C. Durante el tiempo de reperfusion, los animales se estabilizaron bajo el control de un veterinario. Pasadas 24 h de reperfusion, el animal se sacrificó para la extracción de los riñones y de sangre. El tejido fue inmediatamente congelado en nieve carbónica y posteriormente almacenado a -80°C.

Grupos de estudio del modelo in vivo de isquemia y reperfusión renal

I/R.- Animales sometidos a 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión.

- 5 *I/R+ CAII*.- Animales sometidos a I/R pero con inyección de CAII de origen humano (Sigma, número de referencia: C-6165) a una concentración de 5 mg/kg al inicio de la reperfusión, mediante punción directa de la vena cava inferior.

CONTROL.- Animales control, no sometidos a isquemia/reperfusión.

- 10 *CONTROL+CAII*. Animales igual a los del grupo control pero con inyección intravenosa de CAII a una concentración de 5 mg/Kg 24 horas antes de la recogida de muestras.

I/R+Azt: Animales sometidos a I/R pero con inyección de Azetazolamida (Sigma, número de referencia: A6011) intraperitoneal a una concentración de 30 mg/kg un día antes de someter a los animales al proceso de I/R.

- 15 *RT-PCR a tiempo real*

El RNA de las muestras de riñón fue extraído mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Barcelona). Posteriormente se purificó el RNA total de las muestras con el RNeasy mini Kit de Qiagen (Madrid) acorde a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron calculadas por determinación de absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA así obtenido se examinó mediante análisis de las bandas de RNA ribosomal 18s y 28s detectado y analizado en el Bioanalyzer del Hospital Clínico Barcelona (Agilent).

- 25 La expresión de los genes analizados se midió mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real normalizada con el gen *housekeeping* gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las RT-PCRs a tiempo real se llevaron a cabo en un Termociclador Bio-Rad (iCycler iQ Real-Time PCR detection System, Bio-Rad, Barcelona) y las amplificaciones se hicieron en reacciones de 20 μ l con el RT-PCR Kit con SYBR-Green en dos pasos (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores empleados fueron los siguientes: *PCNA*: directo, SEQ ID NO: 3; reverso, SEQ ID NO: 4; *Estatmina*: directo, SEQ ID NO: 5; reverso, SEQ ID NO: 6; *GAPDH*: directo, SEQ ID NO: 7; reverso, SEQ ID NO: 8.

Actividad de Caspasa 3

- 35 La actividad de caspasa-3 fue determinada por medida de proteólisis del sustrato específico (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (DEVD-AMC; Biomol, Plymouth Meeting, PA). Las muestras de tejido renal fueron homogenizadas y sonicadas en el tampón de ensayo (50 mM HEPES, 10% sacarosa, 0,1% CHAPS, 5 mM GSSG, 5 mM DTT). Los sobrenadantes de las muestras se incubaron en este tampón al que se le añadió DEVD-AMC a una concentración de 50 μ M. El AMC liberado fue cuantificado durante 1 hora y media a 37°C por fluoroespectrofotometría, usando 380 nm de excitación y midiendo la emisión a 450 nm.

- 40 *Western blot*

- Las muestras de tejido renal se homogeneizaron en tampón de lisis (70 mM sucrosa, 2 mM Hepes KOH, 220 mM Manitol, 0,1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0,1 mM BSA, *antiproteases cocktail* (SIGMA), posteriormente se determinó la concentración de proteínas de éstas. Las proteínas se determinaron mediante el método colorimétrico de Bradford con un reactivo comercial de BioRad.

- Se dispusieron en cada pocillo del gel de acrilamida al 12% 50 μ g de proteína por cada uno de los grupos a analizar. Tras la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa donde posteriormente fueron bloqueadas con leche desnatada al 5% disuelta en tampón salino (TTBS) con un 0,06% de detergente Tween. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo contra EPO (Santa Cruz antibodies, USA, sc-7956) a dilución 1/1000.

- Al día siguiente se sometieron las membranas a 3 lavados de 5 minutos cada uno con TTBS, para posteriormente incubarlas con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa. Tras finalizar el periodo de incubación con el segundo anticuerpo y tras tres lavados de cinco minutos con TTBS, se procedió al proceso de detección con ECL.

Análisis estadístico

- 60 Los datos se muestran como media +/- el error estándar de la media (SEM), y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), y en caso de significación se aplicó la t-Student.

- 65

Resultados obtenidos

Análisis in vivo del efecto de CAII sobre la regeneración renal

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis del RNA mensajero de los genes de PCNA y Estatmina, ambos son marcadores de proliferación y regeneración celular. Las muestras fueron tomadas de ratones sometidos a los distintos tratamientos aplicados a la parte *in vivo* del modelo experimental de isquemia-reperfusión (I/R) renal. Como se observa en la figura 1, el proceso de I/R genera una respuesta regenerativa que se determina por un aumento en la expresión tanto de PCNA como de Estatmina en los grupos de I/R comparados con el grupo control. El tratamiento con CAII provoca un marcado aumento en esta respuesta regenerativa. Ello demuestra el papel promotor de la regeneración de esta proteína.

La administración de inhibidor de la CAII, la azetazolamida (I/R+AZT), provoca un descenso en los marcadores regenerativos.

Por otra parte la CAII, mostró efecto regenerador únicamente en el tejido dañado, pues su administración a controles (control+ CAII), no provocó inducción de la regeneración.

Análisis in vivo del efecto de CAII sobre la apoptosis en daño renal

En la figura 2 se representa el daño celular, determinado por la incidencia de apoptosis y evaluado por la actividad de la caspasa 3. Podemos observar como la I/R induce un aumento significativo en este parámetro comparado con el grupo control. Esta incidencia de apoptosis se ve drásticamente disminuida tras el tratamiento con CAII (I/R + CAII). La administración de CAII a animales control, muestra que CAII no afecta a la apoptosis presente de manera natural en el tejido sano (grupo control+CAII).

Análisis in vivo del efecto de CAII en la expresión de Eritropoyetina (EPO)

Profundizando en el mecanismo mediante el cual la CAII podría ejercer su función regeneradora y protectora frente al daño renal, se estudió, *in vivo*, la relación de CAII y Eritropoyetina con la hipótesis de una posible inducción de EPO mediada por CAII.

El western blot para la EPO (Figura 3) confirmó esta posible relación dado que se observó un marcado incremento en la cantidad de EPO presente en el grupo I/R cuando añadíamos CAII, así mismo la inhibición de CAII mediante azetazolamida disminuyó la cantidad de EPO presente en el riñón de los ratones sometidos a I/R (I/R+AZT) incluso por debajo de los niveles presentes en el grupo sometido únicamente a I/R.

Ejemplo 2

Análisis in vitro del efecto de CAII sobre la regeneración del daño renal inducido por la toxina cisplatino

Materiales y métodos empleados

Cultivo celular de células tubulares renales (modelo de estudio in vitro)

Células epiteliales tubulares proximales de rata (NRK52e) se mantuvieron en botellas de cultivo (75 cm²) con medio de cultivo (DMEM) al que se le añadió 17,5 mM de glucosa y 2,5 mM de glutamina, este medio también fue suplementado con antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina) y con un 10% de suero fetal de ternera (FCS, del inglés *fetal calf serum*). Las células se incubaron en atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37°C.

Las células control (*control* en Fig. 4 y 5) fueron recogidas cuando alcanzaron confluencia sin ningún tratamiento.

El tratamiento con cisplatino (Sigma) se realizó disolviendo el fármaco en el mínimo volumen de DMSO (40 µl) y diluyéndolo en PBS a una concentración de 200 µM. Después de 6 horas, se retiraba el medio y se añadía medio nuevo sin fármaco para el grupo *CIS* (Fig. 4 y 5) y con 10 µg/ml de CAII para el grupo *CIS+CAII* (Fig. 4 y 5). Se recogían las muestras 16 horas después.

En el grupo *control+CAII* (Fig. 4 y 5) las células eran tratadas con idéntica dosis de CAII durante 16 horas hasta su recogida.

RT-PCR a tiempo real

El RNA de las muestras procedentes del cultivo celular, fue extraído mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Barcelona). Posteriormente se purificó el RNA total de las células con el RNeasy mini Kit de Qiagen (Madrid) acorde a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron calculadas por determinación de absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA así obtenido se examinó mediante

análisis de las bandas de RNA ribosomal 18s y 28s detectado y analizado en el Bioanalyzer del Hospital Clínico Barcelona (Agilent).

La expresión de los genes analizados se midió mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real normalizada con GAPDH. Las RT-PCRs a tiempo real se llevaron a cabo en un Termociclador Bio-Rad (iCycler iQ Real-Time PCR detection System, Bio-Rad, Barcelona) y las amplificaciones se hicieron en reacciones de 20 μ l con el RT-PCR Kit con SYBR-Green en dos pasos (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores fueron los siguientes: *Ki-67*: directo, SEQ ID NO: 9; reverso, SEQ ID NO: 10; *PCNA*: directo, SEQ ID NO: 3; reverso, SEQ ID NO: 4; *GAPDH*: directo, SEQ ID NO: 7; reverso, SEQ ID NO: 8.

Actividad de Caspasa 3

La actividad de caspasa-3 fue determinada por medida de proteolisis del sustrato específico (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (DEVD-AMC; Biomol, Plymouth Meeting, PA). Las muestras de cultivo celular fueron homogeneizadas y sonicadas en el tampón de ensayo (50 mM HEPES, 10% sucrose, 0,1% CHAPS, 5 mM GSSG, 5 mM DTT). Los sobrenadantes de la muestra se incubaron en este tampón al que se le añadió DEVD-AMC a una concentración de 50 μ M. El AMC liberado fue cuantificado durante 1 hora y media a 37°C por fluoroespectrofotometría, usando 380 nm de excitación y midiendo la emisión a 450 nm.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como media $\pm$ el error estándar de la media (SEM), y los valores de $p > 0,05$ se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), y en caso de significación se aplicó la t-Student.

Resultados obtenidos

Análisis in vitro del efecto de CAII sobre la regeneración renal

El estudio de regeneración, en este caso en la parte *in vitro* de nuestro modelo experimental está reflejado en la figura 4. Esta figura muestra, al igual que en el modelo *in vivo* descrito en el ejemplo 1, un análisis mediante RT-PCR de genes marcadores de regeneración, en este caso se seleccionó PCNA y Ki 67.

