



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 005**

② Número de solicitud: 200930437

⑤ Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **10.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.01.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Hotter Corripio, Georgina;**
Viñas, José Luis y
Sola Martínez, Anna

⑳ 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 reperfusión 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 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de anhídrido carbónico 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 anhídrido carbónico 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.

40 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 (Brody *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 anhídrido carbónico 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 anhídrido carbónico 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 anhídrido carbónico 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.

ES 2 351 005 A1

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.

5 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.

10 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%.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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).

45 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.

50 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.

55 “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.

60 “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.

65 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,

ES 2 351 005 A1

- 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 eucariotes, 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 procarionte 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 procarionte 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”.

ES 2 351 005 A1

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

ES 2 351 005 A1

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, aminoglicósidos 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.

ES 2 351 005 A1

El FRA asociado al daño causado por isquemia-reperusión 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-reperusión 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-reperusión 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-reperusión 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.

10 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 +/- 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 +/- 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 +/- 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 +/- 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 +/- 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.

40 Ejemplo 1

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

45 Materiales y métodos empleados

Modelo in vivo de isquemia reperusión 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 reperusión, 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 µg/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 reperusión, los animales se estabilizaron bajo el control de un veterinario. Pasadas 24 h de reperusión, 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.

ES 2 351 005 A1

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+Az: 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.

Western blot

40 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.

50 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.

55 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*

5 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
10 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.
15

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

20 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
25 en el tejido sano (grupo control+CAII).

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

30 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.

35 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)*

45 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 estreptomina) 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.
50

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

55 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.

60 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

65 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

ES 2 351 005 A1

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

5 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.

10

Actividad de Caspasa 3

15 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 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.

20

Análisis estadístico

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.

25

Resultados obtenidos

Análisis in vitro del efecto de CAII sobre la regeneración renal

30 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.

35 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.

40

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

45 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).

50

55

60

65

65

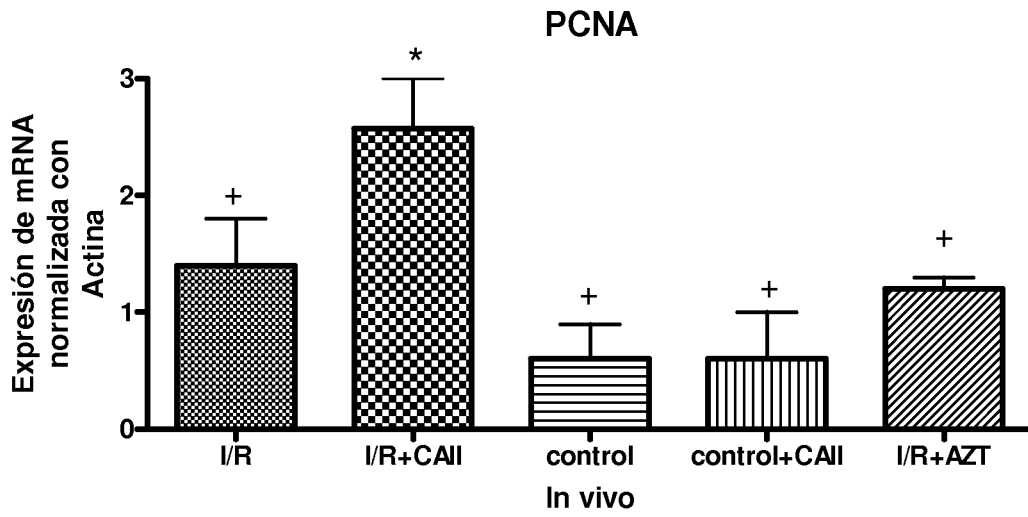
ES 2 351 005 A1

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.
- 25 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.
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.
- 45 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.
15. Uso según la reivindicación 14 donde la toxina es cisplatino.
- 50 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.
- 55 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.
18. Uso según la reivindicación 17 donde el órgano es el riñón.
- 60 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.
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.

