



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 333**

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)
C12N 15/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96114549 .7**
86 Fecha de presentación : **27.09.1991**
87 Número de publicación de la solicitud: **0769554**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.1997**

54 Título: **Gen de un CNP humano y proteína precursora.**

30 Prioridad: **27.09.1990 JP 2-259698**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **Asubio Pharma Co., Ltd.**
9-11 Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-8541, JP
Hisayuki Matsuo

72 Inventor/es: **Tanaka, Shoji;**
Kawashima, Kayoko;
Tawaragi, Yasunori;
Matsuo, Hisayuki;
Kangawa, Kenji y
Minamino, Naoto

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 302 333 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Gen de un CNP humano y proteína precursora.

5 Esta invención se refiere al gen de un CNP humano (péptico natriurético de tipo C humano que se abrevia en virtud de esto como hCNP), así como a la proteína precursora de hCNP (prepro hCNP) que es codificada por dicho gen.

10 En los últimos años, se han aislado diferentes péptidos a los que se hace referencia colectivamente como “péptidos natriuréticos” (NP) a partir de atrios y cerebros de diferentes animales. Hoy esos NP pueden ser clasificados en tres tipos, péptido natriurético de tipo A (ANP), péptido natriurético de tipo B (BNP) y péptido natriurético de tipo C (CNP), dependiendo de las similitudes en la secuencia de aminoácidos primaria y de la estructura de sus precursores. De estos tres tipos, el ANP y el BNP fueron aislados primero e identificados a partir de atrio y cerebro y de ahí que algunas veces se denominen “péptido natriurético atrial” y “péptido natriurético cerebral”, respectivamente (Matsuo, H. y Nakazato, H., *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 16, 43, 1.987; Sudoh, *et al.*, *Nature*, 332, 78, 1.988). No obstante, se sabe hoy que el ANP existe no solamente en el atrio sino también en el cerebro y que el BNP existe no sólo en el cerebro sino también en el atrio. Adicionalmente, tanto el ANP como el BNP muestran acciones natriurética e hipotensiva significativas, de manera que está claro que cada uno de estos péptidos funciona no sólo como hormona a ser secretada a partir del atrio a la sangre sino como transmisor nervioso en el cerebro, ayudando en cualquier caso a regular el equilibrio homeostático del volumen de fluido corporal y la presión sanguínea en mamíferos.

25 El CNP ha sido aislado e identificado muy recientemente a partir de cerebro porcino por Sudoh *et al.* como el tercer tipo de NP que no es asignable ni al ANP ni al BNP (Sudoh, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 863, 1.990). El primer CNP descubierto constaba de 22 restos aminoácido (este péptido es abreviado en virtud de esto como “pCNP-22”). Como ANP y BNP, CNP contenía dos restos cisteína que formaban un enlace disulfuro intramolecular, produciendo una estructura, anular compuesta por 17 restos aminoácido. Adicionalmente, se descubrió que la secuencia de aminoácidos primaria que formaba esa estructura anular en pCNP-22 tenía mucha homología con la del ANP y BNP.

30 No obstante, pCNP-22 difiere de ANP y BNP en que el último tiene numerosos restos aminoácido adicionalmente anclados al extremo C de la estructura del anillo mientras tal “estructura de cola” no se encuentra presente en pCNP-22. En otras palabras, el extremo C de pCNP-22 termina en un resto cisteína. En base a estos hechos, se ha descubierto que la estructura de pCNP-22 es similar a, pero claramente distinguible de las de ANP y BNP. Además, pCNP-22 mostraba acciones natriurética e hipotensiva y asimismo se descubrió que despliega una actividad mayor que ANP y BNP en ensayos de actividad relajante sobre muestras rectales en pollitos. A partir de estas observaciones, se descubrió que el pCNP-22 era un NP asignable a un nuevo tipo, cuyos péptidos se denominaron “CNP”.

40 Después del pCNP-22, un segundo péptido asignable a CNP fue aislado e identificado a partir de cerebro porcino por los autores de la presente invención. Se descubrió que el péptido constaba de 53 restos aminoácido con el pCNP-22 presente en el extremo C (este péptido es abreviado aquí en virtud de esto como pCNP-53). En otras palabras, se descubrió que el pCNP-53 era un péptido que tenía 31 restos aminoácido más anclados al extremo N de pCNP-22. Bastante interesadamente, se ha descubierto que el pCNP-53 existe en una cantidad mayor que el pCNP-22 en cerebro porcino (Solicitud de Patente Japonesa cedida comúnmente Núm. 186582/1990).

50 Otro estudio muy reciente tuvo éxito en la identificación de la estructura del precursor de pCNP-22 y pCNP-53 mediante análisis de genes y esto ayudó a desentrañar el mecanismo que está detrás de la biosíntesis de esos péptidos (Solicitud de Patente Europea Núm. 91 111 630.9). Los autores de la presente invención aislaron e identificaron un gen cromosómico porcino y el ADNc que codificaba el pCNP-22 y el pCNP-53; mediante su análisis, se desentrañó la estructura de la proteína precursora del CNP porcino (prepro pCNP); al mismo tiempo, se descubrió que cada uno de pCNP-22 y pCNP-53 era traducido primero a partir del ARNm como una prepro de pCNP compuesto por 126 restos aminoácido y que el péptido señal presente en la región N-terminal de la proteína precursora era escindido después en el procedimiento de secreción para ser convertido en pro pCNP, que era además específicamente escindido con enzimas de maduración y convertido en pCNP-53 o pCNP-22 según fuera apropiado. Basándose en estas observaciones, se ha descubierto que como en el caso de ANP y BNP, tanto pCNP-22 como pCNP-53 son péptidos secretores que son biosintetizados a partir de una proteína precursora común (prepro pCNP).

60 No obstante, en marcado contraste con los péptidos asignables a ANP y BNP que se ha descubierto que, por estudios previos, funcionan no sólo como hormonas a secretar desde el atrio a la sangre sino también como transmisores nerviosos en el cerebro, regulando de ese modo el balance homeostático del volumen de fluido corporal y la presión sanguínea, el CNP permanece poco claro en muchos puntos en cuanto a los detalles de su distribución *in vivo* y sus acciones fisiológicas.

65 Como para ANP y BNP, se han establecido sus estructuras en humanos y están en marcha esfuerzos para aplicarlos como fármacos. No obstante, hasta hoy, no ha sido identificada la estructura del CNP en seres humanos.

ES 2 302 333 T3

La presente invención ha sido completada en estas circunstancias y tiene como objeto identificar las estructuras de los CNP en seres humanos (hCNP), concretamente aquellas de los CNP de seres humanos que corresponden a pCNP-53, así como la estructura de su proteína precursora que corresponde a prepro pCNP en cerdos.

5 La Fig. 1 muestra el mapa por enzimas de restricción para hgEco-2 y hgEco-1, así como la estrategia para la determinación de la secuencia de bases;

La Fig. 2 muestra la secuencia de bases de hgEco-1 que codifica la proteína precursora de hCNP, así como la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de hCNP codificada por los exones de la región génica estructural;
10 y

La Fig. 3 muestra la secuencia de bases completa del ADNc de hCNP, así como la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de hCNP codificada por él.