El tratamiento para inducir el daño celular en este caso fue la administración del fármaco cisplatino, un conocido inductor de daño renal. Como se puede observar en la figura 4, la administración de CAII a células dañadas con cisplatino (grupo cis+CAII) aumenta significativamente la regeneración, reflejado como el aumento en la expresión tanto de PCNA como de Ki67.

Análisis in vivo e in vitro del efecto de CAII sobre la apoptosis en daño renal

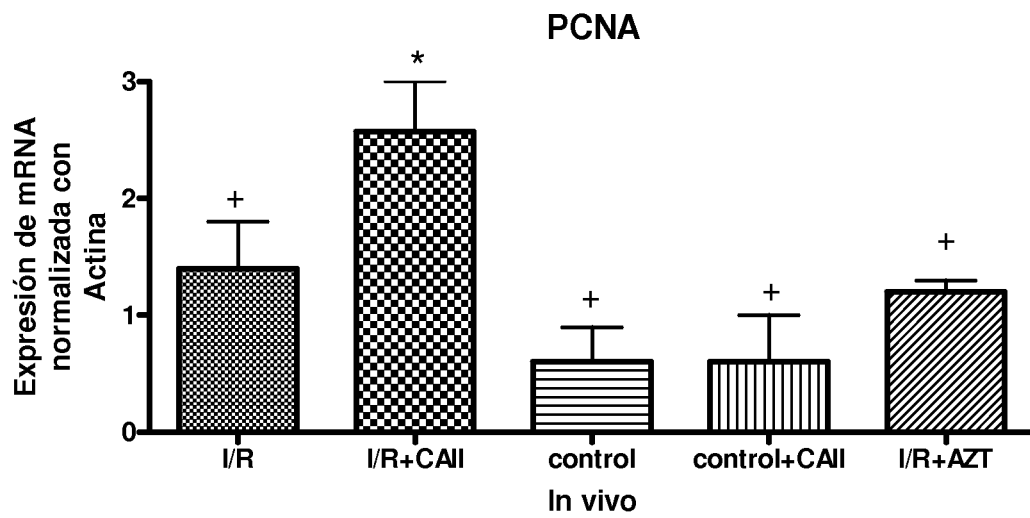
En la figura 5 se representa el daño celular, determinado por la incidencia de apoptosis y evaluado por la actividad de la caspasa 3. La parte *in vitro* de este estudio confirma los resultados obtenidos *in vivo*, pues la administración de CAII a células tratadas con cisplatino, consigue revertir la apoptosis (cisplatino+CAII).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, una variante de la misma o un fragmento de las anteriores para la elaboración de un medicamento.
2. Uso de un polinucleótido que codifica para la proteína, la variante o el fragmento según la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento.
- 10 3. Uso del polinucleótido según la reivindicación 2 que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 para la elaboración de un medicamento.
4. Uso de una construcción génica que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 para la elaboración de un medicamento.
- 15 5. Uso de un vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 o la construcción génica según la reivindicación 4 para la elaboración de un medicamento.
- 20 6. Uso de una célula que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, la construcción génica según la reivindicación 4 o el vector según la reivindicación 5 para la elaboración de un medicamento.
7. Uso de la proteína, la variante o el fragmento según la reivindicación 1, el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, la construcción génica según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o la célula según la reivindicación 6 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina en un tejido o un órgano.
- 25 8. Uso según la reivindicación 7 donde la toxina es cisplatino.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde el tejido es un epitelio.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9 donde el epitelio se selecciona de la lista que comprende: epitelio renal, epitelio hepático, epitelio pulmonar, epitelio gástrico, epitelio intestinal, epitelio auditivo, epitelio pancreático, epitelio de transición urinario, epitelio uterino o epidermis de la piel.
- 35 11. Uso según la reivindicación 10 donde el epitelio es el epitelio renal.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12 donde el órgano es el riñón.
14. Uso de la proteína, la variante o el fragmento según la reivindicación 1, el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, la construcción génica según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o la célula según la reivindicación 6 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxina.
- 45 15. Uso según la reivindicación 14 donde la toxina es cisplatino.
16. Uso de la proteína, la variante o el fragmento según la reivindicación 1, el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, la construcción génica según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o la célula según la reivindicación 6 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado.
- 50 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 donde el órgano se selecciona de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, oído, páncreas, vejiga, útero o piel.
- 55 18. Uso según la reivindicación 17 donde el órgano es el riñón.
19. Composición farmacéutica que comprende la proteína, la variante o el fragmento de la misma según la reivindicación 1, el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, la construcción génica según la reivindicación 4, el vector según la reivindicación 5 o la célula según la reivindicación 6.
- 60 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 65 21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 que además comprende otro principio activo.

FIG.1

A.



B.

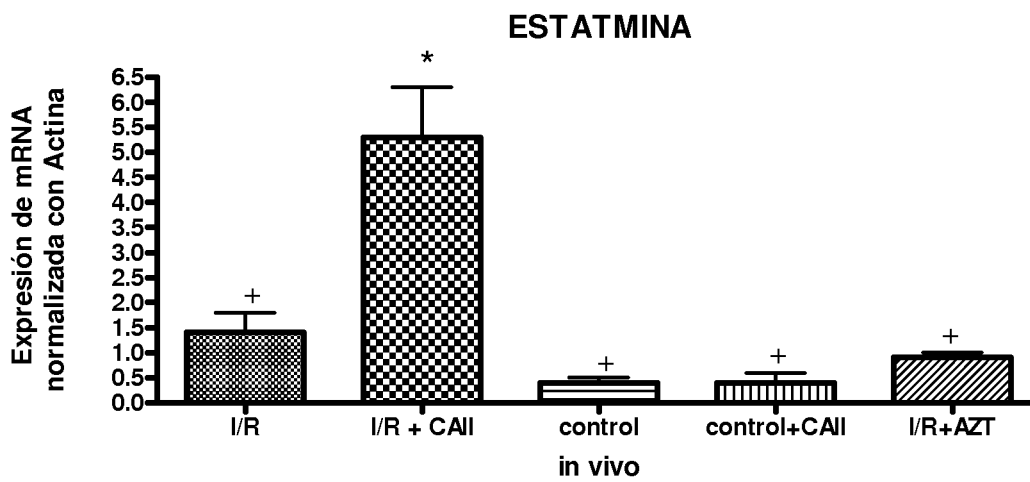


FIG.2

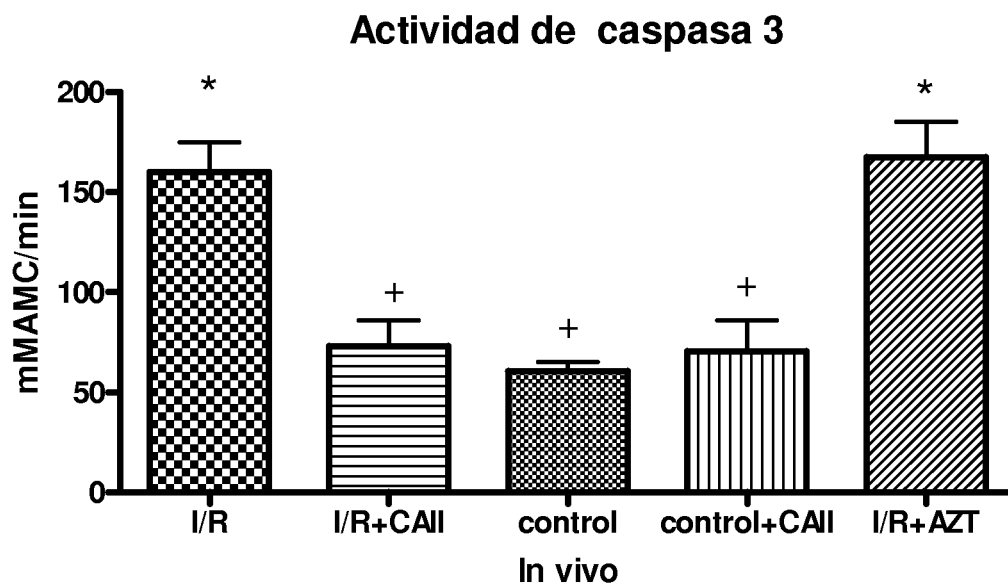


FIG.3

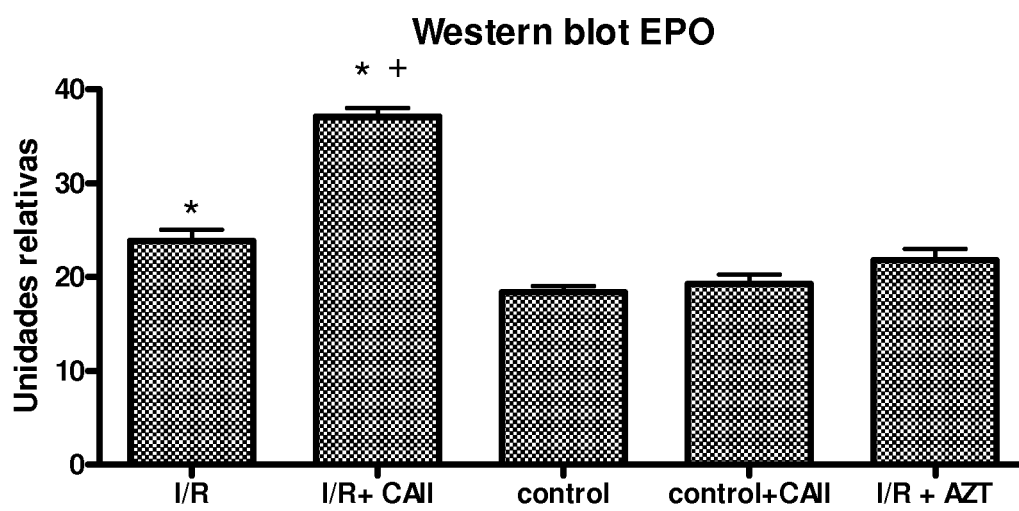
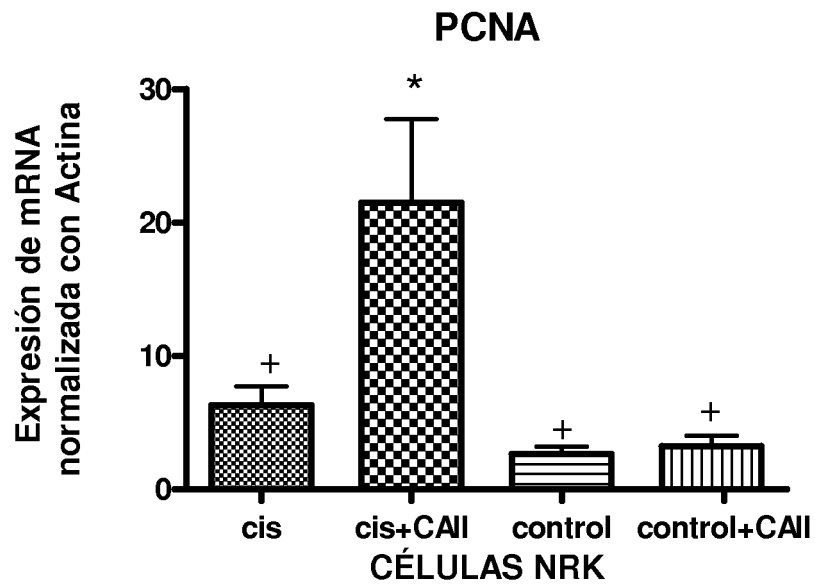


FIG.4

A.