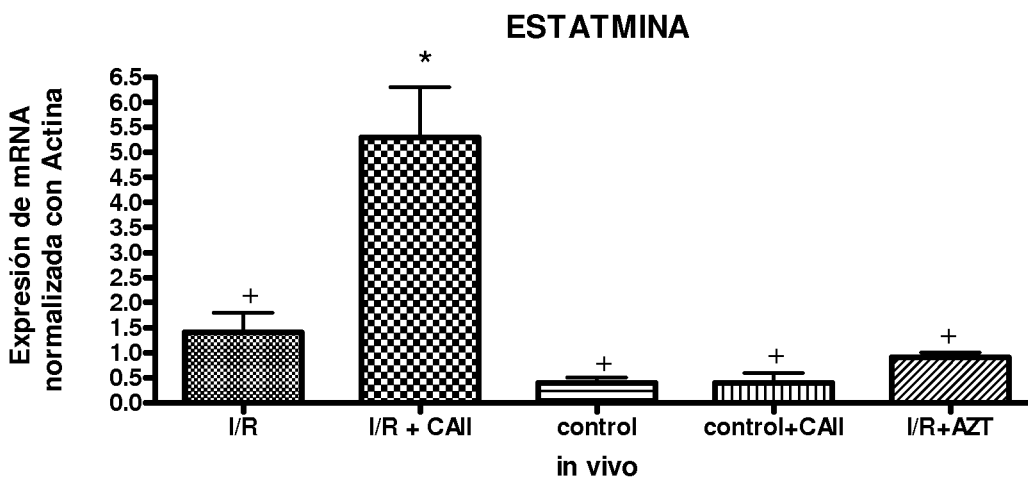


FIG.2

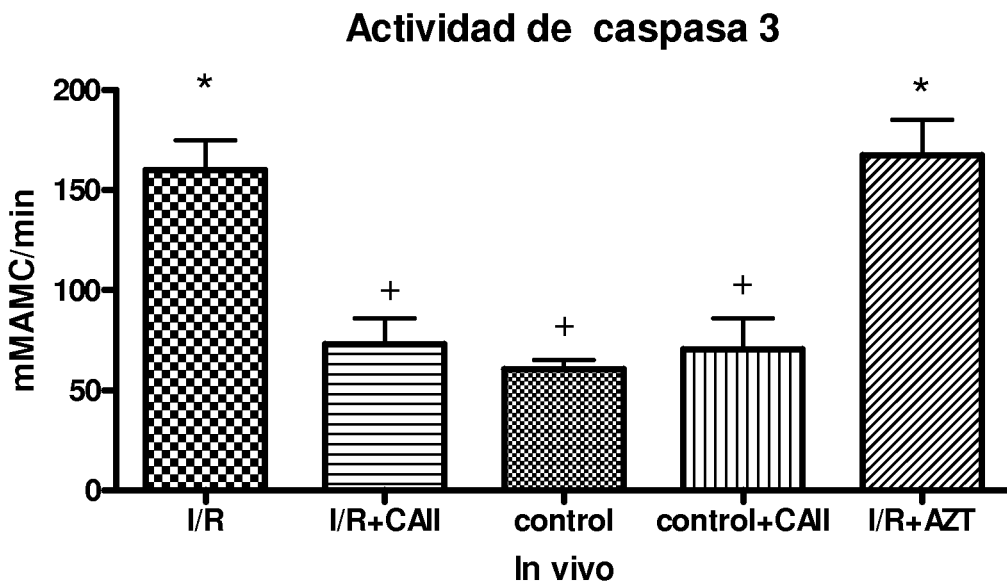


FIG.3

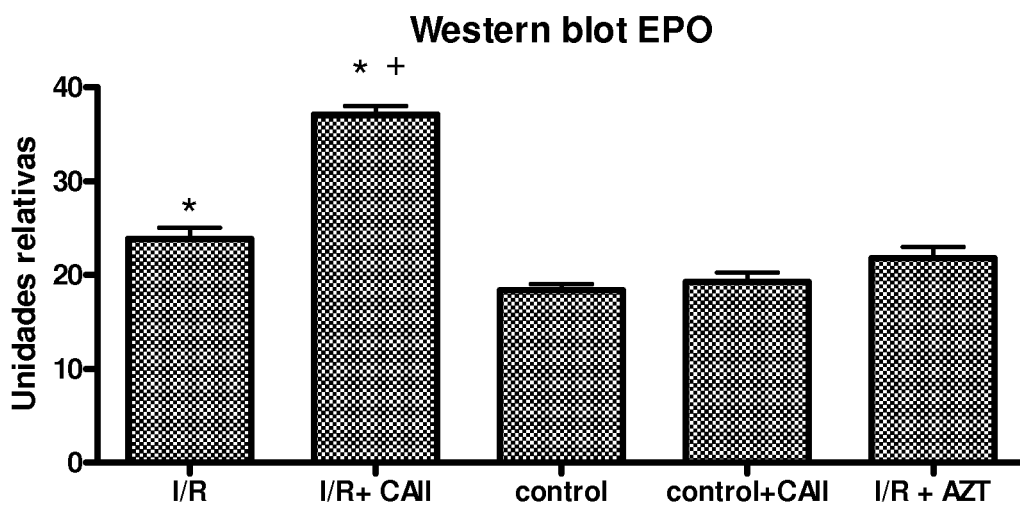
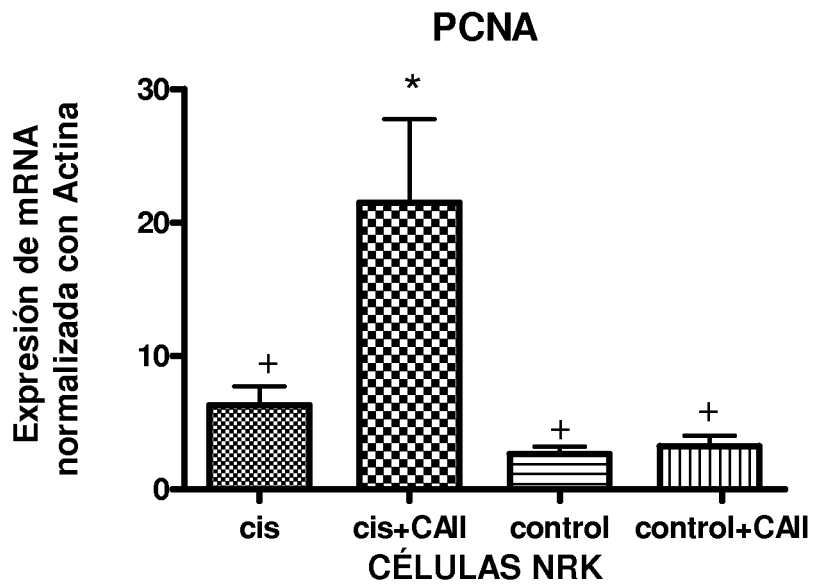


FIG.4

A.



B.