15 Observando que la secuencia de aminoácidos de ANP y la secuencia de bases del gen que lo codifica son ambas conservadas con una elevada homología a través de las especies animales, los autores de la presente invención pensaron que habría una alta probabilidad de que existiera la misma situación en el CNP. Observando adicionalmente que el CNP aparece en una cantidad mucho más pequeña en cerebro porcino que ANP y BNP y que el tejido cerebral para la producción de esos péptidos está todavía por identificar, los autores de la presente invención
20 pensaron que era difícil aislar e identificar el péptido CNP directamente de un cerebro humano y aislar y analizar el ADNc para identificar el CNP humano. Basándose en estas suposiciones, los autores de la presente invención proyectaron un programa en el cual el gen de CNP humano se aislaba utilizando como sonda el gen de CNP porcino obtenido previamente o cCNP y el gen CNP humano aislado se analizó para identificar la estructura de la proteína precursora del CNP humano así como las estructuras de los CNP humanos que corresponden a pCNP-53 y
25 pCNP-22.

Sudoh T. *et al.*, (Biochem. Biophys. Res. Comm. 168 (1940) 863-870) han identificado el péptido natriurético de tipo C (CNP) que es un nuevo miembro de la familia de péptidos natriuréticos. El péptido descrito allí ha sido obtenido de extractos de certero porcino.

30 Según este programa, los autores de la presente invención cortaron primero un fragmento de ADN de aproximadamente 70 bases (ADNc de pC) de ADNc de pCNP (véase la solicitud de Patente Europea Núm. 91 111 630.9) tratando con una enzima de restricción DdeI y utilizaron este fragmento como sonda. La sonda también puede ser sintetizada químicamente. Utilizando esta sonda, los autores de la presente invención rastrearon una genoteca cromosómica humana (vector del fago λ que incorpora un fragmento génico cromosómico humano). La genoteca cromosómica humana puede ser fácilmente preparada por un experto en la técnica o, alternativamente, es asequible comercialmente de Clontech Co. Como resultado, se obtuvo un clon que hibridaba con el ADNc de pC. El análisis de este clon (λ hCNP2) mostró que albergaba aproximadamente 15 kpb del gen cromosómico humano y que un fragmento de ADN EcoRI (hgEco-2) compuesto de aproximadamente 2 kpb de esos 15 kpb hibridaba con la sonda de ADNc de pC. Cuando se
40 analizó este hgEco-2 compuesto por aproximadamente 2 kpb, se hizo evidente que este fragmento contenía parte del gen de hCNP (por el mapa mediante enzimas de restricción para hgEco-2 y la estrategia para la determinación de la secuencia de bases, véase Fig. 1).

En la siguiente etapa, con el propósito de identificar la estructura global de la proteína precursora de hCNP, los
45 autores de la presente invención rastrearon de nuevo la genoteca cromosómica humana utilizando hgEco-2 como sonda. Como resultado, se obtuvo un clon que hibridaba con la sonda hgEco-2. El análisis de este clon (λ hCNP1) confirmó que contenía un gen cromosómico humano de 15 kpb y más y que un fragmento EcoRI (hgEco-1) de ese clon que estaba compuesto de aproximadamente 4 kpb hibridaba con la sonda hgEco-2. Los autores de la presente invención construyeron después un mapa mediante enzimas de restricción para el fragmento hgEco-1 y lo compararon
50 con el mapa ya construido para hgEco-2 (véase la Fig. 1). Como resultado, se hizo claro que hgEco-1 era un ADN que tenía un gen cromosómico humano de aproximadamente 2 kpb anclado adicionalmente al lado 5' de hgEco-2. En base a este descubrimiento, los autores de la presente invención determinaron la secuencia de bases del fragmento de ADN de interés (para la estrategia para determinar la secuencia de bases de hgEco-1, véase la Fig. 1). Como resultado, se descubrió que como se muestra en la Fig. 2, el hgEco-1 contenía no sólo el gen estructural que codifica la secuencia de aminoácidos completa de la proteína precursora del CNP humano sino también la región promotora del gen CNP humano.

Primero, en cuanto a la región promotora, una secuencia TATA que era compartida por las regiones promotoras de los genes eucarióticos se encontraba presente en las posiciones 1.546 - 1.551 de la secuencia de bases del ADN mostrada en la Fig. 2 y asimismo se descubrió que dos secuencias GC y una secuencia Y, que presumiblemente
60 tomarían parte ambas en el control de la expresión del gen, se encontraban presentes aguas arriba de la secuencia TATA. En base a estos hechos, los autores de la presente invención concluyeron que la región de interés era la región promotora del gen precursor de CNP.

En cuanto a la región del gen estructural, ATG se encontraba presente en las posiciones 172 - 174 de la secuencia de bases aguas abajo (en el lado 3') de la secuencia TATA. Puesto que este ATG era el primer codón para metionina que aparecía aguas abajo (en el lado 3') de la secuencia TATA y puesto que la secuencia de bases alrededor del codón concordaba con la secuencia consenso de un codón de iniciación de la traducción, A/G NNATG (N indica una
65

cualquiera de A, T, G y C), que se sabe que existe en eucariotas, los autores de la presente invención estimaron que el ATG de interés sería un codón de iniciación de la traducción para el precursor del CNP humano. Si se supone que este ATG es un codón de iniciación de la traducción, la comparación con la estructura ya identificada del gen cromosómico CNP porcino muestra que el área hasta el codón (AAG) del resto lisina presente en las posiciones 1.809 - 1.811 de la secuencia de bases corresponde al primer exón. Asimismo una comparación similar muestra que el segundo exón empieza con el codón (GTC) del resto valina presente en las posiciones 2.256 - 2.258 de la secuencia de bases. El primer hgEco-2 analizado es un fragmento de ADN que codifica el área del segundo exón en posición 2.286 por delante de la secuencia de bases. Estos hechos también son confirmados por lo siguiente: en las cercanías de la posición 1.810 de la secuencia de bases se encuentran presentes secuencias de bases similares a C/A AGGT y A/G AGT que son conocidas como secuencias consenso de un donador de empalme; y una secuencia de bases similar a (Py)nNC/T AGG (Py indica el resto piridina, y N indica una cualquiera de A, T, C y G) que es conocida como secuencia consenso de un aceptor de empalme se encuentra presente en el lado 5' de la posición 2.256 de la secuencia de bases. En base a estas observaciones, los autores de la presente invención supusieron que la región de ADN en las posiciones 1.812 - 2.255 de la secuencia de bases era un intrón y que dicho intrón podría ser separado mediante empalme durante la formación de un ARNm maduro que codifique para la proteína precursora de hCNP. En otras palabras, quedó claro que la proteína precursora de hCNP estaba codificada por el primer exón que comenzaba en la posición 1.722 de la secuencia de bases y que terminaba en la posición 1.811 y asimismo por el segundo exón que comenzaba en la posición 2.256 y que dicha proteína precursora era un polipéptido que estaba compuesto totalmente por 126 restos aminoácido como en la porcina.

La proteína precursora de hCNP así identificada (que es referida en virtud de esto como "prepro hCNP") fue comparada en cuanto a su secuencia de aminoácidos primaria con la proteína precursora de pCNP. Se descubrió que las dos proteínas precursoras eran idénticas excepto por la diferencia en cinco posiciones de la secuencia de aminoácidos (posiciones 37, 40, 56, 90 y 101 de la secuencia de aminoácidos primaria de la prepro hCNP mostrada en la Fig. 3). Era particularmente interesante que las dos secuencias de aminoácidos siguientes eran completamente iguales en humanos y cerdos: la secuencia de aminoácidos primaria del péptido señal que existía en la región N-terminal de la prepro de CNP que ya se había descubierto que tomaba parte en la secreción de la proteína precursora del CNP en el mecanismo de biosíntesis del CNP porcino; y la secuencia de aminoácidos en las áreas próximas al extremo N del CNP-22 y el CNP-53 que serían reconocidas y escindidas por enzimas de maduración durante la formación de CNP-22 y CNP-53 a partir de la prepro de CNP.