B.

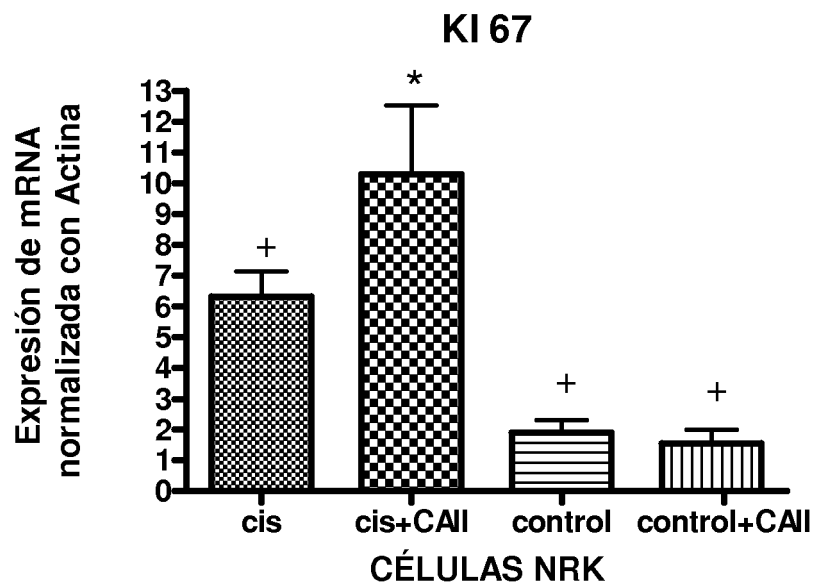
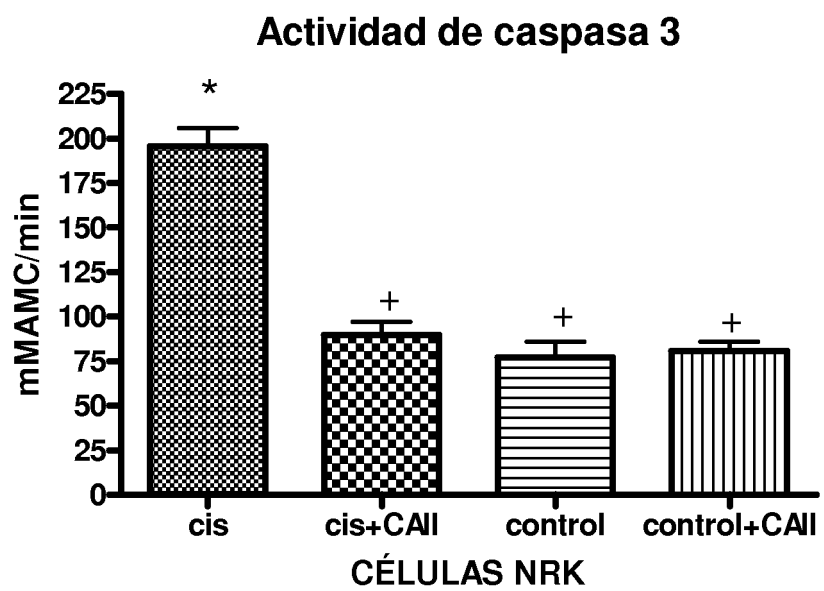


FIG.5



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Uso de anhidrasa carbónica II para la elaboración de un medicamento

<130> ES1641.478

10 <160> 10

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 260

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25	Met	Ser	His	His	Trp	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Asn	Gly	Pro	Glu	His	Trp	1		5	10	15
	His	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Ala	Lys	Gly	Glu	Arg	Gln	Ser	Pro	Val	Asp					
30				20					25					30							
	Ile	Asp	Thr	His	Thr	Ala	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Pro	Leu	Ser					
			35					40					45								
35	Val	Ser	Tyr	Asp	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Arg	Ile	Leu	Asn	Asn	Gly	His					
		50					55					60									
40	Ala	Phe	Asn	Val	Glu	Phe	Asp	Asp	Ser	Gln	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	65		70	75	80
	Gly	Gly	Pro	Leu	Asp	Gly	Thr	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gln	Phe	His	Phe	His					
45				85					90					95							
	Trp	Gly	Ser	Leu	Asp	Gly	Gln	Gly	Ser	Glu	His	Thr	Val	Asp	Lys	Lys			100	105	110
50	Lys	Tyr	Ala	Ala	Glu	Leu	His	Leu	Val	His	Trp	Asn	Thr	Lys	Tyr	Gly					
			115					120					125								
55	Asp	Phe	Gly	Lys	Ala	Val	Gln	Gln	Pro	Asp	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Gly					
		130					135					140									
	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Pro	Gly	Leu	Gln	Lys	Val	Val	145		150	155	160
60	Asp	Val	Leu	Asp	Ser	Ile	Lys	Thr	Lys	Gly	Lys	Ser	Ala	Asp	Phe	Thr			165	170	175
65	Asn	Phe	Asp	Pro	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Glu	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Thr			180	185	190

ES 2 351 005 B1

	Tyr	Pro	Gly	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Leu	Glu	Cys	Val	Thr	Trp	
			195					200					205				
5	Ile	Val	Leu	Lys	Glu	Pro	Ile	Ser	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Lys	
		210					215					220					
10	Phe	Arg	Lys	Leu	Asn	Phe	Asn	Gly	Glu	Gly	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu	Met	
	225					230					235					240	
15	Val	Asp	Asn	Trp	Arg	Pro	Ala	Gln	Pro	Leu	Lys	Asn	Arg	Gln	Ile	Lys	
					245					250					255		
	Ala	Ser	Phe	Lys													
				260													
20	<210> 2																
	<211> 24476																
	<212> DNA																
25	<213> <i>Homo sapiens</i>																
	<400> 2																
30	tcttaccaaa	gaaggatatt	gagagactca	gagtccaaga	gggaagccag	agacaggatt											60
	aaatggtttt	atagtcagaa	gaagaagttt	ggatctttct	gtaaaggaag	ttgtcagatg											120
	aataaaagca	aggagctagg	caacagcgtg	ttgtatctgg	ggacttctac	aagtctcctc											180
35	atctataaaa	taaatagttg	gaccaggtaa	cctccaaact	tcttttaatt	ctacaatgat											240
	atattgttgt	ggtttgtatt	atattcctccc	agcacataat	atacctgtgc	ataagccact											300
40	ccctagtggc	ttccctgctc	aactagtata	aaatcctttc	ttgctatcat	tgtctgcaag											360
	gctctgcagg	ctgtagcccc	tgactgtctc	tgactccact	acttgtcttt	tcttcctcag											420
	tcaccatgct	tcagtcacaa	gcttttctgt	tctagaaact	tcctttctca	gggcctttat											480
45	acttgctgtt	tcctctgcct	gaaatgccct	ccccagatc	tttttttagt	ggttcctcaa											540
	atgtacttcc	ttcaataggt	tttctataac	caccgcatct	aaagtaggat	ttcctcactc											600
50	attattcttt	acctcattcc	tgttttactt	tcctcatact	aattttcagt	attggaaatt											660
	tacttttggt	gtttattttg	agtcatttat	tgtacagtac	ccccatccat	ccccatgtaa											720
	actctgtgag	ggcaggagtc	atgttgatct	ggtttatggc	tatagcctct	gtgctgatgc											780
55	ctgacacata	atagcattca	gaatgattca	ttgagtgaat	ggatgatgag	acaagttatc											840
	ttgtgtagct	cacctagcac	atagaaaata	ttaagcacia	aataggagct	gagaaacatg											900
	taacggtagt	aatgataact	gacattgatc	aagctcta	tattggcact	aggttaaatc											960
60	cttcacacac	tgtatcatct	tagtcctcac	cacaactctg	tgaggtaagt	attattatta											1020
	tcctagtttt	atagatgagg	aaactgaatc	ttagcacaat	caagaaattt	gcccaaagtc											1080
65	acaaagctag	taaattaacc	cagattcaaa	accaacctaa	tttcagcaca	atgttatttg											1140