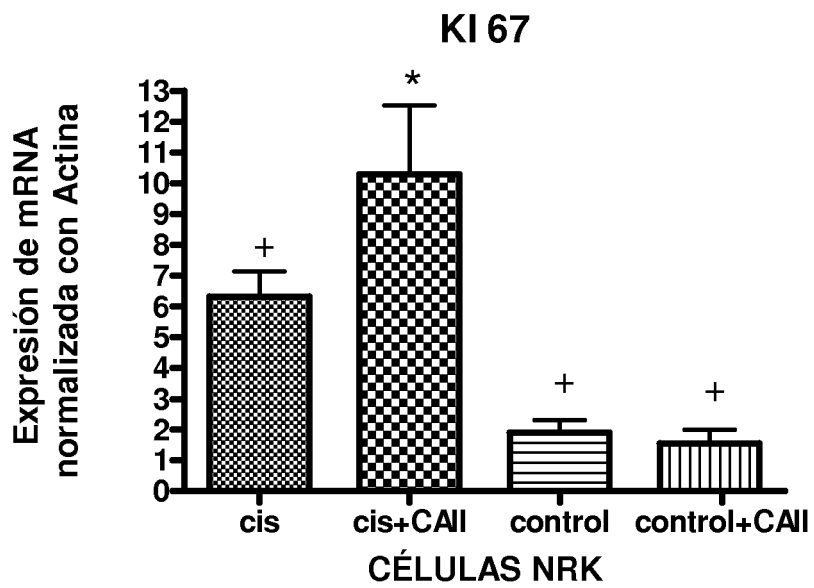
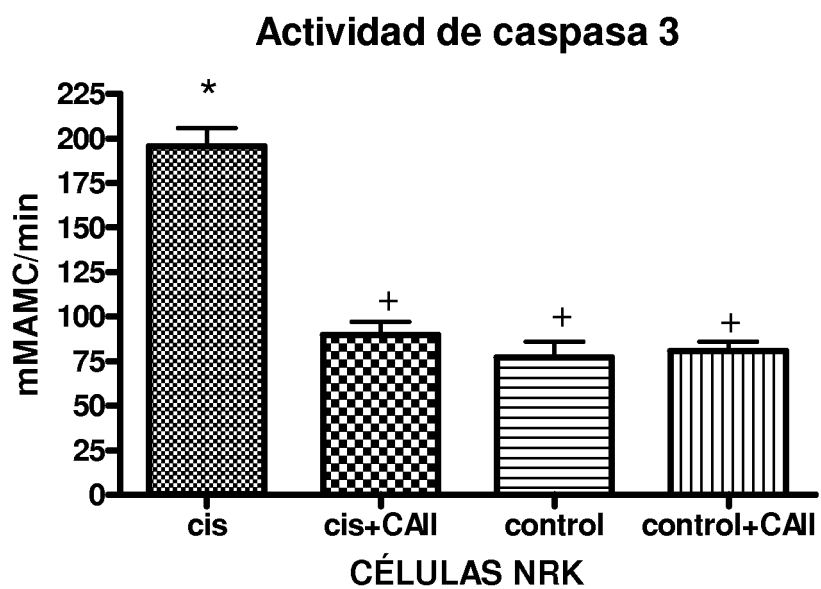


FIG.5



ES 2 351 005 A1

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

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | 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 | aagtctcttc | | | | | | | | | | 180 |
| 35 | atctataaaa | taaatagttg | gaccaggtaa | cctccaaact | tcttttaatt | ctacaatgat | | | | | | | | | | 240 |
| | atattgtttg | ggtttgtatt | atattcctccc | agcacataat | atacctgtgc | ataagccact | | | | | | | | | | 300 |
| 40 | ccctagtggc | ttccctgctc | aactagtata | aaatcctttc | ttgctatcat | tgtctgcaag | | | | | | | | | | 360 |
| | gctctgcagg | ctgtagcccc | tgactgtctc | tgactccact | acttgtcttt | tcttctcag | | | | | | | | | | 420 |
| | tcaccatgct | tcagtcacaa | gcttttctgt | tctagaaact | tcctttctca | gggcctttat | | | | | | | | | | 480 |
| 45 | acttgctggt | 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 | atggtgatct | 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 | acaagctag | taaattaacc | cagattcaaa | accaacctaa | tttcagcaca | atggtatttg | | | | | | | | | | 1140 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| | ctaactataa | tctgtaacaa | aattatttac | taacttctgc | aaagtgaaac | tgccattatc | 1200 |
| | tccatttggg | tttttcaaag | tttataat | caaggagtac | tatgtgagta | actactatat | 1260 |
| 5 | gtatcttggg | actcaggcta | ggtaaagggt | actaggtgcc | taagatacag | agataaataa | 1320 |
| | tgtgacacag | tactcaactt | cagggggcac | agtttaggaa | gaaaaacata | agcgtggtag | 1380 |
| 10 | aatggacatc | tccatgacct | aaacactcct | ctgtcctctc | acaaaaaaaa | acaaaacaaa | 1440 |
| | acaaacaaaa | aaacacctcc | tgctgtggag | actcattcct | cttaaagtgt | tcccatgaac | 1500 |
| | ctggcccagg | tgtttaat | tgcatcctt | aaattatatt | ctaactgttt | agcactgtct | 1560 |
| 15 | aggagggact | gaatagccat | catttactga | gtgcctacac | gtgacaggtg | atztatctat | 1620 |
| | gctcactgac | tgaattctta | caacaatgag | gtgagtgtca | ttattcctgc | tttacaatg | 1680 |
| | agcagtcaac | agcttattgg | ggcattggat | tataacccaa | tgattacaat | agagtgtctg | 1740 |
| 20 | attacaatgc | agaattgcc | atattaggat | agaaggatgt | gtatgcaaag | acctatggga | 1800 |
| | gccccaaaga | acaaatggct | cttggccttc | atagatattt | atattttttt | atattgtttg | 1860 |
| 25 | agacagtgtc | ttcctgtttc | ccagtctgga | gtgcagtcgc | atgatcatgg | ctcactgcag | 1920 |
| | cctcaacctc | ctgggttccg | atctgccgac | cttagcctcc | taagcagctg | ggactacagg | 1980 |
| | ggcacaccac | catgcctggc | taacttctta | ttttttgtaa | agatgggggt | ttgccatggt | 2040 |
| 30 | gcccaggctg | gtcttgagct | cctgacctca | agcgatccgc | ctgccttggc | ctcccaaagt | 2100 |
| | gctgggatta | caggcgggag | ccactgagtc | cagccccaga | tatctactta | aacactataa | 2160 |
| 35 | tgtaacaaa | tatgagaata | tctggctttt | tattagcttt | ttaattaaat | atttaataaa | 2220 |
| | taatgtgat | ctcaccttgt | aaaatatttt | aacaatatct | ttacattttt | tgagaaaaag | 2280 |
| | caaatacttt | caacttttta | ctaagaataa | tatgttagaa | gcttttttat | tataataatt | 2340 |
| 40 | ggaacacaga | ctttaagttt | ttttacatta | cattttcctg | atatactgcc | tgaatttttt | 2400 |
| | tttttctggg | gcaaagaaaa | gtacttttct | taagctactg | tcagttcctt | tacttaagat | 2460 |
| 45 | tattctgaaa | tgaaccatc | 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 | aaccaaaggt | 2760 |
| 55 | gaaccactct | ccaccctgtg | gtgaacatgt | gacactctcc | ctaacagcag | ctctgtgggg | 2820 |
| | agggcttgct | cccactgaga | attaattcac | ttccagaag | tgagagataa | ggaaaaattc | 2880 |
| | ccatgacaat | aatccatttg | gtgaactgca | gtttgggtgt | gtttgaagtt | ttacgcatat | 2940 |
| 60 | ttaagaatca | aacatgctct | tacttcatcc | ctgttaggaa | agccacaatc | cagtttcacg | 3000 |
| | gaaaatgaaa | gacaaggatt | cctgctgatc | aaatcgctg | gctccctcca | cagaatcccg | 3060 |
| 65 | ggaagccact | ctacattcac | aaactttgca | ctcaattcct | ggcacctatc | aacgccatat | 3120 |