Teniendo en cuenta los hechos discutidos antes, el CNP humano es biosintetizado presumiblemente mediante la siguiente ruta que es similar a la asociada con la porcina. Primero, la prepro del hCNP compuesta por 126 restos aminoácido es traducida a partir del ARNm. Después, el péptido señal presente en la región N-terminal de la prepro de hCNP es escindido para la conversión en la pro de hCNP en el procedimiento de secreción. Adicionalmente, la pro de hCNP es escindida mediante enzimas de maduración en posiciones específicas (entre las posiciones 73 y 74 de la secuencia de aminoácidos primaria que se muestra en la Fig. 3 y entre las posiciones 104 y 105 de la misma secuencia) para ser convertida en CNP-53 humano (posiciones 74 - 126 de la secuencia de aminoácidos primaria mostrada en la Fig. 3) que corresponde al pCNP-53, así como al pCNP-22 humano (posiciones 105 - 126 de la misma secuencia) que corresponde al pCNP-22. En cuanto al hCNP-22, su secuencia de aminoácidos primaria es completamente idéntica a la de pCNP-22, de modo que no hay duda de que mostrará las mismas actividades fisiológicas que pCNP-22 (p. ej. acciones natriurética e hipotensiva).

Por otra parte, la secuencia de aminoácidos de hCNP-53 difiere de la de pCNP-53 en dos posiciones (posiciones 90 y 101 de la secuencia de aminoácidos primaria mostrada en la Fig. 3), de manera que hCNP-53 es un péptido novedoso y sus acciones fisiológicas no son conocidas. De ahí, los autores de la presente invención sintetizaron hCNP-53 químicamente y examinaron las actividades fisiológicas de ese péptido novedoso. Como resultado, se descubrió que hCNP-53 mostraba una acción relajante del recto en pollito; a la vez, mostraba acciones natriurética e hipotensiva claras cuando se administraba a ratas.

En resumen, los autores de la presente invención aislaron un gen cromosómico que codificaba para la proteína precursora de hCNP y la analizaron para identificar su secuencia de aminoácidos primaria. Como resultado, identificaron con éxito las estructuras de los CNP humanos (hCNP-22 y hCNP-53) correspondientes a pCNP-22 y pCNP-53. Al mismo tiempo, sintetizaron el hCNP-53 químicamente y verificaron sus actividades fisiológicas. La presente invención ha sido completada en estas circunstancias.

Se deberá observar aquí que si el gen cromosómico hCNP de la presente invención es transducido a una célula de mamífero adecuada (p. ej. célula COS derivada de células de riñón de mono) o directamente o por estar enlazado a un área aguas abajo de un promotor adecuado (p. ej. el promotor inicial de SV 40), se puede obtener el ADNc de hCNP y este hecho cae en el ámbito de lo obvio (véase la Solicitud de Patente Europea Núm. 91 111 630.9).

La secuencia de bases completa del ADNc del hCNP así obtenido y la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína precursora de hCNP codificada por dicho ADNc se muestran en la Fig. 3.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar adicionalmente la presente invención.

ES 2 302 333 T3

Ejemplo 1

Preparación de la sonda de ADN (ADNc de pC)

- 5 La sonda de ADN (ADNc de pC) a utilizar para clonar un gen cromosómico que codificaba la proteína precursora de CNP humano se preparó mediante el método que consistía en escindir el ADNc de CNP porcino (véase la Soli-
citud de Patente Europea Núm. 91 111 630.9) con una enzima de restricción DdeI, aislar un fragmento de ADN de
aproximadamente 700 pb, marcar después el ADN con dCTP[α -P³²] mediante traslado de muescas.

10

Ejemplo 2

Aislamiento del gen cromosómico que codifica parte de la proteína precursora del CNP humano

- 15 La cepa LE 392 derivada de K12 de *E. coli* fue infectada con una genoteca de ADN de fagos de genes cromosó-
micos humanos almacenada a 4°C. Las células fueron cultivadas en placa sobre un medio LB (10 g, bacto triptona; 5
g, extracto de levadura; 5 g, NaCl; 1,5%, bactoagar; volumen total, 1 l) y se cultivaron durante la noche a 37°C. La
placa se enfrió a 4°C durante 30 minutos y se dejó estar sobre filtro de nitrocelulosa (producto de Schleicher & Schnell
Co.) sobre la placa del fago durante 5 minutos. Con posterioridad, el filtro se separó de la placa, se secó con aire, se
20 sumergió en una solución de desnaturalización alcalina (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M) durante 1 minuto, y después se
sumergió en una solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M; pH 7,0; NaCl 1,5 M) durante 1 minuto. Después de
eso, el filtro de nitrocelulosa se enjuagó con una solución 3 x SSC (20 x SSC NaCl, 175,3 g; citrato trisódico, 88,2 g;
volumen total, 1 l), se secó con aire y se trató con calor a vacío a 80°C durante 120 minutos.

- 25 Utilizando el filtro de nitrocelulosa así preparado, se realizó la hibridación en placa en las siguientes condiciones.
Primero, se añadió al filtro de nitrocelulosa una solución de prehibridación [3 x SSC; 1 x solución de Denhardt (que
constaba de albúmina, polivinil-pirrolidona y Ficoll, pesando cada uno 0,2 mg/ml); ADN de esperma de salmón, 50
 μ g/ml; DSS al 0,1%] y se llevó a cabo la prehibridación a 60°C durante 3 horas. Después, utilizando 10⁶ cpm de la
sonda de ADNc de pO y 1 ml de la solución de prehibridación para dos hojas de filtro de nitrocelulosa, se realizó
30 la hibridación durante la noche a 60°C. Con posterioridad, el filtro se lavó tres veces con una solución 3 x SSC que
contenía DSS al 0,1%, realizando cada lavado a 60°C durante 30 minutos; el filtro lavado se secó con aire y se sometió
a autorradiografía a -80°C durante 24 horas. Rastreando aproximadamente 2 x 10⁵ clones de este modo, se obtuvo un
clon que hibridaba con la sonda de ADNc de pC. Este clon se denominó "hCNP 2" y se sometió a análisis en las
fases siguientes.

35

Ejemplo 3

Análisis del fago hCNP 2 y determinación de su secuencia de bases de ADN

40

A. Análisis del ADN del fago hCNP 2

- Se preparó ADN a partir del fago hCNP 2 de la manera habitual. Con posterioridad, se escindió el ADN del fago
con una enzima de restricción EcoRI y el fragmento de ADN resultante se separó y analizó mediante electroforesis
45 en un gel de agarosa. Se descubrió que hCNP 2 era un fago que contenía un gen cromosómico humano de aproxi-
madamente 15 kpb. El análisis mediante transferencia Southern utilizando la sonda de ADNc de pC mostró que el
fragmento EcoRI de hCNP 2 (hgEco-2) que tenía una longitud de aproximadamente 2 kpb hibridaba con la sonda de
ADNc pC.