ES 2 351 005 B1

	ctaactataa	tctgtaacaa	aattattttac	taactttctgc	aaagtgaaac	tgccattatc	1200
	tccattttgga	tttttcaaag	tttataat	caaggagtac	tatgtgagta	actactatat	1260
5	gtatcttggg	actcaggcta	ggtaaagggt	actaggtgcc	taagatacag	agataaataa	1320
	tgtgacacag	tactcaactt	cagggggcac	agtttaggaa	gaaaaacata	agcgtggtag	1380
10	aatggacatc	tccatgaccc	aaacactcct	ctgtcctctc	acaaaaaaaa	acaaaacaaa	1440
	acaaacaaaa	aaacacctcc	tgctgtggag	actcattcct	cttaaatgtt	tcccatgaac	1500
	ctggcccagg	tgtttaat	tgcattcctt	aaattatatt	ctaactgttt	agcactgtct	1560
15	aggagggact	gaatagccat	catttactga	gtgcctacac	gtgacagggtg	atttatctat	1620
	gctcactgac	tgaattctta	caacaatgag	gtgagtgtca	ttattcctgc	tttacaaatg	1680
	agcagtcaac	agcttattgg	ggcattggat	tataacccaa	tgattacaat	agagtgtctg	1740
20	attacaatgc	agaattgcca	atattaggat	agaaggatgt	gtatgcaaag	acctatggga	1800
	gccccaaaga	acaaatggct	cttggccttc	atagatat	atttattttt	attttgtttg	1860
25	agacagtgtc	ttcctgtttc	ccagtctgga	gtgcagtcgc	atgatcatgg	ctcactgcag	1920
	cctcaacctc	ctgggttccg	atctgccgac	cttagcctcc	taagcagctg	ggactacagg	1980
	ggcacaccac	catgcctggc	taacttctta	ttttttgtaa	agatgggggt	ttgccatgtt	2040
30	gcccaggctg	gtcttgagct	cctgacctca	agcgatccgc	ctgccttggc	ctcccaaagt	2100
	gctgggatta	caggcgggag	ccactgagtc	cagccccaga	tatctactta	aacactataa	2160
35	tggtaacaaa	tatgagaata	tctggctttt	tattagcttt	ttaattaaat	atttaataaa	2220
	taatgtgtat	ctcaccttgt	aaaatat	aacaatatct	ttacattttt	tgagaaaaag	2280
	caaatacttt	cacattttta	ctaagaataa	tatgttagaa	gcttttttat	tataataatt	2340
40	ggaacacaga	ctttaagttt	ttttacatta	cattttcctg	atatactgcc	tgaatttttt	2400
	tttttctggg	gcaaagaaaa	gtacttttct	taagctactg	tcagttcctt	tacttaagat	2460
45	tatttctgaaa	tgaacccatc	cttccctcta	atggaaagat	aggtacataa	taagataagc	2520
	acttttttta	tttgaacaaa	tccagtatta	gagtagtctt	ttgcagctag	tgaatcatga	2580
	cagcctgcta	agaagaatgc	cttcagtaaa	ataaagttag	gttgggactg	accaacatga	2640
50	atgcataaag	ttaactccat	taaaaaaaaat	tgaccaggaa	aataaaacaa	tgctaagcca	2700
	accactgtaa	taccaaaaac	gctgctaaaa	aatttagatt	gcttctgagt	aaccaaagggt	2760
55	gaaccactct	ccaccctgtg	gtgaacatgt	gacactctcc	ctaacagcag	ctctgtgggg	2820
	agggcttgct	cccactgaga	attaattcac	tttcagaaag	tgagagataa	ggaaaaattc	2880
	ccatgacaat	aatccatttg	gtgaactgca	gtttggtggg	gtttgaagtt	ttacgcatat	2940
60	ttaagaatca	aacatgctct	tacttcatcc	ctgttaggaa	agccacaatc	cagtttcacg	3000
	gaaaatgaaa	gacaaggatt	cctgctgatc	aaatcgcttg	gctccctcca	cagaatcccg	3060
65	ggaagccact	ctacattcac	aaactttgca	ctcaattcct	ggcacctatc	aacgccatat	3120

ES 2 351 005 B1

	ctccagggcc	aagtgaagag	tctcatagca	actaagttaa	tatttgaaaa	ttatgtaaag	3180
	aaacaaaatt	acatcaatgg	gccccaacag	atacaatgca	cctacagagg	cacaaataaa	3240
5	agcttcttct	ttgctacaaa	ctccattttg	taatggtcct	aaaaatttaa	aaactttatt	3300
	gctgctttct	tgcctaagaa	ttccctgtga	catcaaccca	aaaccacat	aagcagaagt	3360
10	acacaatttt	ctagaatctt	agaacaagta	agtctaaaca	tgaatcatat	ttgtttggat	3420
	gaaattgact	gaaataaata	gtaaagagtg	atthttgagat	acataattgca	aaaatgtcca	3480
	ctaataactt	atccttgtat	ttatctgtat	atthttcaaag	gtaagtaatg	tgatgtcaag	3540
15	gccgacacaa	tcacattaaa	ctgtgtcctg	cttccccaac	tgtaactcta	atactattgc	3600
	cctcagagat	tgcagagacc	acagaaccga	actccttccc	acaaaccccc	ggatttttct	3660
20	gtggcaaaaat	cccttgtagg	aaatgaattc	tctctatatc	tcaaaacagc	ctcacttacc	3720
	cagtagggccc	tgtaagcaca	gtgtctcagg	tccacaatac	ttttagatgc	ccaggaaaat	3780
	gtttcctttt	aaaataagaa	caaaaaagaa	aaaaattagg	tgthgggttaa	agaaaatgth	3840
25	taaatatata	atattaagat	atthtatcttt	atgtcagtht	tggtataaat	gcgtgtthtat	3900
	gaaaaagggg	cccaccaagg	tgaaatgccg	taggaccac	aatgtcata	atgctggctg	3960
	gcctcaaaaat	gtccttccta	ttaaactatt	ttgaatgatt	cctaggtatg	ccagatgcc	4020
30	atthtttcttg	gccagccagg	gaacgtctca	tgtctthtga	agaaattatc	thtctcttac	4080
	tggahtcttc	tgagaaaagt	gatttgthta	aagthttggth	tattthcaaat	caatatgtac	4140
35	tcaactagga	cgtctcctca	cccacgttaa	thttthtaag	aggaggaaaag	taggagaaga	4200
	tgagcgcttc	atgtaaggct	ctgccagcct	acgaggaaaat	gcaatcctcc	aggctcgccc	4260
	gagcgthggc	tgcgggcagg	ggactgtggg	gccgthgtct	cgthttattc	cacggccgtg	4320
40	cagcagaggg	cgcgthcctc	tcagcactca	tgtctgcgcg	tcccctgcgc	ctctaggatc	4380
	gtatccctat	thgccccaa	gtcatagctc	ctaaccacgc	thgccagccc	caggccgggg	4440
45	acaccagaga	ctgagccctt	cgcgctggag	accccggcgc	gggtggggcg	ggagggctcc	4500
	ggggccaaga	gacaggtcac	aatggggaca	ggggacgaaa	ggcgccgggg	gtccgggtcc	4560
	cgagcagthc	ccgccgccgc	cagactccgc	agccgggagg	gggatggggth	gcgcgtagag	4620
50	gthccgcggc	ccgggtthga	cggaggagcc	caggagccac	cgagccgcc	gcagcccgag	4680
	agthccgagc	thcgctgcca	gcccaggaca	ccggggccct	gccgtggggc	gaggggagcc	4740
55	gggcggcggg	agaggagccc	cggagccccg	gagccccgga	gccccgccgg	gcgccagccg	4800
	agagggcgth	thccccgccc	ccggagactc	gccccgccgg	cccgccccgc	cccgagcgcg	4860
	gggagthcac	ctccgcccgt	caccacctcc	cctthgtcgcc	taggtccacc	cgagccccct	4920
60	ccccggggcc	gcccccgagc	acgaagthtg	cgggagccta	taaaagctgg	tgccggcgcg	4980
	acccgcggac	acacagthga	ggcgcccaa	ccgccgccgc	cagatcggtg	ccgattcctg	5040
65	ccctgccccg	accgccagcg	cgacctgthc	ccatcactgg	gggtacggca	aacacaacgg	5100

ES 2 351 005 B1

	tgagtgccgg	cgacggccag	cgcgggggcg	ccccgatccc	cgatccccga	tccccgatcc	5160
	ccgagccccg	atgccggccc	ggggcccgca	gcgcccgcac	atgctgttta	ccgcggccgc	5220
5	ggggagtgt	ggaggctcag	gtgcgccccg	ggcgctcgct	ccgctcgcg	ctccgcggcg	5280
	ccggggatgt	cccccttgcc	ccagctgcga	ggccactgtg	gaggaatccc	cgcgctccgcc	5340
10	ggaggcgct	agggcccgag	ggaggggagg	cgagcccctg	gccgcgggac	ccgaggacag	5400
	tccctccccg	gtccccgacct	ggggatcatt	ttaaccggac	ctaggaggag	gcgggaaagg	5460
	gttgtaacgg	aaaattctag	ttgttgatcg	cagagaaatt	aagagactcc	cctccccctt	5520
15	cccccacctt	ccacccccac	cccaccctc	cagcttcagc	accacctgtg	gctaaggcgc	5580
	tcagcacgaa	ctgtcccg	gcattttcca	gtgctggttt	gaatccatgg	ctctgatttc	5640
	cgagttttcc	cttcatctct	cgacttctaa	tgtaggggg	tcggacatca	ggaatcgggt	5700
20	tttatcttgg	cctcagatct	ggttcttcgg	agccagcgga	gcagaggagc	atgcgtctgg	5760
	cgcacctagc	gcattcttgg	aggggtgtgg	gcttcccagg	tagtggggaa	ccctgacggt	5820
25	taaagggtgg	gtgggccccg	gcctgggcag	tgaggaaagg	atccagacct	ccttgaatgt	5880
	cttaagttag	cttgcatatc	ccaaaatcgc	aaccacaagc	cctgacatta	gtgtctgccc	5940
	gatttcagtt	gctgaatttc	agtaaaacga	ccttaaaata	gctaataattt	atatagcact	6000
30	cagtgatcta	agagctttac	atatatcgat	tctaattctt	acagcgacat	ctatgaggta	6060
	gatttctaata	tatcccatat	tacaaatgtg	gaaactgagg	cacagattac	gtgttttccc	6120
35	aaaatttagc	ccattgttaa	gtgatgcttc	taaaattgga	actgagcaga	ttggctccgg	6180
	aatgattgct	cttctctagg	ggtctgggtg	tacctttccc	cacaatgggg	gattcacatg	6240
	tcttctttcc	cccaggacct	gagcactggc	ataaggactt	ccccattgcc	aaggagagac	6300
40	gccagtcccc	tgtagacatc	gacactcata	cagccaagta	tgacccttcc	ctgaagcccc	6360
	tgtctgtttc	ctatgatcaa	gcaacttccc	tgaggatcct	caacaatggg	catgctttca	6420
45	acgtggagtt	tgatgactct	caggacaaaag	caggtcagt	tttagaaaat	aacttgtgtc	6480
	tttagccag	tagctgtttt	ccgagcttaa	tggaaggagc	caggaacagt	ggcaggaacc	6540
	ctcttaataa	tacagtttgt	ctcaggactc	aaggatgcca	ccctgatcat	tttcattagg	6600
50	tctcagattc	tgagaagtag	gctaattagt	ttgaagtgtc	ccggggccgt	ttcttccctg	6660
	taaaaccctt	ggcttctatg	aaggccattg	aataactg	atagcctgt	gaaaaatcac	6720
55	aaaagggtgca	aagtcccctc	gcaataaaga	tcagtcacga	tgagatttgc	accaattgaa	6780
	cttttaagat	tgtaaaatat	tttgtcttgc	agagctgatg	catatccatt	aaaaagtata	6840
	tcttagtgag	ccttatcttc	aagtttagcag	cgagaagagt	aacaaaaacg	tgccaattta	6900
60	aaatactgaa	attctgggaa	aatgttttac	ttatgagtat	ttcttagtat	tggtctagt	6960
	tgataaagat	ggcagcatgt	tttgatatct	actcagaaat	tcatttcaca	aacgaagatg	7020
65	ttttagagtt	ggtgaacata	cctggcccat	tactgacaaa	accaattacc	gtattttattg	7080