ES 2 351 005 A1

| | | |
|----|--|------|
| | ctccagggcc aagtgaagag tctcatagca actaagttaa tatttgaaaa ttatgtaaag | 3180 |
| | aaacaaaatt acatcaatgg gcccacacag atacaatgca cctacagagg cacaaataaa | 3240 |
| 5 | agcttcttct ttgctacaaa ctccattttg taatggtcct aaaaatttaa aaactttatt | 3300 |
| | gctgctttct tgcctaagaa ttccctgtga catcaaccca aaaccacat aagcagaagt | 3360 |
| 10 | acacaatfff ctagaatcft agaacaagta agtctaaaca tgaatcatat ttgtttggat | 3420 |
| | gaaattgact gaaataaata gtaaagagtg attttgagat acatattgca aaaatgtcca | 3480 |
| | ctaataactt atccttgtat ttatctgtat attttcaaag gtaagtaatg tgatgtcaag | 3540 |
| 15 | gccgacacaa tcacattaa ctgtgtcctg cttccccaac tgtaactcta atactattgc | 3600 |
| | cctcagagat tgcagagacc acagaaccga actccttccc acaaaccccc ggatttttct | 3660 |
| | gtggcaaaat cccttgtagg aaatgaattc tctctatatc tcaaaacagc ctcacttacc | 3720 |
| 20 | cagtaggccc tgtaagcaca gtgtctcagg tccacaatac ttttagatgc ccaggaaaat | 3780 |
| | gtttcctttt aaaataagaa caaaaaagaa aaaaattagg tgttggttaa agaaaatggt | 3840 |
| 25 | taaatatata atattaagat atttatcttt atgtcagtgt tggataaat gcgtgtttat | 3900 |
| | gaaaaagggg cccaccaagg tgaaatgccg taggaccac aaatgcata atgctggctg | 3960 |
| | gcctcaaaat gtccttctta ttaactatt ttgaatgatt cctaggtatg ccagatgcca | 4020 |
| 30 | atftttcttg gccagccagg gaacgtctca tgtctttgga agaaattatc tttctcttac | 4080 |
| | tggattcttc tgagaaaagt gatttgtaa aagttttggt tatttcaaat caatatgtac | 4140 |
| 35 | tcaactagga cgtctcctca cccacgttaa ttttttaaag aggaggaaaag taggagaaga | 4200 |
| | tgagcgcttc atgtaaggct ctgccagcct acgaggaaaat gcaatcctcc aggctcgccc | 4260 |
| | gagcgtgggc tgcgggcagg ggactgtggg gccgttgtct cgttttattc cacggccgtg | 4320 |
| 40 | cagcagaggg cgcgtgcctc tcagcactca tgctgcgcgc tcccctgcgc ctctaggatc | 4380 |
| | gtatccctat ttgcccacag gtcatagctc ctaaccacagc ttgccagccc caggccgggg | 4440 |
| 45 | acaccagaga ctgagccctt cgcgctggag accccggcgc ggggtggggcg ggagggctcc | 4500 |
| | ggggccaaga gacaggtcac aatggggaca ggggacgaaa ggcgcccggg gtccgggtcc | 4560 |
| | cgagcagtcc ccgccgccgc cagactccgc agccgggagg gggatgggggt gcgctagag | 4620 |
| 50 | gctccgcggc ccgggttgga cggaggagcc caggagccac cgcagccgcc gcacgcccag | 4680 |
| | agctccgagc ttcgctgcca gcccaggaca ccggggccct gccgtgggcc gaggggagcc | 4740 |
| | gggcggcggg agaggagccc cggagccccg gagccccgga gccccgccgg gcgccagccg | 4800 |
| 55 | agagggcggt ttccccgccc ccggagactc gcccgcccg cccgccccgc cccgagcgcg | 4860 |
| | gggagttcac ctccgccgt caccacctc ccttgtcgcc taggtccacc cgagccccct | 4920 |
| 60 | ccccgggcc gcccccgagc acgaagttgg cgggagccta taaaagctgg tgccggcgcg | 4980 |
| | accgcggac acacagtgca ggcgcccac ccgccgccgc cagatcggtg ccgattcctg | 5040 |
| 65 | ccctgccccg accgccagcg cgaccatgtc ccatcactgg gggtagggca aacacaacgg | 5100 |