50

B. Determinación de la secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-2

- Con el fin de determinar la secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-2, el último fue sub-clonado primero
en un vector plasmídico pUC 118 (Takara Shuzo Co., Ltd.) en el sitio EcoRI para preparar pUC hCNP 2. El pUC hCNP
2 fue después escindido con una enzima de restricción adecuada y el fragmento de ADN resultante fue subclonado en
55 el fago M13. La secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-2 fue determinada mediante el método didesoxi.

Como resultado, se descubrió que el fragmento de ADN de interés codificaba parte del gen CNP humano.

Ejemplo 4

Aislamiento del gen cromosómico que codifica la región completa de la proteína precursora del CNP humano

- 65 Utilizando el filtro de nitrocelulosa acondicionado mediante el método descrito en el Ejemplo 1, se realizó la
hibridación en placa en las condiciones descritas abajo. La sonda a utilizar se preparó marcando el hCNP 2 derivado
de hgEco-2 (aproximadamente 2 kpb) con dCTP[α -P³²] mediante traslado de muescas. La sonda así preparada se
denomina en virtud de esto ADN hgEco-2.

ES 2 302 333 T3

Primero, se añadió una solución de prehibridación [3 x SSC; 1 x solución de Denhardt (que constaba de albúmina, polivinilpirrolidona y Ficoll, pesando cada uno 0,2 mg/ml); ADN de esperma de salmón, 50 µg/ml; DSS al 0,1%] y se llevó a cabo la prehibridación a 65°C durante 3 horas. Después, utilizando 10 cpm de la sonda de ADNc de hgEco-2 y 1 ml de la solución de prehibridación para dos hojas de filtro de nitrocelulosa, se realizó la hibridación durante la noche a 65°C. Con posterioridad, el filtro se lavó tres veces con una solución 3 x SSC que contenía DSS al 0,1%, realizando cada lavado a 65° durante 30 minutos; el filtro lavado se secó con aire y se sometió a autorradiografía a -80° durante 24 horas. Rastreando aproximadamente 5 x 10⁵ clones de este modo, se obtuvieron cinco clones que hibridaban con la sonda de ADN hgEco-2. Uno de estos clones se denominó “λhCNP1” y se sometió a análisis en las fases siguientes.

10

Ejemplo 5

Análisis del ADN del fago λhCNP1 y determinación de su secuencia de bases de ADN

15

A. Análisis del ADN del fago λ hCNP1

Se preparó ADN a partir del fago λhCNP1 de la manera habitual. Con posterioridad, se escindió el ADN del fago con una enzima de restricción EcoRI y el fragmento de ADN resultante se separó y analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Como resultado, se descubrió que λhCNP1 era un fago que contenía un gen cromosómico humano de aproximadamente 15 kpb o más. El análisis mediante transferencia Southern utilizando la sonda de ADN de hgEco-2 mostró que el fragmento de ADN EcoRI (hgEco-1) de aproximadamente 4 kpb hibridaba con la sonda de ADNc hgEco-2. De ahí, se determinó la secuencia de bases de este fragmento de ADN que hibridaba con el fragmento de ADN hgEco-2 mediante el siguiente método.

25

B. Determinación de la secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-1

Con el fin de determinar la secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-1, el último fue subclonado primero en un vector plasmídico pUC 118 (Takara Shuzo Co., Ltd.) en el sitio EcoRI para preparar pUC CNP1. El pUC CNP1 fue después escindido con una enzima de restricción adecuada y el fragmento de ADN resultante fue subclonado en el fago M13. La secuencia de bases del fragmento de ADN de interés fue determinada mediante el método didesoxi. La región de la secuencia de bases determinada por el método descrito antes se muestra mediante flechas continuas en la Fig. 1.

En una etapa separada para determinar la secuencia de bases de la hebra inferior del fragmento de ADN hgEco-1 (hgEco-1), el último fue subclonado primero en un vector del fago M13 mpl8 en el sitio EcoRI para preparar M13 hCNP1. Después, utilizando este M13 hCNP1 como molde, se determinó la secuencia de bases del fragmento de ADN de interés mediante el método didesoxi utilizando un cebador universal y el cebador oligonucleotídico que se había sintetizado en base a la secuencia de bases ya determinada. La región determinada de ese modo, se muestra mediante flechas discontinuas en la Fig. 1. La secuencia de bases determinada mediante el método descrito antes se combinó con la secuencia de bases del fragmento de ADN hgEco-2 para completar la secuencia de bases completa del fragmento de ADN hgEco-1. La secuencia de bases completada y la secuencia de aminoácidos predecible a codificar a partir de dicha secuencia de bases en el sitio del exón se muestran en la Fig. 2.

45

Ejemplo 6

Síntesis química de hCNP-53

50

Se sintetizó el hCNP-53 mediante un método de síntesis en fase sólida con un sintetizador peptídico de Applied Biosystems Co. Después se desprotegió con fluoruro de hidrógeno para formar un enlaces S-S intramolecular, seguido de purificación.

Los resultados de la secuenciación de aminoácidos del producto puro final y los datos del análisis de aminoácidos se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Aquellos resultados y datos demostraron positivamente que el hCNP-53 sintetizado químicamente era exactamente el productor pretendido. En la Tabla 1 se muestran los rendimientos de los aminoácidos PTH obtenidos mediante ciclos sucesivos de análisis del hCNP-53 sintetizado químicamente mediante el método de Edman. En la Tabla 1, cada aminoácido es designado por una sola letra. En la Tabla 2 se muestran los datos del análisis de aminoácidos del hCNP-53 sintetizado químicamente.

60

65

ES 2 302 333 T3

TABLA 1

Análisis de la Secuencia de Aminoácidos de CNP-53 Humano Sintético

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Núm. de Ciclo			Núm. de Ciclo		
1	D	349,8 pmoles	28	A	1621,0
2	L	4000,6	29	N	418,3
3	R	105,9	30	K	1910,6
4	V	3060,8	31	K	1164,7
5	D	292,0	32	G	771,0
6	T	851,1	33	L	1277,0
7	K	2860,4	34	S	159,7
8	S	595,3	35	K	1204,8
9	R	290,6	36	G	552,8
10	A	2761,5	37	C	ND
11	A	2714,6	38	F	998,2
12	W	1038,4	39	G	668,2
13	A	2386,8	40	L	959,6
14	R	151,6	41	K	634,2
15	L	2628,7	42	L	1251,3
16	L	2701,2	43	D	141,1
17	Q	762,3	44	R	339,1
18	E	418,7	45	I	778,9
19	H	71,0	46	G	702,7
20	P	758,0	47	S	163,2
21	N	478,6	48	M	420,9
22	A	1322,9	49	S	68,8
23	R	138,9	50	G	430,1
24	K	1176,9	51	L	408,6
25	Y	678,9	52	G	223,7
26	K	1204,6	53	C	ND
27	G	1674,0			

ES 2 302 333 T3

TABLA 2

Análisis de la Composición de Aminoácidos de hCNP-53 Humano Sintético

Aminoácido	Encontrado	Calculado
Asx	4,95	5
Thr	0,92	1
Ser	3,59	4
Glx	2,06	2
Gly	7,04	7
Pro	1,01	1
Ala	4,90	5
1/2Cys	1,21	2
Val	0,97	1
Met	0,97	1
Ile	0,99	1
Leu	7	7
Tyr	0,97	1
Phe	1,02	1
Lys	6,92	7
His	0,97	1
Trp	ND	1
Arg	5,04	5

Ejemplo 7

50 Medida de las Actividades Fisiológicas de hCNP-53

A. Actividad relajante de recto de pollito de hCNP-53

55 Se llevó a cabo la medida de la actividad relajante de recto de pollito de acuerdo con el método de Currie *et al.* descrito en Nature, 221, 1-13, 1.983. Se encontró que la CE₅₀ de hCNP-53 era de 0,87 ± 0,1 nM que era aproximadamente tres veces la actividad de α-ANP.