ES 2 351 005 B1

	gtaatagagc	tgtttacagg	atgctcactg	taaaaaaaa	aaaaaaaaga	aagagaaaaga	7140
	agaaaaaaaa	tcctgctttt	ttttttttat	ctctctctct	tttgaaacaa	gagaacaatc	7200
5	ccattcacac	atagtagctg	ccttccttgc	taagcagtta	atttaattgc	cagtgcccta	7260
	ttttcctgag	tgctttcctc	tgaaggcat	agaatgaaat	ggtgctgcaa	acacattttg	7320
10	tttggtggtg	gtgtgggagt	gaggggagt	gtggaacaaa	atgagaaagt	tttgagtag	7380
	tgacctacgg	tactaatata	ttatataata	tgtaattata	accatttagt	caggtagact	7440
	attccttgtc	agcagctatc	ctatatagtc	aacttggttt	tgaaaaaaga	attccttcct	7500
15	cctttcaact	ttaaaaaaat	ttgcaaacac	ctggctttct	gaaatggtga	ttctggaaga	7560
	caatttgatg	ggggataatg	tggagatcat	ctgagaaatg	ttttcaacct	acctgtgcct	7620
	gtctgtgtgc	acccctcccc	agtacacaca	tacatacata	catacacaca	cacacacaca	7680
20	cacacacact	tacaatcata	ctcacacttt	ctggcatagt	atgatgattt	attagaatca	7740
	agtaaagggt	gtacattgaa	aacagttcgg	tgattctgct	acattgcttt	ccaagcatt	7800
25	cctctcactc	caaaggaaca	gtgctcatat	aattaaatta	aacaattttt	ttcttgtaaa	7860
	gaatactgta	tattttataac	aagacaaggc	caaaggctct	aaggatttac	acatacagaa	7920
	agaatactat	aacatttcac	gtctagtcac	ttacaaacca	aaagaagtga	gctactttag	7980
30	tctgtagctg	tactttttta	aagagccaca	atgatgtcat	tgttttcaat	ggatgtaatg	8040
	tctgccaaat	tatgtatctc	attggatgct	acatagaaat	tggatagttt	aagtcttttt	8100
35	tggagcactg	aagaaacaaa	tctccaacaa	atgaaagcag	atgaggttcc	taatagtcct	8160
	taaaaaatgg	atagtgaat	aaattattct	agtaatatgt	attactggaa	agtggatttg	8220
	aacacatggg	ctggtgggcta	tcagcataga	ctgggggtcag	agagacctgg	atttgagtcc	8280
40	tagagctgcc	ggcaactagc	tcagagactt	tgggagtaat	actgtctagg	ttttaattgt	8340
	ttttaactgt	aaagttggag	taacaatagt	gtctgccaca	gtggaaggat	gaaatgggac	8400
45	agtatatgta	aagcccctag	cccagtgctt	ggcgcataga	agttgctcaa	taaatggcct	8460
	ctgtttgtgt	cacaacttga	acccttcgac	cacctctgtt	agaccattgc	tgtagatggt	8520
	gcacctgcga	taagatttct	gaataaaact	tttctttaac	agctttaaga	ttagttccca	8580
50	tcattttgat	tatttttaa	ttttattttt	atattttctg	aagcatactg	tttatcatac	8640
	tgaatatgta	cttattttat	gtatgaagtt	attatatagt	tacatatttt	accatgaatc	8700
55	tgttaaactt	tgacagattt	ctctataagc	agtaactaat	tagatctagc	tacatttttc	8760
	acagctattt	cttctggaga	gcaatgcata	catttttaaa	gaagttggcc	atgttttagat	8820
	tgtgaaacag	atgaaaacca	caggggttct	gtaggagctc	ccacctatgc	ctttagagac	8880
60	acatgtatta	tccacctagt	tctacaaaaa	agtcattatt	aacaccactt	aaatgcatgg	8940
	gaagctaagc	atcatgaaag	caggggtggag	gcctgggtccc	tctcctgttc	ccgggagccc	9000
65	atgctggaaa	tatctaaaag	agaaagacat	agaaatagta	gaccctgact	gccactttga	9060

ES 2 351 005 B1

	taagtgcaga aaggaagtac tccaaggaac tatggaaacg tgaaggaggc ttggcagttt	9120
	aactgataag acaggaaaga ctttccaggg taaataaggc ttatgtggag gcttgaagga	9180
5	ttttgatgtc ttggacgaga gtccaggcaa agggagatag gaaataccag gagacttaag	9240
	agagcacagc atgtgctcca gaaaggcaag aaggatatact aaaagcaagg tcagaaagga	9300
10	cttgccctcc ttgcatatg aaagattcct ttgtaatttt gcctctcttt tccacatttt	9360
	cagttacttt gggttaaaca gaatgcagaa tatattaaaa tgtcaatatt aagagaaaag	9420
	acatctacag aataaatttt taaaaatcat accatgtggg ggacaggcac ggtggctcac	9480
15	gcctgtagtc ccagcacttt ggaagactga ggtgggcgga tcacttgagg tcagaagttc	9540
	aagaccagcc tggccaacag ggtgaaacac tgtctgtact aaaaatgcaa aaaatgagct	9600
20	aggtgttgtg gcatgtgcct gtaatcccag ctactcagga gactgaggca ggagaatcgc	9660
	tggatcccgg gaggcggagg tcgcagttag ccgagaccgc accactgcac tccagcctgg	9720
	tgacagaacg agactccatc tcaaaacaaa caaacaaaaca aaaaaccaca cacacacaca	9780
25	cacaaaacca tgtggaaaaa ctcccctttag actttctttc tttttttttt ttttaaataa	9840
	aacaatccta ggctctcaaa gccaaaacaa agaatagaga tactctagtt aaactcacct	9900
	taataaacat gaagaaacag aagctgaaga gtttaaataa cttgctaagt cgtctccttg	9960
30	ctagtttgct ggaggggacta agtagcaatc acttaaaaaat agaattttga ataaaaatat	10020
	ttgaaggata accttatttg acatttagtt tatacatacc atgtttttta aaagctggca	10080
35	tttttttctg tacacaagtc aaaaagttat ttatttttagt cacttaattt taaaaaatcg	10140
	gcagtttaac atctcttttt attaggagtt atttttgtgg tggtaacatt ttagatttc	10200
	ctatacctct tatttcctgc atttaaatgc agttcattta cctgtcttct ttgcctcaat	10260
40	gagatttcag ccttctagaa cttctcatag attgaggttt tccaatatgc tttaaatggt	10320
	ctcttatatc caaacttaag aacttgggta tcaggaaactg agcgggttga ctttattgct	10380
45	gatttaagct tgagagaatt ttttaaacta cggagttaat aggatttaac tagaaacttg	10440
	ggttagagct ctcatcaatc ttctaaattc ctttgaaaat aagccaccat aaattcacct	10500
	taagttaatg aaaaattgct aatcccctta ggttcttaaa aaacttatta aaaaataact	10560
50	caccctgctt gagatgtttt attaatggcc ttatctggga gaaaataata gtagtcaaat	10620
	tattaactcc tgctaactta ttaactttta ttaatgagtt taatactctc ctgctttatt	10680
55	gcaaagttag ggacaaatat tgaaagtcaa tgccagaatt attgggcca ctttatcca	10740
	agtcttacat catttctggt tttcagaaat tggaattttt taaatctggt tgttatttca	10800
	agaaaagagt aaaggaagct ggatgagttt acctgtgctc tttttaagtg acccattgtc	10860
60	tgtatgacgt aatggatctt catacatgga tcctgcttga ctttcaggga cttgcttttg	10920
	aagctctaaa agttttcttt cacagcagtc ctaagttaaa agaaagcata acaacaaatg	10980
65	aaagggcttg tcatgcacgc agtaatggtg tcagccgaac cttaaataatc tagaaaatgg	11040