ES 2 351 005 A1

| | | |
|----|--|------|
| | tgagtgccgg cgacggccag cgcgggggcg ccccgatccc cgatccccga tccccgatcc | 5160 |
| | ccgagcccgg atgccggccc ggggcccgca gcgcccgcac atgctgttta ccgcgccgc | 5220 |
| 5 | ggggagtgct ggaggctcag gtgCGCCCCG ggcgctcgct ccgctcgcg ctccgCGGCG | 5280 |
| | ccggggatgt cccccttgcc ccagctgca ggccactgtg gaggaatccc cgcgtccgcc | 5340 |
| 10 | ggaggcgcgt agggcccag ggaggggagg cgcagccctg gccgCGGGAC ccgaggacag | 5400 |
| | tccctcccgg gtcccgaacct ggggatcatt ttaaccggac ctaggaggag gcgggaaagg | 5460 |
| | gttgtaacgg aaaattctag ttgttgatcg cagagaaatt aagagactcc cctccccct | 5520 |
| 15 | ccccacctt ccacccccac cccaccctc cagcttcagc accacctgtg gctaaggcgc | 5580 |
| | tcagcacgaa ctgtcccggg gcattttcca gtgctggttt gaatccatgg ctctgatttc | 5640 |
| | cgagttttcc cttcatctct cgacttctaa tgtaggggg tcggacatca ggaatcgggt | 5700 |
| 20 | tttatcttgg cctcagatct ggttcttcgg agccagcgga gcagaggagc atgCGTCTGG | 5760 |
| | cgcacctagc gcatctttgg aggggtgtggg gcttcccagg tagtggggaa ccctgacggt | 5820 |
| 25 | taaaggTGGG gtgggcccgg gcctgggCAG tgaggaaagg atccagacct cttgaatgt | 5880 |
| | cttaagtGAG cttgcatatc caaaatcgc aaccacaagc cctgacatta gtgtctgccc | 5940 |
| | gatttcagtt gctgaatttc agtaaaacga ccttaaaata gctaataattt atatagcact | 6000 |
| 30 | cagtGATCTA agagctttac atatatcgat tctaattctt acagcgacat ctatgaggta | 6060 |
| | gatttctaata tatcccatat tacaatgtg gaaactgagg cacagattac gtgttttccc | 6120 |
| 35 | aaaatttagc ccattgttaa gtgatgctt taaaattgga actgagcaga ttggctccgg | 6180 |
| | aatgattgct cttctctagg ggtctgggtg tacctttccc cacaatggg gattcacatg | 6240 |
| | tcttctttcc cccaggacct gagcactggc ataaggactt cccattgcc aagggagagc | 6300 |
| 40 | gccagTCCCC tgttgacatc gacactcata cagccaagta tgacccttcc ctgaagcccc | 6360 |
| | tgtctgtttc ctatgatcaa gcaacttccc tgaggatcct caacaatggt catgctttca | 6420 |
| 45 | acgtggagtt tgatgactct caggacaaag 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 aataactgcg atatgcctgt gaaaaatcac | 6720 |
| 55 | aaaaggTgca aagtcccctc gcaataaaga tcagtcacga tgagatttgc accaattgaa | 6780 |
| | cttttaagat tgtaaaatat tttgtcttgc agagctgatg catatccatt aaaaagtata | 6840 |
| | tcttagtgag cttatcttc aagttagcag cgagaagagt acaaaaaacg tgccaattta | 6900 |
| 60 | aaatactgaa attctgggaa aatgttttac ttatgagtat ttcttagtat tgggctagtg | 6960 |
| | tgataaagat ggcagcatgt tttgatatct actcagaaat tcatttcaca aacgaagatg | 7020 |
| 65 | tttagagtt ggtgaacata cctggcccat tactgacaaa accaattacc gtatttattg | 7080 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | gtaatagagc | tgtttacagc | atgctcactg | taaaaaaaaa | aaaaaaaaaga | aagagaaaga | 7140 |
| | agaaaaaaaa | tcctgctttt | ttttttttat | ctctctctct | tttgaacaa | gagaacaatc | 7200 |
| 5 | ccattcacac | atagtagctg | ccttccttgc | taagcagtta | atttaattgc | cagtgcccta | 7260 |
| | ttttcctgag | tgctttcctc | tgaaggatcat | agaatgaaat | ggtgctgcaa | acacattttg | 7320 |
| 10 | tttggtggtg | gtgtgggagt | gaggggagtg | gtggaacaaa | atgagaaagt | tttgagtag | 7380 |
| | tgacctacgg | tactaatata | ttatataata | tgtaattata | accatttagt | caggtagact | 7440 |
| | attccttgtc | agcagctatc | ctatatagtc | aacttggttt | tgaaaaaaga | attccttcct | 7500 |
| 15 | cctttcaact | ttaaaaaaaa | ttgcaaacac | ctggctttct | gaaatggtga | ttctggaaga | 7560 |
| | caatttgatg | ggggataatg | tggagatcat | ctgagaaatg | ttttcaacct | acctgtgcct | 7620 |
| 20 | gtctgtgtgc | accctcccc | agtacacaca | tacatacata | catacacaca | cacacacaca | 7680 |
| | cacacacact | tacaatcata | ctcacacttt | ctggcatagt | atgatgattt | attagaatca | 7740 |
| | agtaaagggt | gtacattgaa | aacagttcgg | tgattctgct | acattgcttt | cccaagcatt | 7800 |
| 25 | cctctcactc | caaaggaaca | gtgctcatat | aattaaatta | aacaattttt | ttcttgtaaa | 7860 |
| | gaatactgta | tatttataac | aagacaaggc | caaaggtctc | aaggatttac | acatacagaa | 7920 |
| | agaatactat | aacatttcac | gtctagtcat | 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 | atagtgaaat | aaattattct | agtaatatgt | attactggaa | agtggatttg | 8220 |
| | aacacatggg | ctgggtggcta | tcagcataga | ctggggctcag | agagacctgg | atgtgagttc | 8280 |
| 40 | tagagctgcc | ggcaactagc | tcagagactt | tgggagtaat | actgtctagg | ttttaattgt | 8340 |
| | ttttaactgt | aaagttggag | taacaatagt | gtctgccaca | gtggaaggat | gaaatgggac | 8400 |
| 45 | agtatatgta | aagcccctag | cccagtgctc | ggcgcataga | agttgctcaa | taaatggcct | 8460 |
| | ctgtttgtgt | cacaacttga | acccttcgac | cacctctggt | agaccattgc | tgtagatggt | 8520 |
| | gcacctgcca | taagatttct | gaataaactt | tttctttaac | agctttaaga | ttagttccca | 8580 |
| 50 | tcattttgatg | tatttttaaat | 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 | cagggtttcg | gtaggagctc | ccacctatgc | ctttagagac | 8880 |
| 60 | acatgtatta | tccacctagt | tctacaaaaa | agtcattatt | aacaccactt | aaatgcatgg | 8940 |
| | gaagctaagc | atcatgaaag | caggggtggag | gcctggctcc | tctcctgttc | ccgggagccc | 9000 |
| 65 | atgctggaaa | tatctaaagt | agaaagacat | agaaatagta | gaccctgact | gccactttga | 9060 |