B. Acciones natriurética e hipotensiva de hCNP-53

60 Se midieron las acciones natriurética e hipotensiva de hCNP-53 según el método de DeBold *et al.* descrito en Life Sci., 28, 89-94, 1981. Como resultado, se descubrió que hCNP-53, cuando se administraba a una dosis de 100 nmoles/kg, aumentaba el aclaramiento de la orina 2,5 veces mientras reducía la presión sanguínea en un 10%.

65 Como se ha descrito en las páginas anteriores, los autores de la presente invención aislaron parte del gen hCNP a partir de una genoteca de genes cromosómicos humanos utilizando ADNc de pCNP como sonda. Utilizando el gen hCNP aislado como sonda, aislaron con éxito un gen que codificaba para la región completa del precursor de hCNP. El gen aislado también contenía la región promotora de hCNP. Como resultado, se verificó que también existía en

ES 2 302 333 T3

humanos, así como también en cerdos, un gen que codificaba para CNP. Adicionalmente, se determinó la estructura completa de la proteína precursora de hCNP. Como en cerdos, la proteína precursora de hCNP estaba compuesta por 126 restos aminoácido y contenía en el extremo C-terminal las secuencias de aminoácidos que correspondían a pCNP-53 y pCNP-22 aisladas de cerebro porcino. Puesto que las secuencias de aminoácidos de esos péptidos en el sitio de maduración tenían una coincidencia completa entre porcino y humano, se prevé que esos péptidos también serían biosintetizados en humanos a través de una ruta similar a la implicada en cerdos y que funcionarían como hormonas o transmisores nerviosos que regulan el equilibrio homeostático del volumen de fluido corporal y la presión sanguínea *in vivo*.

Lo que es digno de ser concretamente observado en la presente invención es el descubrimiento de que el hCNP-53 era estructuralmente diferente del pCNP-53 en dos posiciones de la secuencia de aminoácidos. Los autores de la presente invención sintetizaron químicamente por lo tanto el hCNP-53 y verificaron sus actividades fisiológicas en términos de acción relajante del recto en pollitos, así como sus acciones natriurética e hipotensiva. Como resultado, el hCNP-53 demostró que era un péptido fisiológicamente activo. Esto tendrá gran importancia en la aplicación de los péptidos de la familia CNP a fármacos. Por ejemplo, si se utiliza pCNP-53 que es estructuralmente diferente de hCNP-53 como fármaco, probablemente será reconocido como sustancia foránea en el cuerpo humano causando producción de anticuerpos. Como consecuencia, la actividad de pCNP-53 puede ser neutralizada o se puede causar nefrotoxicidad mediante un complejo antígeno-anticuerpo. Adicionalmente, el pCNP-53 puede tener menos afinidad por el receptor de CNP de células humanas que el hCNP-53 y, en ese caso, se puede atenuar *per se* la acción de pCNP-53. Estos problemas están ausentes de hCNP-53 y lo mismo se verifica para otros péptidos que pueden ser biosintetizados a partir de la proteína precursora de hCNP [entre las posiciones 24 y 102 de la secuencia de aminoácidos primaria de la prepro de hCNP, hay al menos 9 restos lisina (en las posiciones 24, 30, 51, 52, 55, 65, 89, 97 y 99) y al menos 8 restos arginina (en las posiciones 33, 68, 70, 73, 76, 82, 87 y 96) y la pro hCNP puede ser escindida mediante enzimas de maduración *in vivo* en posiciones específicas del lado C-terminal de aquellos restos aminoácido básicos para aumentar la probabilidad de que existan *in vivo* aquellos péptidos que tengan aminoácidos adicionales anclados al extremo N de hCNP-22 y hCNP-53].

Asimismo se ha descubierto que el gen de la proteína precursora de hCNP mostrado en la Fig. 2 contiene no sólo la región del gen estructural que codifica la proteína sino también la región promotora que expresa ese gen estructural. Enlazando, por ejemplo, el gen de CAT (cloramfenicol acetil transferasa) a un área aguas abajo de esta región promotora y transduciendo la combinación a una célula humana adecuada, se hace posible estudiar íntimamente el mecanismo que está detrás de la regulación de la expresión de hCNP.

Por lo tanto, la información obtenida mediante la presente invención acerca del gen cromosómico de la proteína precursora de hCNP y su secuencia de aminoácidos primaria hará grandes contribuciones no sólo a futuros estudios para el desentrañamiento del mecanismo que está detrás de la biosíntesis y de las acciones fisiológicas de los CNP humanos sino también a los esfuerzos para establecer aplicaciones farmacéuticas de los péptidos asignables a la familia de CNP.

ES 2 302 333 T3

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste en los restos aminoácido 1 a 53 con la siguiente secuencia de aminoácidos

5

Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Arg	Ala
Ala	Trp	Ala	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	His	Pro
Asn	Ala	Arg	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ala	Asn	Lys
Lys	Gly	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu
Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Met	Ser	Gly
Leu	Gly	Cys							

10

15

2. Un polipéptido como se representa en la reivindicación 1, que carece del péptido del extremo N debido a que es escindido entre dos restos aminoácido adyacentes cualesquiera de la secuencia de aminoácidos entre los aminoácidos Asp(1) a Ala (28).

20

3. Un ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

4. Un ADN de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la siguiente secuencia de bases.

25

GAC	CTG	CGC	GTG	GAC	ACC	AAG	TCG	CGG	GCA
GCG	TGG	GCT	CGC	CTT	CTG	CAA	GAG	CAC	CCC
AAC	GCG	CGC	AAA	TAC	AAA	GGA	GCC	AAC	AAG
AGG	GGC	TTG	TCC	AAG	GGC	TGC	TTC	GGC	CTC
AAG	CTG	GAC	CGA	ATC	GGC	TCC	ATG	AGC	GGC
CTG	GGA	TGT							

30

35

40

45

50

55

60

65

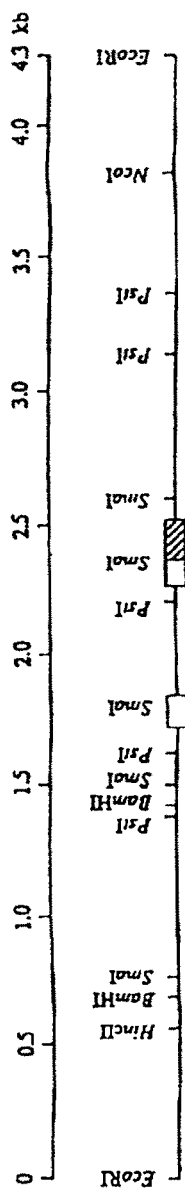


Fig. 1(a)