ES 2 351 005 B1

	accaa	catat	tctaa	caact	gtagt	tacta	tattc	acatc	aaaac	agctt	ctttttt	tac	11100	
	tcctat	tataa	ttgcc	acata	gttta	aacca	cgact	tctgt	tgaatt	tcaa	ctgtg	tttac	11160	
5	tctagc	gaaa	gtgac	agcta	aacat	cttat	tgcttt	aaaa	caa	atgga	at	acgtg	tattt	11220
	tttcccc	cca	gattt	gtcta	tattg	gcacg	tagcc	ctagg	attatt	ggct	gctg	ccaaca	11280	
10	ggcaaa	acag	taatg	catga	tttaa	aattt	ttcag	gttat	ttata	gaaaa	gatgg	taccg	11340	
	aaaatg	acat	gtttt	ctgta	gaatta	aatct	tttgct	ttat	tagta	ggaaa	tcatt	ttaa	11400	
	tttatt	tttta	aacta	aagat	tactg	gggact	agttt	atttta	tatttt	ggac	ttagg	agaaa	11460	
15	ctgttg	acat	tcatt	acgg	ctttag	tctg	ttact	ccagt	gcac	tcta	at	ttagt	ttaag	11520
	tgattag	gga	aaaaa	atta	aaaa	atatta	aatgt	tcagc	tttta	aattt	g	tataag	ta	11580
	gtgatt	catt	tcaat	attac	tggatt	ttctt	attttt	ctca	aaaag	taatt	tata	aattt	11640	
20	cctcaa	ataa	tatgt	atag	aagaa	agatt	attct	tataac	attata	actta	gtgct	tgttt	11700	
	tgtgtt	tatat	acagag	tatg	tataa	ttgat	gaca	atcatg	aaaat	taaaa	ttggc	tggag	11760	
25	ctcttg	gtgt	tgagatt	tga	atttaa	atta	aattg	ggggg	ggtct	tga	aaa	acattag	11820	
	agtaga	aaaac	tgtatt	tattg	tctcc	atccc	tcacag	aacc	cattt	ctggg	gtaca	atgaa	11880	
	tcattg	actc	tttaa	agcac	cactg	ccatg	gctgg	atttt	acagag	aaaaa	aatagg	cagt	11940	
30	tagca	atttc	tgctat	tttt	taaa	attatt	tttac	attag	aaa	atagatt	tcatt	tttaaa	12000	
	ctgca	acagt	ttaga	aaaatg	gcatt	gtagtc	atttaa	aataa	ataag	tagat	ccaga	atata	12060	
35	gcataa	agtc	ccta	acttaa	acca	agatat	tatgt	ttttat	gtttc	tcaaa	taaaa	agttt	12120	
	gagttt	atgg	caattt	tatta	taaca	atggt	tttga	aggac	ttcatt	gact	aaact	ccatg	12180	
	ctaag	agttt	gccag	aaatg	ctgcc	ttctg	tagca	agtaa	acttt	aagga	ttta	aataca	12240	
40	ttttc	tagtt	acagt	gggtt	tcta	atcttc	atagga	aaca	gtttt	attttt	aacag	gggct	12300	
	aaaac	aggta	tctgg	tgata	acag	attagc	actga	atgtg	ttta	atcatt	gagcc	cagag	12360	
45	cacttt	atct	tttttt	ttttt	ttagt	gttag	ctgtt	agcaa	gtatt	gttta	ctaa	aggttt	12420	
	gcacac	actc	ttgc	ctaatt	ctaa	atgttt	ttaga	aaca	atta	agatga	aact	ttaaga	12480	
	tttg	tttagag	aaaga	ataag	aaacag	caat	aaact	tttatt	ctcct	taaaa	tgt	aagatcc	12540	
50	tgctat	gatt	cttc	actggg	gggaa	agaag	atac	atttag	aaa	attgggt	atct	cagatt	12600	
	cttagt	atgg	ttttag	ttag	ttagt	ttttac	cactt	ggtag	agt	ta	atgat	ttgac	aaatg	12660
55	acattt	gctt	cttatt	atca	gccag	ttgg	tgct	agctt	aaag	agttat	tata	aaggat	12720	
	tttttt	cagt	atta	attttat	ttcata	aaaca	tata	ttta	at	tttat	atat	tattat	gaaa	12780
	aaaggg	aatt	atttc	attct	ttttt	aaaaa	agt	ctaga	at	tagagg	ctaa	tattt	cctta	12840
60	taga	attgtc	aggaa	acaaa	ctgtt	gtaat	aag	ttgttt	tgtgt	tccaa	gag	atgtg	ac	12900
	tttgt	cagaa	tacat	ccaaa	ttcat	atttc	ttag	cagatc	ttta	acataa	cacc	atttat	12960	
	aattc	tttct	gtttt	cattc	ttcct	ttttt	ctcct	ggcct	attg	t	aaagc	agat	ctggca	13020

ES 2 351 005 B1

	gccagagggtt	gtatcaggaa	ccacagaaaag	acccactgc	ttaaataatct	tcaaagcagt	13080
	ctttcacttt	gaatagatga	atggatattg	ctaccatgta	aggatattta	ggtgaagctc	13140
5	atgaacaaat	cttgttgtac	agaagttatc	cctttgttct	gcaatgccaa	agtaaatttg	13200
	ggctcattat	tttatggaat	tataaaagtaa	agctaataaa	atacacttat	agcaacaaat	13260
10	gtttaattcc	cagtactaga	aaaataaaaat	ttaaattgta	gaactaaact	acttttataaa	13320
	gcttttgaat	atattgggta	aatcccatta	atacatataa	agttaggcac	agagtttctt	13380
	gggtggatgga	agaaagactg	atttcacact	attttaatcc	tctgtcaaga	cgcaacttat	13440
15	taattatata	cagatagttt	gtagccgatg	gatgtgattt	ttgttactga	ttttgcttaa	13500
	tgcagttaca	ttaatgccag	aatagtagaa	tcgtggaata	gttatcaagt	tagaatttta	13560
	agttcttgga	gataatagag	cacattacac	tgcatataga	agatgatcca	taaattatta	13620
20	gtgaaatagt	aaatgattta	gtgtgtccac	agatgagtaa	attaaggcca	aagaggttta	13680
	ataaaaattt	tcggccgggc	acgggtggctc	atgcctgtaa	tcccggcact	ttaggaggcc	13740
25	gaggtggatg	gattactcaa	gctcaggagt	tccagaccag	cctgggaaac	aaggcaagac	13800
	tctgcctcta	ctaaaaatac	aaaaattaac	tggacatggt	ggtgcacacc	tgtaatccca	13860
	gctactcggg	aggctgaggc	acgagaatcg	cttgaactct	gcttgaggcg	gaagttgcag	13920
30	tgagccgaga	tcgcaccacc	gcactccagc	ctgggcaaca	gagcaaagct	ctgtttcaaa	13980
	ataataataa	taataataaa	taaataaata	aataaataaa	taataaaaaa	aattaaggga	14040
35	acaaagctag	ccagcagcag	tgagagtcta	aattctaaag	aatttgggaa	gcctatataa	14100
	ggataattgg	attttgcaat	gttaagatca	atggaatact	gatttcacaa	attcgggtgt	14160
	ctaagaactg	gtatcagagg	ttagcaaagc	aggctgtatg	gcagcaatcg	ggccttggtg	14220
40	gaagagaggg	tctcacgttt	gcaagtgtgt	gtagcagacc	aatttatttg	ccagtagctg	14280
	catgggcact	tcctaaatgt	ttcacagatt	attagtttca	cttagaattt	tctctctctg	14340
45	gacctgaatc	tatgactcta	aaacaaaccc	agaaaaagga	atcagtatgc	tcagaaagaa	14400
	agatgtgaaa	aacatccatt	ctccagacaa	cgcatgtgag	gaataaaaac	aggtaaagtg	14460
	attttgttca	gcaccgtaga	ctaaacttga	ctctggattg	aattttcaga	gtaaaatgtg	14520
50	attaaaggca	aacatttagt	actgtaaaac	agaattaaga	ttgtaatatt	taggcatgtg	14580
	tttcatgtgt	gtgtatgtat	gtgtgtatac	ctatgtatat	atgtgtatgc	agatacatat	14640
55	atatatgtta	catatatata	tatgttttaa	ttttagtgtc	caagggagga	cccctggatg	14700
	gcacttacag	attgattcag	tttcactttc	actgggggttc	acttgatgga	caagggttcag	14760
	agcatactgt	ggataaaaag	aaatatgctg	cagaagtaag	atatactttt	ttttttcttt	14820
60	ccagggaaaa	atgtttataa	gttgatattt	agcattaatt	tcaaaagctt	aatttgtaaa	14880
	ttcaactcac	gcccagtgaa	ccacttcttt	tacaaaaggac	cttcacattt	gctttttata	14940
65	acctttaatt	gtgacatcat	acttaacgct	gcaaaaacttt	ctctactgtc	tccaactcca	15000

ES 2 351 005 B1

	ccatttgcaa	aaagtaaacg	gactcaaact	ggaggatcct	gttttaacag	aaatttagaa	15060
	ataaaatgtg	tgcccttctgt	caaaactgta	cattttatttg	tcttagagtt	attgatgaaa	15120
5	acacttgctg	ttataccaag	tactgtgtgg	atgattagaa	ttaaaaatgaa	aggaaaattt	15180
	tgatttaaaa	ttatccatat	tttcaatttc	ctgagtaacc	tttattgtga	gaaaaagacc	15240
10	attgaataaa	atctgtcagc	tttgattatg	taaatcactc	actgtggcct	tgtctcttcg	15300
	gccttagcct	cacttggttc	actggaacac	caaatatggg	gatttttgga	aagctgtgca	15360
	gcaacctgat	ggactggccg	ttctaggtat	ttttttgaag	gtagttgat	gacccaattc	15420
15	ttttttttcc	ctatttttta	taaagaatga	ccagacagag	tatttgtaac	atacaggaca	15480
	ttctacaaaa	gagcttagga	aatgcctttg	tccctgaaat	gttttcaagt	ttatctcctc	15540
20	ctttcatatc	tgctagttgc	agtggagatg	gagggcagaa	agacaatagg	agaggacttt	15600
	atttggtacc	ttttggatgt	aaatgtgaag	aacataaaga	gatcaacttg	ggtgactgct	15660
	agggttttgt	ttgttttctt	ttcatttaac	ctgaggctag	acagtactat	attatgataa	15720
25	agtaagatca	ggttctgaag	aggggaagga	cagtgaattt	caggcaacag	tgggacagaa	15780
	ccggttgagc	tgccctctaa	acagtggtaa	aggggaatgg	agaaaggctt	gggctggaga	15840
	tttatgagct	ctgattcata	tgttgaggtg	gaagctacag	gtgtgtatga	aatcatccaa	15900
30	gtacagcacg	aagagggaga	tgagaaatct	gcccagggag	caatcctgag	aaactgcaaa	15960
	atgtaaggcc	tttacaaggg	gagagatgca	aattaaacaa	cttaaaaggg	gccagggtgtg	16020
35	gtggcttaag	cctgtaatcc	cagcaccttg	ggacaccaag	gcaggaggat	agtttgaggc	16080
	caggagctca	agaccagcct	gggcaacata	gcacaattcc	atctctacaa	aattttttta	16140
	aaaattagct	gggcataaaa	aacaaactaa	caaacaacaa	aacaaaacaa	aaacaaaaac	16200
40	acaaaattag	ctgggcatgg	tggtatacac	ctgtagtttc	agctacttgg	gaagccaggg	16260
	caggaaaatc	actgcagcct	aggggttgag	gttgacgtga	gctatgatca	tgccactgca	16320
45	ctacaagctg	gatgacagag	caagactctg	actctaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	16380
	gcgagagtca	agagagattt	gggttgctgg	aaggcgtagg	gaaagccaaa	gaagaaaata	16440
	atttttaaaa	agaagggaag	accatagtgt	aaagtcctac	aaggaaatca	aggcaagccc	16500
50	ttgaggagta	tcctttggca	gtagagggtc	actggggaca	attgagctgg	tggtttcagg	16560
	actactctct	gagtggaatt	agaggcgagt	tgaagattca	gtgaaagtag	gcaagtctat	16620
55	ggtgtcagtg	tcatcaagcc	agtactgatg	ggggtcatgt	atgaagtgga	gaatttgggc	16680
	tcactatttg	gatgttttct	aatagagcta	cccaataaaa	aataaaaaact	ggtacagtac	16740
	caactgggtg	atagtatctt	gccctttatg	tttttcttta	ggttggcagc	gctaaaccgg	16800
60	gccttcagaa	agttgttgat	gtgctggatt	ccattaaaac	aaaggtaaat	ttgaattttc	16860
	tgccacctcc	ttagggtagc	aattttcaat	actccattgg	ttttagaaat	ttcttttgat	16920
65	caaattgcac	agtctcaatg	acatgtgggtg	tttggtatgag	cagttagtaa	aggtagaata	16980