ES 2 351 005 A1

| | | |
|----|--|-------|
| | 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 tttgcatatg aaagattcct ttgtaatttt gcctctcttt tccacatttt | 9360 |
| | cagttacttt ggtaaaca gaatgcagaa tatattaaaa tgtcaatatt aagagaaaag | 9420 |
| | acatctacag aataaatttt taaaaatcat accatgtggg ggacaggcac ggtggctcac | 9480 |
| 15 | gcctgtagtc ccagcacttt ggaagactga ggtgggcgga tcaactgagg tcagaagttc | 9540 |
| | aagaccagcc tggccaacag ggtgaaacac tgtctgtact aaaaatgcaa aaaatgagct | 9600 |
| 20 | aggtgttgtg gcatgtgcct gtaatcccag ctactcagga gactgaggca ggagaatcgc | 9660 |
| | tggatcccgg gaggcggagg tcgcagtgag ccgagaccgc accactgcac tccagcctgg | 9720 |
| | tgacagaacg agactccatc tcaaaacaaa caaacaaaaca aaaaaccaca cacacacaca | 9780 |
| 25 | cacaaaacca tgtggaaaaa ctccccttag actttctttc tttttttttt ttttaaataa | 9840 |
| | aacaatccta ggctctcaaa gccaaaacaa agaatagaga tactctagtt aaactcacct | 9900 |
| | taataaacat gaagaaacag aagctgaaga gtttaaataa cttgctaagt cgtctccttg | 9960 |
| 30 | ctagtttgct ggagggacta agtagcaatc acttaaaaaat agaattttga ataaaaatat | 10020 |
| | ttgaaggata accttatttg acatttagtt tatacatacc atgtttttta aaagctggca | 10080 |
| 35 | tttttttctg tacacaagtc aaaagttat ttatttttagt cacttaattt taaaaaatcg | 10140 |
| | gcagtttaac atctcttttt attaggagtt atttttgtgg tggtaacatt ttagatttc | 10200 |
| 40 | ctatacctct tatttcctgc attttaaagc agttcattta cctgtcttct ttgcctcaat | 10260 |
| | gagatttcag ccttctagaa cttctcatag attgaggttt tccaatatgc tttaaatggt | 10320 |
| | ctcttatatc caaacttaag aacttgggta tcaggaactg agcgggttga ctttattgct | 10380 |
| 45 | gatttaagct tgagagaatt ttttaaacta cggagttaat aggatttaac tagaaacttg | 10440 |
| | ggttagagct ctcatcaatc ttctaaattc ctttgaaaat aagccacat 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 acccattgct | 10860 |
| 60 | tgtatgacgt aatggatctt catacatgga tcctgcttga ctttcagga cttgcttttg | 10920 |
| | aagctctaaa agttttcttt cacagcagtc ctaagttaaa agaaagcata acaacaaatg | 10980 |
| 65 | aaagggcttg tcatgcacgc agtaatggtg tcagccgaac cttaaataatc tagaaaatgg | 11040 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | accaacatat | tctaaacact | gtagttacta | tattcacatc | aaaacagctt | ctttttttac | 11100 |
| | tcctatataa | ttgccacata | gtttaaacca | cgacttctgt | tgaatttcaa | ctgtgtttac | 11160 |
| 5 | tctagcgaaa | gtgacagcta | aacatcttat | tgctttaaaa | caaatggaat | acgtgtattt | 11220 |
| | tttcccccca | gatttgtcta | tattggcacg | tagccctagg | attattggct | gctgccaaca | 11280 |
| 10 | ggcaaaacag | taatgcatga | tttaaaatth | ttcaggttat | ttatagaaaa | gatggtaccg | 11340 |
| | aaaatgacat | gttttctgta | gaattaatct | tttgctttat | tagtaggaaa | tcattttaat | 11400 |
| | tttattttta | aactaaagat | tactgggact | agtttattta | tattttggac | ttaggagaaa | 11460 |
| 15 | ctgttgacat | tcattacggt | ctttagtctg | ttactccagt | gcatcttaat | ttagtttaag | 11520 |
| | tgattagggg | gaaaaaatta | aaaaatatta | aatgttcagc | ttttaatttg | tataagtaat | 11580 |
| 20 | gtgattcatt | tcaatattac | tggatttctt | atthtttctca | aaaagtaatt | tatataatth | 11640 |
| | cctcaaataa | tatgtatag | aagaaagatt | attctataac | attatactta | gtgcttgtht | 11700 |
| | tgtgtttatat | acagagtat | tataattgat | gacaatcat | aaaattaaaa | ttggctggag | 11760 |
| 25 | ctcttggtgt | tgagatttga | atthaaatta | aattgggggg | ggtcttgaaa | aaaacattag | 11820 |
| | agtagaaaac | tgtatttat | tctccatccc | tcacagaacc | catttctggg | gtacaatgaa | 11880 |
| | tcattgactc | tttaagcac | cactgccatg | gctggattth | acagagaaaa | aataggcagt | 11940 |
| 30 | tagcaatthc | tgctatthtt | taaaattatt | tttacattag | aaaatagatt | tcattthtaa | 12000 |
| | ctgcaacagt | ttagaaaatg | gcatgtagtc | atthaaataa | ataagtagat | ccagaatata | 12060 |
| 35 | gcataaagtc | cctaacttaa | accaagatat | tatgtthttat | gthttctcaa | taaaaagtht | 12120 |
| | gagthttatg | caatthatta | taacaatgth | thtgaaggac | thcattgact | aaactccatg | 12180 |
| | ctaagagtht | gccagaaatg | ctgccttctg | tagcaagtaa | actthtaagga | thtaataaca | 12240 |
| 40 | thtttctagth | acagtgggth | tctaactthc | ataggaacaa | gthttattht | aacaggggct | 12300 |
| | aaaacaggta | tctggtgata | acagattagc | actgaatgtg | thtaatcatt | gagcccagag | 12360 |
| 45 | cactthtatct | thttthttth | ttagtgthtag | ctgthtagcaa | gtattgtthta | ctaaaggtht | 12420 |
| | gcacacactc | ttgcctaatt | ctaaatgtht | ttagaaacaa | attaagatga | aaactthtaaga | 12480 |