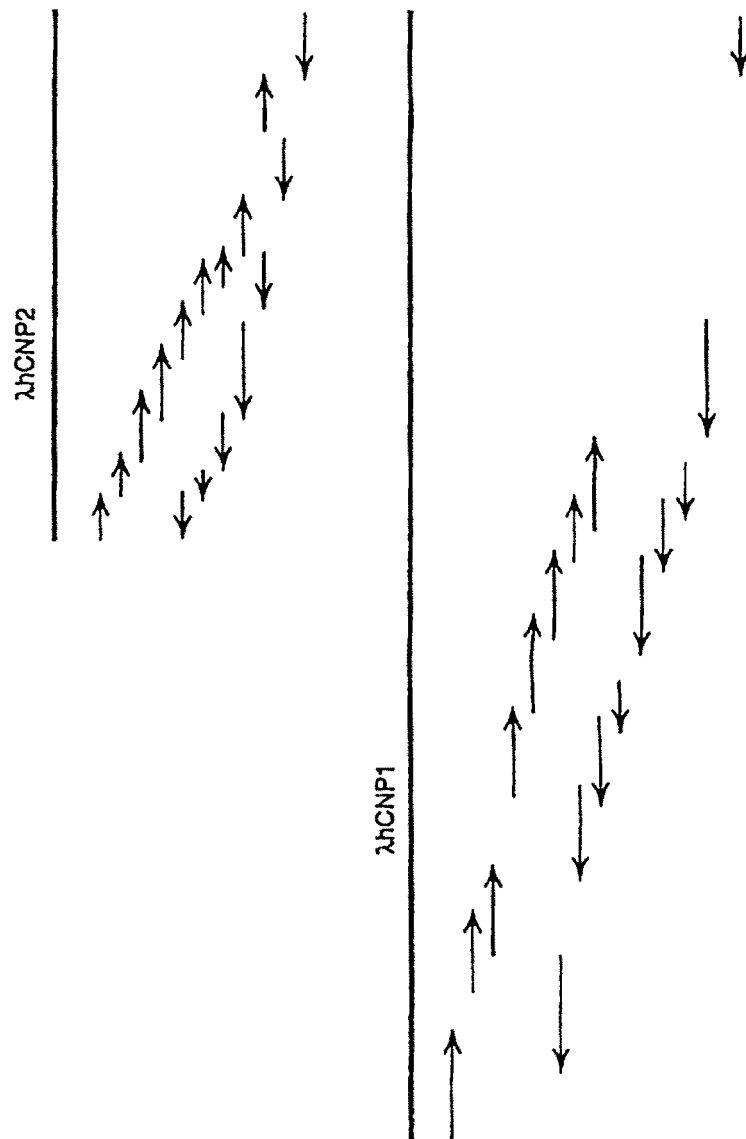


Fig. 1(b)

Fig. 2-1

GAATTCCGTGTTTCCTAAGCAAAGTGACCTGTGTAGTGGTTGCTCC
 AATGTTGTGAGTCAGGGTATGAGAGTGGGAAGGGGTAGCCTGAGA 90
 AAGGTGCCGACAGAGCAGACCATGATGCGGCCGCCTTAGCAGCTC
 TGGGACCAGGCTCACTACCACGGAGGGAAGAGGGAGGCTTGGAGG 180
 GAACCTGGTTCTCCAAGCCCCTCTTCACTCCAGTTGCCTTCCTGC
 CTCAGGCACAGCTTCCTCTCCCTGGAAAATCTCGTCTGGGCTACT 270
 GTCTCCCCAGAATCGCCTTCACGCCTGGGGACAGCCACTGCACTC
 CTGCGGCAACATTTGTTCTCTCTCCAGCCTGCGTCCTGCTCAGCA 360
 GCAGCCAGTCATAGATTCCTGCTCTTCAATCAATTCGGGGGATCT
 GGGCTCTCCGCCTCTGCGGCCACACCGCAGTGCCCAAATGCCCA 450
 CCACACTCCTTAGTGTCCAAGGGACCGAGAAGCCCAGTGCAAGGA
 GAGCAAGTTCGTGAGTGGTAGGGATATGTGGCCATGTCCCGAGAG 540
 CCACGGGGACCTCTCTACAGTCAAAAACGGGAAGTTGACCACCTG
 TCACGGCTGGCAGAGGCTGGACTGGGCCGCTGGCTAGGAAGCTCT 630
 CTCCCCAGCCTGTGAAAGTGCACAGGATACTGGAGCGGGCTTCCC
 CAGCAGCGGATCCTCGCGTGGGTGCAGGCAAGGTCAGGTGCGCAT 720
 TGTTCCACAGAGGGAGTTCACCAGCGGAGTCAGACCCCGGGACG
 TTCTGTGTGGCCGAAACCGGCTGAACGTGAACCTAGAGCAGTAAC 810
 TGGCGAGCATAACGATGCCGCGGAGCACACGCATGAGCATGAATAT
 CTTGGTTCCGCGCTCGCAAGTCCCCTCGTTCCCGCCTTGCGCTCAA 900
 AACTCAGGCTGGCGACACCCCTGCACTCTCCAGTGTGGAAGACT
 TCGCTCCCCCCTGCGGCCAGGCGAACCCTGCTCTCCCTGCGCC 990
 TCCCACCCAGTCTCCAACCCCATCCTCTGCCTCCCAACCTAAC
 GACGTCGCTGTGGTCTGCGTCCCGCCCTGACCGGCAGGTGAAAGG 1080
 CGGAGCTGCAATGCCATCCCGCGGCTGTCAGGTGCCAGGGAAGA
 GTTTGGCGACAAGCAGGGCTGCGTGGATTTGGGCAGCGCCAAC 1170
 TTCTGCCTGTATGACTTGGGCAAGTGAATTCATTCTCTGAGCC
 TGCTTTGCACCTGCAAAGAGGGCTACGTATCCCTTCCAGGTAGA 1260
 GTGAGTGCATGAGGACCTAGTGGGTGCACAAGGGCACCAAGGCG

Fig. 2-2

CACCGATGCTCGGCAGGCCAGGGCGCGCTCGCTGCAAATGGAG 1350
 TTCCCCTGTGCGCTCAGCTCTGCAGCTCCAAGTGCAGCCTGGAGC
 GAGCCCGCCGAGCCGCGGGATCCCTCCGGGGTGGGATAAGGGAGG 1440
 GGAGCCCCCGCGGCCCCCTCCCGGCCCTCGGCGCGGCCGCGTGCG
 TGGTGTCAATTGGCCCGGGCGGCCCGGTGGGCGGGAGGATGACATC 1530
 AGCGGCAGGTTGGATTATAAAGGCGCGAGCAGAGTCACGGGCTCA
 GAGCGCACCCAGCCGGCGCCGCGCAGCACTGGGACCCTGCTCGCC 1620
 CTGCAGCCCAGCCAGCCTGCTCCGCATCCCCCTGCTGGTCTGCCC
 GCCGACCTGCGCGCCCTCGCTGCCGCCCGTGTGCGCCCTCGACC 1710
 CCAGCGGCACCATGCATCTCTCCAGCTGCTGGCCTGCGCCCTGC
 MetHisLeuSerGlnLeuLeuAlaCysAlaLeuL

TGCTCACGCTGCTCTCCCTCCGGCCCTCCGAAGCCAAGCCCGGG 1800
 euLeuThrLeuLeuSerLeuArgProSerGluAlaLysProGlyA