ES 2 351 005 B1

	ttacttaa	at	cg	aa	at	gc	17040			
	ctaagact	tatttatt	atcttgct	cccatcatt	ggacatccat	atgtaagagt	17100			
5	cagagaat	ctt	aggaggtt	aagggtcct	agtcaaatta	ttcactcatt	17160			
	catacagcag	atattt	agtatgtact	atgtgccagt	cgctttgcaa	actagtagac	17220			
10	acaatgg	acaagata	caaggccct	tttcatggag	atttctattc	tatgacctct	17280			
	ttgcattcat	ccatcctg	tttaa	atcct	ctctgcagca	tagttgtgtt	gaggtcgtt	17340		
	agcatctgtt	taaacactac	agtcacttcc	ggtgatggg	aacttatcac	caggggcagc	17400			
15	cctggc	ttt	t	aaagctgat	cttcacattg	aagcagcatc	tatcctctga	aatgctcact	17460	
	cactggc	ttg	agcccc	ttga	attcatagaa	t	aaacctgat	ctctcttcca	aataactcta	17520
20	ctctgtctct	actttgtttt	ttcacctacc	ccaaactaat	tatcttttagt	ttcctttaac	17580			
	tattctcata	tgatata	gtt	ttctctcttt	gccaccacct	tgtcattctt	ccagtaa	atc	17640	
	attcctgttt	gcttgaaa	ag	tgtagtgtcc	aaaacagaat	gtagttattt	gattctgacc	17700		
25	tagagcaaga	aaatcacctc	ctcatcagga	taccatattt	ctgttattgc	aacttgaagt	17760			
	cacctcattt	tagtggcagc	agtctcactt	t	aaatactgg	gtgtgatcag	ctaatgactt	17820		
	aatgggg	aat	gtaagggatc	atttttagata	aaaggccaag	atgaaaaatg	gacatgtgaa	17880		
30	aatag	ttttt	actacgactt	gccacatatt	ttcaagttga	atgtcttctg	17940			
	ttaatttctc	tttattttgt	ttgccagtga	atatagaacc	tcttttttaa	aaagtgtttt	18000			
35	tgaccatcag	aggggag	tat	acctatttgt	gtctgtgtct	ctcctacctt	cctcctactc	18060		
	tgtcaatgtg	atagtttgaa	gctgcgtatt	tgccttg	ttc	tagggcaaga	gtgctgactt	18120		
	cactaacttc	gatcctcgtg	gcctccttcc	tgaatccttg	gattactgga	cctacccagg	18180			
40	ctcactgacc	accctcctc	ttctggaatg	tgtgacctgg	attgtgtctca	aggaacccat	18240			
	cagcgtcagc	agcgagcagg	tttgttttgt	aatgacaggt	ctgtttacgg	gtggagcatt	18300			
45	tagtcaaggc	agaagacctt	ggcctccaga	gtgagagaga	actgagattt	aatccttctc	18360			
	ctgctacttc	ttgctatgga	aatagtgcct	ttgatggtgc	ctagcaaata	aacagcgttc	18420			
	agtaa	atctt	tgttgttatt	aactataaac	ttagttcgtt	tagtctctaa	aattgaatag	18480		
50	tcattgtaag	gattcaatga	gaaagatgtc	tgtcacctaa	t	aaatgcctt	ttttttttt	18540		
	tgccagttat	gaggaaacta	aggcttagaa	aagtgaagagt	tcatattcaa	ggttacgcag	18600			
55	gtatcagtga	gttaccagcc	tactactcac	tcacataagg	gctttctgct	attttattta	18660			
	tatcagaatg	catttctgaa	tcctgacaga	tgagagtc	at	cccttggaga	acatgtatct	18720		
	attaaaactc	actccaggtt	gcttttagagg	cttagagcag	gtattcttac	atttccaata	18780			
60	aaatata	tagtg	tgtgatcgtc	aagtgattag	tgcagcttct	aagtcactga	tgagcagcca	18840		
	ctaaagtgga	tacaaatgag	tttttcctag	acttacctct	tagcgcacag	ttgaaatgta	18900			
65	gaaag	tgaac	attccttagg	attcacaaga	ggatggatcc	tgaataattt	aaggatagct	18960		

ES 2 351 005 B1

	ttaggagcca	acagtcttga	aaatggtaac	tatgtgagta	gtggtagtgt	gatttaaacc	19020
	tacaaaaatg	ctgaataata	gaggttttaga	gctgcaatgt	gcaatagaga	tcatgttgtc	19080
5	caactttctc	atttcactgg	cttgaatcac	attgatcaac	agtctgagat	gcaggaaaat	19140
	tgaagtgttt	tccactcagc	taccttgcaa	cagaatcagg	cctgggagca	aggattctat	19200
10	tcctgtgtcc	tcccttagaa	tatgaactta	tgaatgctga	agatacttca	tatctttctt	19260
	taaaggaaat	atgtatctga	ctggaaaatt	acttgtagca	tatcaaagt	ggcctaaaaa	19320
	atagcatgct	tggatgttca	cttgaagatt	gaccttgtag	taataacata	tttgagtaag	19380
15	cttcttgaag	tgtagcgtaa	ggaaagatta	taatgccctt	ctttttgtag	atgcagtgtt	19440
	tacattataa	tttaaaacat	gaatTTTTTT	ttcttctttc	actgagagca	atgcaacttt	19500
	aaagcaatag	tctgacattt	agagccatta	taacaaatgg	atttatgggtg	tatacacacc	19560
20	cacaggcaga	aatacacata	tagataaggg	cagttgaacc	tactgcatta	atccctgtac	19620
	cctgagtttg	ctcttttaaag	ttgaaagtgg	tattaaacta	atgatgttaa	ttgtatatat	19680
25	tggcaaaata	ccaatagggc	tctTTTTTTT	gtcctataac	atggaatctg	gaggaaggat	19740
	catgctcagc	tcaggaagct	agggtgcag	gtcctcctct	atctgagtcc	cttgacttgg	19800
	ccttgccaat	tgggtgacttc	atcctcaagg	tggttgtaat	agcattttga	gcatcacatc	19860
30	tagatataac	cacttcttga	ggaggaaatg	aatacctctt	ccattggctt	cctaagagca	19920
	gagaagctct	ttcctgaagg	cccctagaaa	acctttcact	tctcactggc	tagaattgtg	19980
35	tttcttgctc	agtccctagc	ccgggaatgt	gatcatcaca	gtcagttaag	acctgcaggt	20040
	ttaccccact	gaggcttaca	gggagagggc	ggatgtctgt	taatgaggaa	gtatgggggg	20100
	gcgtggattt	taggtaagca	gtataaatgg	gtctgctaata	tctgctacct	ttattttcta	20160
40	taccagggt	ctgtctctgt	gatgctaaaa	caatgagtca	agttgactaa	tgtgacagt	20220
	tagtttaatt	ggtgcagtga	gtagcagaaa	tcggttatac	tggtttgatc	aaaagtttga	20280
45	cctgtttaca	ctttatgaac	agactctctt	tcagattgct	ggaattctgt	tgtaacgaat	20340
	caaccctata	tatccttaga	atgctccctt	gcattcagta	accatagctg	tgcattgttat	20400
	aatgtatgtg	catggaagg	ggctctacgg	gggtgattga	gggactatta	ctggacaaaa	20460
50	gagatcaggt	taaaggctgt	tgattcatgg	gctgctatat	tactgtccaa	accacccttt	20520
	tgcatttgga	tcacgtcttg	gttagagggg	ggaaagtagc	actttttgag	aaccttgaag	20580
55	aagtgggaga	ctgttcaaca	gctgcctgta	tctcagtgg	ggccagtaaa	ctgaaacaag	20640
	tttataaggg	aataaaaatc	aaccagtgac	aaggggttct	aatgtttaa	gcataatattg	20700
	gcaaaatgcc	agtagggcta	tgtaggggtg	tgagcactca	caattgttca	ctaaaatgct	20760
60	gtttttaaaa	caggaaagta	gaatggttga	gtgcaaatcc	atagcatgag	ataaattgag	20820
	cttcttaagg	caaatcagcc	taggcaaatt	catttccgtg	tttttggtga	tttgagatg	20880
65	ccagctcgtc	actcagccca	tggagcttac	aggctctgat	cacttgatct	aattgtatgg	20940