| | thtgthtagag | aaagaataag | aaacagcaat | aaactthtatt | ctcctthaaaa | tgtaagatcc | 12540 |
| 50 | tgctatgatt | cttactggg | gggaaagaag | atacatttag | aaaattggth | atctcagatt | 12600 |
| | cttagtatgg | thtttagthtag | ttagthtttac | cacttggtag | agthtaatgat | thgacaaatg | 12660 |
| | acatthtgctt | cttattatca | gccagthggth | tgctagctth | aaagagthtat | tataaaggat | 12720 |
| 55 | thttthtcagth | atthaatthtat | thcataaaca | tataththtaat | thttatataat | tattatgaaa | 12780 |
| | aaagggaaatt | atthcattct | thttthaaaa | agtctagaat | tagaggctaa | tatttcctta | 12840 |
| 60 | tagaattgtc | aggaaacaaa | ctgthtgthaat | aagthgthtt | tgtgthtccaa | gagatgtgac | 12900 |
| | thtgthtcagaa | tacatccaaa | thcataththc | ttagcagatc | thtaacataa | caccatthtat | 12960 |
| 65 | aattctthtct | gthtttcattc | thcctthttth | ctcctggcct | atthgthaaagc | agatctggca | 13020 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | gccagaggtt | gtatcaggaa | ccacagaaaag | accccactgc | ttaaataatct | tcaaagcagt | 13080 |
| | ctttcacttt | gaatagatga | atggatattg | ctaccatgta | aggatattta | ggtgaagctc | 13140 |
| 5 | atgaacaaaat | cttgttgtac | agaagttatc | cctttgttct | gcaatgccaa | agtaaatttg | 13200 |
| | ggctcattat | tttatggaat | tataaaagtaa | agctaataaa | atacacttat | agcaacaaaat | 13260 |
| 10 | gtttaattcc | cagtactaga | aaaataaaaat | ttaaattgta | gaactaaact | acttttataaa | 13320 |
| | gcttttgaat | atattgggta | aatcccatta | atacatataca | agttaggcac | agagtttctt | 13380 |
| | gggtgatgga | agaaagactg | atttcacact | attttaatcc | tctgtcaaga | cgcaacttat | 13440 |
| 15 | taattatata | cagatagttt | gtagccgatg | gatgtgattt | ttgttactga | ttttgcttaa | 13500 |
| | tgcagttaca | ttaatgccag | aatagtagaa | tcgtggaata | gttatcaagt | tagaatttta | 13560 |
| 20 | agttcttgga | gataatagag | cacattacac | tgcatataga | agatgatcca | taaattatta | 13620 |
| | 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 | aattaagggg | 14040 |
| 35 | acaagactag | ccagcagcag | tgagagtcta | aattctaaag | aatttgggaa | gcctatataa | 14100 |
| | ggataattgg | attttgcaat | gttaagatca | atggaatact | gatttcacaa | attcgggtgt | 14160 |
| | ctaagaactg | gtatcagagg | ttagcaaaagc | aggctgtatg | gcagcaatcg | ggccttggtg | 14220 |
| 40 | gaagagaggg | tctcacgttt | gcaagtgtgt | gtagcagacc | aatttattgg | ccagtagctg | 14280 |
| | catgggcact | tcctaaatgt | ttcacagatt | attagtttca | cttagaattt | tctctctctg | 14340 |
| 45 | gacctgaatc | tatgactcta | aaacaaaacc | 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 | agatacatac | 14640 |
| 55 | atatatgtta | catatatata | tatgttttaa | tttttagtgct | caagggagga | cccctggatg | 14700 |
| | gcacttacag | attgattcag | tttcactttc | actgggggttc | acttgatgga | caaggttcag | 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 A1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| | ccatttgcaa | aaagtaaacg | gactcaaact | ggaggatcct | gttttaacag | aaatttagaa | 15060 |
| | ataaaatgtg | tgcccttctgt | caaaactgta | catttatttg | tcttagagtt | attgatgaaa | 15120 |
| 5 | acacttgctg | ttataccaag | tactgtgtgg | atgattagaa | ttaaaatgaa | aggaaaatth | 15180 |
| | tgatttaaaa | ttatccatat | tttcaatttc | ctgagtaacc | tttattgtga | gaaaaagacc | 15240 |
| 10 | attgaataaa | atctgtcagc | tttgattatg | taaactactc | actgtggctt | tgtctcttcg | 15300 |
| | gccttagctt | cacttggttc | actggaacac | caaatatggg | gattttggga | aagctgtgca | 15360 |
| | gcaacctgat | ggactggccg | ttctaggtat | ttttttgaag | gtagttgat | gaccaattc | 15420 |
| 15 | ttttttttcc | ctatttttaa | taaagaatga | ccagacagag | tatttgtaac | atacaggaca | 15480 |
| | ttctacaaaa | gagcttagga | aatgcctttg | tccctgaaat | gttttcaagt | ttatctcctc | 15540 |
| 20 | ctttcatatc | tgctagttgc | agtggagatg | gagggcagaa | agacaatagg | agaggactt | 15600 |
| | atthggatcc | ttttggatgt | aaatgtgaag | aacataaaga | gatcaacttg | ggtgactgct | 15660 |
| | agggttttgt | ttgttttctt | ttcatttaac | ctgaggctag | acagtactat | attatgataa | 15720 |
| 25 | agtaagatca | ggttctgaag | aggggaagga | cagtgaatth | 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 | caaacaacaaa | aacaaaacaa | aaacaaaaac | 16200 |
| 40 | acaaaattag | ctgggcatgg | tggtatacac | ctgtagtttc | agctacttgg | gaagccaggg | 16260 |
| | caggaaaatc | actgcagcct | aggggttgag | gttgcaagtga | gctatgatca | tgccactgca | 16320 |