CGCCGCCGAAGGTGGGTGCTGTCTGTTGGGACGCCGAGCCTGGGAG
 laProProLys

AGGCGTGGGAGGCTGGGGGCTTGGAGAATGCGGCGCGCAGGACCC 1890
 AGGAGAGAGGGAAGGCAGGCGGCTGTCTCCTCCGAGATGCGCGTG
 GCGGAGAGCCGGGAGCCCTCGAAGCGCGGATTCGGGGGTCCACT 1980
 TCTCCAGCCTCCGGAGAACATCGGCCCATGCGCAGCCCCCTACCC
 CAGTGTGGCCTGCCCGGCGAGCAGCAAAGGGAGGGCAGGGGGCTT 2070
 CCGGAGGGAGCGGCCAAGGCGGCCGCGTGGCAGGTGGATGCGGGG
 CCAAGCTGGCCGGCATCGGTGGGGGCGGCTCTGGGCTTGGGAGGG 2160
 ACACCCCGCGCCGGCGGGCGCGTGGGGCTGGAGCATCAGAGTCCC
 CCGTGTGCTGCAGCCGCGTGTCCCTTACCTGCCCGCTCTTTCCTCG 2250
 GACAGGTCCC CGAACC CGCCGGCAGAGGAGCTGGCCGAGCCGC
 ValProArgThrProProAlaGluGluLeuAlaGluProG

Fig. 2-3

AGGCTGCGGGCGGCGGTCAGAAGAAGGGCGACAAGGCTCCCGGG 2340
 lnAlaAlaGlyGlyGlyGlnLysLysGlyAspLysAlaProGlyG

 GCGGGGGCGCCAATCTCAAGGGCGACCGGTCGCGACTGCTCCGGG
 lyGlyGlyAlaAsnLeuLysGlyAspArgSerArgLeuLeuArgA

 ACCTGCGCGTGGACACCAAGTCGCGGGCAGCGTGGGCTCGCCTTC 2430
 spLeuArgValAspThrLysSerArgAlaAlaTrpAlaArgLeuL

 TGCAAGAGCACCCCAACGCGCGCAATACAAAGGAGCCAACAAGA
 euGlnGluHisProAsnAlaArgLysTyrLysGlyAlaAsnLysL

 AGGGCTTGTCCAAGGGCTGCTTCGGCCTCAAGCTGGACCGAATCG 2520
 ysGlyLeuSerLysGlyCysPheGlyLeuLysLeuAspArgIleG

 GCTCCATGAGCGGCCTGGGATGTTAGTGCGGCGCCCCCTGGCGGC
 lySerMetSerGlyLeuGlyCys***

 GGTGAGTACGGCCACCCGACGCCCAGCCCCAGCCCCGGCCCCGGA 2610
 CCGCCCCCGCCCCAGCCAGCCTTCGGAGGCGCGGAGCCGCCTTT
 GCTCAAGTTGTGCTAGGCGTTTGCCAGCCGCCCCCTTTATTATCC 2700
 CACTTTACAGACAAAGAAAGCGAAGGATAACGTGATCGGGGA
 TTGGCAAGGTCAGAAACGGCTCAGCCTGGTTGAACCCACCTGGCT 2790
 TCTTCTGGAGAAGCAGAAACAGGCTTGGTGGTGTCTCACCCACCC
 CTGAACCCTAGCTGAACTAGCAGCACTGGCCCCCTATTGGCCAGCT 2880
 GGTGGGGGGATTGAGAGGAGATCATGGGTTTGTGGGAGCAGAGAA
 GGAAGGTTACACCCACAAGTCCAGGGGACATCGATCATCTGCTGG 2970
 CCACCATGCCCCCTGTAGTGAGAGTAGCCCTCTGCTGGCACTGTC
 AGAGCGCCCTTCTGCCTGGGACACTCCGATTCCTGTCCCTTCTCT 3060
 AAACCCAGGCAGTGGGCAACTGGTCTGTCCAGGGTCCTGAGGCA
 TCTGCAGCCTGGTGGCTTCGGGGGTGAATCTCAGTGCTTGTGGCA 3150

Fig. 2-4

CTATTTTCAGGGAATAGGAAAGACACTAAAAGTAAATATTATTTGCC
 CCAGCCTCGAACTCAACACGTCCCAGAGTCCCTCACCAACCCGTG 3240
 CCCGACCCAACCGGTGCTCTGGGCTCCGTTTCTGGTGTGGGGTCT
 CACCCCGCACTAGGGCTGGAAACCTCTGCCCTACCGCCACCCCT 3330
 GCCGGGTGCCGCGTGGTGGTAATTTACTGCTGCAGAGAGCCTCAC
 CTCTCCTCTTTCCCTCCTCTCTATTCCCTGCCGCTGCCCGTGCCC 3420
 ACTGAATAACATCCCAGCCTCTGACATTGACAGTCATGTGCGTTA
 GGATCAGGCTTACCTGGCTTTCTCGCTTTCTTGCCTCCAGCTCAG 3510
 CAGCTGCCACTGCCTGTCCCACACCTTGACTGTCCCATCCCAGGC
 TACGGGCAAGCTGCTGTCTCTCCCAGAAACCCCTTGTCAGTGTGGA 3600
 TCTTCTCCCGGAGGAAACAAGAGCGCCTGTCCAGCACACTGTCTC
 TTTTTTACAGTACTGAACACTTTTTCACAGTTTGTGAACCCATTC 3690
 ACCTCTCCATATTGAACAGCTTAAGGGCGAAGTGCTGGCCTAAGG
 CACTCTAGGACCCACTGCACCCCGAACAGACTCGTGGAAATATTT 3780
 GTCAATGACCAGAGAAACCAGCACACCCTGGCCCATGGCCACTCC
 CACCTGCCCGAGGTTTTAACCAGTGCCCTTCCTCTCTTTGCAGCC 3870
 AGACCTCACTCGGCTGTGGGCTCTCCCCAGTTCTGCAAAGGCTG
 TAGTTGTCTGTGATCTTGACTCTCCCTGCACAGGGAGAAGAATG 3960
 ATTCTGACACTTGGGGACCAGCCTTCAGTAGCTACCCTTGGAATG
 CCTTTGCTCTCTTCTCCTGTCTAAACAACAAAGAGACGGAGTC 4050
 TGAGGCCTCAAATTTTCAGTTTGATTTAAGCATCAAGTTCAAAC
 TTAGAACCCTGAGCAAATGTTAGTGACTCTCATTGGTTTCGTACCT 4140
 GGAATGCGCATCCCCACAGGGGCTTTGTTCTTGGGCTGGCTGTC
 TGTGGTCACCAAGTGATGGCCAAACGGGTGGTGAAAGATGCTGTG 4230
 TAGGAGGAATCCACATTGTTAAGAATTC 4258

ES 2 302 333 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Asubio Pharma. Co., Ltd.