ES 2 351 005 B1

	atgtggtagt	ttgtcttccc	tggggcagaa	aacaaagctt	taatttggaa	ctaaaattgt	21000
5	tattattttg	catctaaagg	tatgagttta	tagacttttg	atgttagatt	tttaaattag	21060
	aaggctactg	aaaatttccc	ttaaaaatga	ccccaacgaa	tttgtgtatt	ttgtataaat	21120
	tggtttggtta	tattaaagca	tacatacata	atctatatgt	gattatgtat	tcattaggaa	21180
10	tcaaactgaa	ttttggccat	tgatgcacag	cactgaatgt	tgtggaatgt	aatttttggt	21240
	tgtttttggt	tctgtttttt	gaggcagagc	cttgctctgt	cgcctaggct	ggagtgcagt	21300
	ggcgcaatct	cagctcattg	caatctctgc	ctccagggtt	taaatgattc	ttgtgcctta	21360
15	gcctcctgag	tagctgagat	tacaggtgct	ctaccacgcc	tgtttaattt	ttgtgtgtgt	21420
	gtgtgtgtgt	tttttttttt	gtagagacag	ggtttcacca	tgttggccag	gctggtctcg	21480
20	aattgctgac	ctcaagtgat	ccaccgcct	catgcctcag	ccttacaaag	tgctgggatt	21540
	acaggcatga	gccactgcgc	ctggccgggg	aatgtattta	aagatataac	acaagtatat	21600
	aactgaatac	cattgtgaaa	cattaattat	caatgtttta	ttgtgtcttt	taggtgttga	21660
25	aattccgtaa	acttaacttc	aatggggagg	gtgaaccgga	agaactgatg	gtggacaact	21720
	ggcgcccagc	tcagccactg	aagaacaggc	aaatcaaagc	ttccttcaaa	taagatggtc	21780
30	ccatagtctg	tatccaaata	atgaatcttc	gggtgtttcc	ctttagctaa	gcacagatct	21840
	accttggtga	tttgaccct	ggttgctttg	tgtctagttt	tctagaccct	tcatctctta	21900
	cttgatagac	ttactaataa	aatgtgaaga	ctagaccaat	tgtcatgctt	gacacaactg	21960
35	ctgtggctgg	ttggtgcttt	gtttatggta	gtagtttttc	tgtaacacag	aatataggat	22020
	aagaaataag	aataaagtac	cttgactttg	ttcacagcat	gtagggtgat	gagcactcac	22080
40	aattgttgac	taaaatgctg	cttttaaaac	ataggaaagt	agaatggttg	agtgcaaadc	22140
	catagcacia	gataaattga	gctagttaag	gcaaatacagg	taaaatagtc	atgattctat	22200
	gtaatgtaaa	ccagaaaaaa	taaatgttca	tgattttcaag	atgttatatt	aaagaaaaac	22260
45	tttaaaaatt	attatatatt	tatagcaaag	ttatcttaaa	tatgaattct	gttgtaattt	22320
	aatgactttt	gaattacaga	gatataaatg	aagtattatc	tgtaaaaatt	gttataatta	22380
	gagttgtgat	acagagtata	tttcatttca	gacaatatat	cataacttaa	taaatattgt	22440
50	attttagata	tattctctaa	taaaattcag	aattctattc	tgggttattt	atttatttat	22500
	ttttattata	ctttaagttt	taggggtacat	gtgcacaacg	tgagattttg	ttacatatgt	22560
55	atacatgtgc	catgttggtg	tgctgcaccc	attaactagt	catttagcat	taggtatatc	22620
	tcctaattgct	atccctcccc	actcccccaa	ccccacgaca	ggccccagtg	tgtgatgttc	22680
	cccttcctgt	gtccatgtgt	tctcattgtt	caattcccac	ctatgagtga	gaacatgtgg	22740
60	tgtttggttt	tttgtccttg	tgatagtttg	ctgagaataa	tggttcccag	tttcatccgt	22800
	gtccctacaa	aggacatgaa	ctcatccttt	tttatggctg	catagtattt	catggtgtat	22860
65	atgtgccaca	ttttcttaat	ccagtctatc	attgttggac	atttgggttg	gttccaagtc	22920

tttgctattg tgaatagtg tgaataaac ataggtgtgc atgtgtcttt atagcagcat 22980
 gatttataat cctttgggta tataccagc aatgggatgg ctgggtcaaa tggattttct 23040
 5 agttctagat ccctgaggaa tcgccacact gacttccaca atgattgaac tagtttacag 23100
 tctgaccaac agtgtaaaag tgttcctatt tcttcacatc ctctccagca cctgttgttt 23160
 10 cctgactttt taatgattgc cattctaact ggtgtgagat ggtatctcat tgtggttttg 23220
 atttgcattt ctctgatggc cagtgatggg gagcattttt tcatgtgtct tttggctgca 23280
 tatatgtctt cttttgagaa gtgtctgttc atatcctttg cccacttttt gatagggttg 23340
 15 tttgtttttt tcttgaaatt tgtctgagtt cattgtagat tctggatatt agccctttgt 23400
 cagatgagta ggttgcaaaa attttctccc atttttagg ttgcctgttc actctgatgg 23460
 20 tagtttcttt tgctgtgcag aagctcttta gtttaattag atcccatttg tcaattttgg 23520
 cttttgttgc cattgctttt ggtgttttag acatgaagtc cttgcccatg cctatgtctt 23580
 gaatggatt gcctagggtt tcttctacgg ttttatggg tttaggccta acatttaagt 23640
 25 ctttaatcca tcttgaatta atttttgtaa aagatgtaag gaagggatcc agtttcagct 23700
 ttctacatat ggctagtcag ttttcccagc accatttatg aaataggga tcctttcccc 23760
 atttcttggt tttgtcaggg ttgtcaaaat attctgggtt attttattgt gtactgagtg 23820
 30 gtgggtaata cagtaatgga ggaacaaatg tctactttta caattcacia taattcctta 23880
 ttaataatga gccatcttaa ttggcttact gataattgaa aaagtctcca gaaaaggaaa 23940
 35 aactctggaa gtcatttact tattatgcca agtacgggtt taagtgtgtg ctgagcattc 24000
 atgtgatctt cctgacaatc ctatgaagat taatcctgca agagaaatga ttacattaaa 24060
 agtagcaagg tagagaagg ggaagagtgt gcacactgaa tcaatataag ccccttggga 24120
 40 aaaaaataaa taaaagttca ttttattcaa aaagggaatt ctagtgatat ccagaagtga 24180
 aagaataatt tgaattttta aaagagaaat taagctgagc atggtgggtc actactgtat 24240
 45 tcccagtact ttgggaggct gaggcaggat gattgcctta ggctgggagt ttgagaccag 24300
 cctaggcaac atagcgaggc ttcactctta caaaaaatgt aaaaattatt tgagtgtggt 24360
 gttgcatacc tatagtcata gctattttga tgtctcggtc agaaggatca cataagccca 24420
 50 ggcattcaag gctgtagtaa gctatgattg catcactgta ctccagtctt ggtgat 24476

<210> 3

55 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> cebador directo de PCNA

<400> 3

65
aggacggggg gaagttttct

	<210> 4		
	<211> 20		
	<212> DNA		
5	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador reverso de PCNA		
10	<400> 4		
	cagtggagtg gcttttgtga	20	
15			
	<210> 5		
	<211> 20		
20	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
25	<223> cebador directo de Estatmina		
	<400> 5		
30	cttgcgagag aaggacaagc	20	
	<210> 6		
35	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
40	<223> cebador reverso de Estatmina		
	<400> 6		
45	cggtcctaca tcggcttcta	20	
	<210> 7		
50	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
55	<220>		
	<223> cebador directo de GAPDH		
	<400> 7		
60	cccccaatgt atccgttgtg	20	
65	<210> 8		
	<211> 24		

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador reverso de GAPDH	
	<400> 8	
10	tagcccagga tgatgccctt tagt	24
15	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador directo de Ki-67	
25	<400> 9	
	agacgtgact ggttcccaac	20
30	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador reverso de Ki-67	
40	<400> 10	
	actgcttccc gagaactgaa	20
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930437

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LIEN YH, et al. Kidney International. 1997. Vol. 52 (61), pp. S-85-S-88.	1-21
A	ITO K, et al. Human Cell. 2004, Vol. 17 (1), pp. 17- 28.	1-21

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
30.12.2010

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/47 (01.01.2006)**A61K38/43** (01.01.2006)**A61P13/00** (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-21	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-21	SI
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LIEN YH, et al. Kidney International.1997. Vol.52 (61):S-85-S-88.	1997
D02	ITO K, et al. Human Cell. 2004, Vol. 17 (1):17-28.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga el uso de una proteína, anhidrasa carbónica II, que comprende la secuencia SEQ ID NO:1; o de un polinucleótido, que comprende la secuencia SEQ ID NO:2, que codifica para dicha proteína, para la elaboración de un medicamento (reivindicaciones 1-3). Así como el uso de una construcción génica, un vector y/o una célula, que comprenden el polinucleótido mencionado (reivindicaciones 4-6). Dicho medicamento tiene aplicación en la prevención y/o tratamiento del daño producido en un tejido u órgano causado por isquemia, isquemia-reperfusión, toxina o rechazo cuando el órgano ha sido trasplantado (reivindicaciones 8-19). Se refiere también a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los elementos antes mencionados, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo (reivindicaciones 20-22).

El documento D01 divulga el posible uso de la terapia génica para el tratamiento de enfermedades que afectan a órganos sólidos como es el riñón, refiriéndose en particular a la terapia génica en la que se utilizan los liposomas como sistema no viral de liberación de genes. También estudia la eficacia de la terapia génica en un modelo animal con deficiencia de anhidrasa carbónica II (ver todo el documento).

El documento D02, divulga un estudio sobre terapia génica dirigida al riñón. Aunque la liberación de genes en el riñón es difícil debido a las características biológicas de las células renales, este estudio concluye que la transferencia de genes mediada por liposomas es un método efectivo en la terapia génica dirigida al hígado (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es el uso de una proteína, que comprende la secuencia SEQ ID NO:1, o de un polinucleótido que la codifica, que comprende la secuencia SEQ ID NO:2, para la elaboración de un medicamento para prevención y/o tratamiento del daño producido en un tejido u órgano por isquemia, isquemia-reperfusión, toxina o rechazo cuando el órgano ha sido trasplantado. Se refiere también a una composición farmacéutica que puede contener cualquiera de los elementos antes mencionados.

1.1. REIVINDICACIONES 1-21

Se considera D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la presente invención. Anticipa el uso de terapia génica como modalidad terapéutica para enfermedades renales, utilizando un modelo animal deficiente en anhidrasa carbónica II. El documento D02 anticipa también un estudio de terapia génica dirigida al riñón.

Aunque la presente solicitud comparte con lo divulgado en D01 y D02 el uso de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades renales. Sin embargo, ninguno de estos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa el uso de la proteína anhidrasa carbónica II, ni de las secuencias SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, para la elaboración de un medicamento para la regeneración de un tejido dañado por isquemia, isquemia-perfusión o toxina debido a un fallo agudo de un órgano o rechazo de un órgano trasplantado.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-21 cumplen los requisitos de novedad y actividad Inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).