5 <120> Gen y proteína precursora de CNP Humano

<130> PED-11-2EPB

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 53

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
20 25 30

30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
35 40 45

35

Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 2

40 <211> 159

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 2

gacctgcgcg tggacaccaa gtcgcgggca gcgtgggctc gccttctgca agagcacccc 60

50

aacgcgcgca aatacaaagg agccaacaag aagggttgt ccaaggctg cttcggcctc 120

aagctggacc gaatcggctc catgagcggc ctgggatgt 159

<210> 3

55 <211> 4258

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

<221> CDS

<222> (1722)..(1811)

65 <223>

<220>

ES 2 302 333 T3

<221> CDS

<222> (2256)..(2543)

<223>

5

<400> 3

```

10      gaattcctgt ttcctaagca aagtgacctg tgtagtgggt gctccaatgt tgtgagtcag      60
      ggtatgagag tgggaagggg tagcctgaga aagggtgccga cagagcagac catgatgcgg      120

      ccgccttagc agctctggga ccaggctcac taccacggag ggaagagggg ggcttgagg      180
15      gaacctgggt ctccaagccc ctcttcactc cagtgcctt cctgcctcag gcacagcttc      240
      ctctccctgg aaaatctcgt ctgggctact gtctccccag aatcgccttc acgcctgggg      300
      acagccactg cactcctgcg gcaacatttg ttctctctcc agcctgcgtc ctgctcagca      360
20      gcagccagtc atagattcct gctcttcaat caattcgggg gatctgggct ctccgcctct      420
      gcggcccaca ccgcagtgcc caaatgccc ccaactctct tagtgtcca gggaccgaga      480
      agcccagtcg aaggagagca agttcgtgag tggtagggat atgtggccat gtcccagagag      540
25      ccacggggac ctctctacag tcaaaaacgg gaagttgacc acctgtcacg gctggcagag      600
      gctggactgg gccgctggct aggaagctct ctccccagcc tgtgaaagtg cacaggatac      660
      tggagcgggc ttccccagca gcggatcctc gcgtgggtgc aggcaaggtc aggtgcgcat      720
30      tgttcccaca gagggagttc accagcggag tcagaccccg ggacgttctg tgtggccgaa      780
      accggctgaa cgtgaacctc gagcagtaac tggcagagcat acgatgccgc ggagcacacg      840
      catgagcatg aatatcttgg ttccgcgctc gcagtccctt cgttccccgc ttgcgctcaa      900
35      aactcaggc  tggcgacacc cctgcactct ccagtgtgga agacttgcgc tccccctgc      960
      ggcccaggcg aaccccgcct tcctgcgccc tcccacccc gtcctccaac cccatcctct      1020
      gcctcccaac ctaacgacgt cgctgtggtc tgcgtcccgc cctgaccggc aggtgaaagg      1080
40      cggagctgca atgccatccc gcggctgtca ggtgccagg gaagagttag gcgacaagca      1140
      gggctgcgct gatttcgggc agcgcctaact ttctgcctgt atgactttgg gcaagtgact      1200
      tcattcctct gagcctgtct ttgcacctgc aaagagggtc acgtatccct tccaggtaga      1260
45      gtgagtgcga tgaggacctc gtgggtgcac aagggcacca aggcgcaccg atgctcggca      1320
      ggccagggcg cgcgctcgct gcaaatggag ttccccctgt cgctcagctc tgcagctcca      1380
      agtgcagcct ggagcgagcc cgcggagccg cgggacccct ccgggggtggg ataagggagg      1440
      ggagcccccg cggccccctc ccggccctcg gcgcggccgc gtgcgtggtg tcattggccc      1500
50      gggcggcccc gtgggcggga ggatgacatc agcggcaggt tggattataa aggcgcgagc      1560
      agagtacagg gctcagagcg caccagccg gcgccgcgca gactgggac cctgctcgcc      1620
      ctgcagccc gccagcctgc tccgcatccc cctgctggtc tgcccgccga cctgcgcgcc      1680
55      ctgctgccc cccgtgtgcg ccctcgacc ccagcggcac c atg cat ctc tcc cag      1736
      Met His Leu Ser Gln
      1 1 5

      ctg ctg gcc tgc gcc ctg ctg ctc acg ctg ctc tcc ctc cgg ccc tcc      1784
      Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser
      10 15 20

      gaa gcc aag ccc ggg gcg ccg ccg aag gtgggtgctg tcgtggggac      1831
      Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys
      25 30

65      gccgagcctg ggagaggcgt gggaggctgg gggcttggag aatgcggcgc gcaggaccca      1891
      ggagagaggg aaggcaggcg gctgtctcct ccgagatgcg cgtgggcgag agccggggag      1951

```


ES 2 302 333 T3

tcttgccctcc agctcagcag ctgccactgc ctgtcccaca ccttgactgt cccatcccag 3553
 gctacgggca agctgctgtc ctccccagaa acccttgtca gtgtggatct tctcccggag 3613
 5 gaaacaagag cgctgtcca gcacactgtc tcttttttac agtactgaac actttttcac 3673
 agttttgtgaa cccattcacc tctccatatt gaacagctta agggcgaagt gctggcctaa 3733
 ggcactctag gacccactgc accccgaaca gactcgtgga aatatttgtc aatgaccaga 3793
 10 gaaaccagca caccctggcc catggccact cccacctgcc cgaggtttta accagtgcc 3853
 ttctctctt tgcagccaga cctcactcgg ctgtggcct ctccccagtt ctgcaaaggc 3913
 tgtagtgtc tgtgatctt actctcccct gcacaggag aagaatgatt ctgacacttg 3973
 15 gggaccagcc ttcagtagct acccttggaa tgcctttgct ctcttctctc ctgtctaaac 4033
 aacaagaga cggagtctga ggcctcaaat tttcagttt atttaagcat caagttcaaa 4093
 ctttagaacc tgagcaaatg ttagtgactc tccattggtt cgtacctgga atgcgcatcc 4153
 20 ccacaggggc tttgttctt ggcttgctg tctgtgtca ccaagtgatg gccaaacggg 4213
 tggtgaaaga tgctgtgtag gaggaatcca cattgttaag aattc 4258

<210> 4
 25 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 4

Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15

35

Ser Leu Arg Pro Ser Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys
 20 25 30

40 <210> 5

<211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 5

Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala
 1 5 10 15

50

Gly Gly Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala
 20 25 30

55

Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp
 35 40 45

60

Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn
 50 55 60

Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys
 65 70 75 80

65

Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 85 90 95

ES 2 302 333 T3

<210> 6
 <211> 378
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(378)
 <223>

15 <400> 6

20	atg cat ctc tcc cag ctg ctg gcc tgc gcc ctg ctg ctc acg ctg ctc Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu	48
	1 5 10 15	
	tcc ctc cgg ccc tcc gaa gcc aag ccc ggg gcg ccg ccg aag gtc ccg Ser Leu Arg Pro Ser Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro	96
	20 25 30	
25	cga acc ccg ccg gca gag gag ctg gcc gag ccg cag gct gcg ggc ggc Arg Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala Gly Gly	144
	35 40 45	
	ggt cag aag aag ggc gac aag gct ccc ggg ggc ggg ggc gcc aat ctc Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu	192
30	50 55 60	
	aag ggc gac cgg tcg cga ctg ctc cgg gac ctg cgc gtg gac acc aag Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys	240
	65 70 75 80	
35	tcg cgg gca gcg tgg gct cgc ctt ctg caa gag cac ccc aac gcg cgc Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg	288
	85 90 95	
	aaa tac aaa gga gcc aac aag aag ggc ttg tcc aag ggc tgc ttc ggc Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly	336
40	100 105 110	
	ctc aag ctg gac cga atc ggc tcc atg agc ggc ctg gga tgt Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys	378
	115 120 125	

45 <210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

55	Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu
	1 5 10 15
60	Ser Leu Arg Pro Ser Glu Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro Lys Val Pro
	20 25 30
65	Arg Thr Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala Ala Gly Gly
	35 40 45

ES 2 302 333 T3

Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ala Asn Leu
50 55 60

5 Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys
65 70 75 80

10 Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
85 90 95

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
100 105 110

15 Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
115 120 125

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65