| 45 | ctacaagctg | gatgacagag | caagactctg | actctaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 16380 |
| | gcgagagtca | agagagatth | gggttgctgg | aaggcgtagg | gaaagccaaa | gaagaaaata | 16440 |
| | atthtttaaaa | agaaggggaag | 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 |
| | tcaactatth | gatgttttct | aatagagcta | cccaataaaa | aataaaaact | ggtacagtac | 16740 |
| | caactgggtg | atagtatctt | gccctttatg | tttttcttta | ggttggcagc | gctaaaccgg | 16800 |
| 60 | gccttcagaa | agttgttgat | gtgctggatt | ccattaacaa | aaaggtaaat | ttgaattttc | 16860 |
| | tgccacctcc | ttaggttacc | aattttcaat | actccattgg | ttttagaaat | ttcttttgat | 16920 |
| 65 | caaattgcac | agtctcaatg | acatgtgggtg | tttgatgag | cagttagtaa | aggtagaata | 16980 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| | ttacttaa | athtaatta | cgtttctttc | aacaagttg | atccta | tagcata | 17040 |
| | ctaagact | tatttatta | atcttgctcc | cccatcattt | ggacatccat | atgtaagagt | 17100 |
| 5 | cagagaat | tatgcctgca | aggaggttca | aaggtcctct | agtcaaatta | ttcactcatt | 17160 |
| | catacagcag | atatttgta | agtatgtact | atgtgccagt | cgctttgcaa | actagtagac | 17220 |
| 10 | acaatggg | acaagataaa | caaggccctg | tttcatggag | atcttctattc | tatgacctct | 17280 |
| | ttgcattcat | ccatcctgca | tttaaatcct | ctctgcagca | tagttgtggt | gaggtcggtg | 17340 |
| | agcatctg | taaacactac | agtcacttcc | ggatgatggg | aacttatcac | caggggcagc | 17400 |
| 15 | cctggcctta | taaagctgat | cttcacattg | aagcagcatc | tatcctctga | aatgctcact | 17460 |
| | cactggcctg | agccccttga | attcatagaa | taaacctgat | ctctcttcca | aataactcta | 17520 |
| 20 | ctctgtctct | actttgtttt | ttcacctacc | ccaaactaat | tatctttagt | ttcctttaac | 17580 |
| | tattctcata | tgatatagtt | ttctctcttt | gccaccacct | tgctattctt | ccagtaaadc | 17640 |
| | attcctgttt | gcttgaaaag | tgtagtgtcc | aaaacagaat | gtagttat | gattctgacc | 17700 |
| 25 | tagagcaaga | aatcacctc | ctcatcagga | taccatattt | ctgttattgc | aacttgaagt | 17760 |
| | cacctcattt | tagtggcagc | agtctcactt | taaatactgg | gtgtgatcag | ctaatgactt | 17820 |
| | aatggggaat | gtaagggatc | atcttagata | aaaggccaag | atgaaaaatg | gacatgtgaa | 17880 |
| 30 | aatagttttt | ttttttttt | actacgactt | gccacatatt | ttcaagttga | atgtcttctg | 17940 |
| | ttaatttctc | tttattttgt | ttgccagtga | atatagaacc | tcttttttaa | aaagtgtttt | 18000 |
| 35 | tgaccatcag | aggggagtat | acctatttgt | gtctgctgct | ctcctacctt | cctcctactc | 18060 |
| | tgtcaatgtg | atagtttgaa | gctgcgtatt | tgcttgttc | tagggcaaga | gtgctgactt | 18120 |
| | cactaacttc | gatcctcgtg | gcctccttcc | tgaatccttg | gattactgga | cctaccagg | 18180 |
| 40 | ctcactgacc | accctcctc | ttctggaatg | tgtgacctgg | attgtgctca | aggaaccat | 18240 |
| | cagcgtcagc | agcgagcagg | tttgttttgt | aatgacaggt | ctgtttacgg | gtggagcatt | 18300 |
| 45 | tagtcaaggc | agaagacctt | ggcctccaga | gtgagagaga | actgagattt | aatccttctc | 18360 |
| | ctgctacttc | ttgctatgga | aatagtgcct | ttgatgggtg | ctagcaaata | aacagcgttc | 18420 |
| | agtaaatctt | tgttgttatt | aactataaac | ttagttcggt | tagtctctaa | aattgaatag | 18480 |
| 50 | tcattgtaag | gattcaatga | gaaagatgtc | tgtcacctaa | taaatgcctt | ttttttttt | 18540 |
| | tgccagttat | gaggaaacta | aggcttagaa | aagtgagagt | tcatattcaa | ggttacgcag | 18600 |
| 55 | gtatcagtga | gttaccagcc | tactactcac | tcacataagg | gctttctgct | atcttattta | 18660 |
| | tatcagaatg | catttctgaa | tcctgcagaa | tgagagtcac | cccttgagaa | acatgtatct | 18720 |
| | atataaactc | actccaggtt | gcttttagagg | cttagagcag | gtattcttac | atctccaata | 18780 |
| 60 | aaatatagtg | tgtgatcgtc | aagtgattag | tgacagcttct | aagtcactga | tgagcagcca | 18840 |
| | ctaaagtgga | tacaaatgag | tttttcttag | acttacctct | tagcgcacag | ttgaaatgta | 18900 |
| 65 | gaaagtgaac | attccttagg | attcacaaga | ggatggatcc | tgaataat | aaggatagct | 18960 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------|
| | ttaggagcca | acagtcttga | aaatggtaac | tatgtgagta | gtggtagtgt | gatttaaacc | 19020 |
| | tacaaaaatg | ctgaataata | gaggtttaga | gctgcaatgt | gcaatagaga | tcatgttgtc | 19080 |
| 5 | caactttctc | atcttactgg | cttgaatcac | attgatcaac | agtctgagat | gcaggaaaat | 19140 |
| | tgaagtgttt | tccactcagc | taccttgcaa | cagaatcagg | cctgggagca | aggattctat | 19200 |
| | tcctgtgtcc | tcccttagaa | tatgaactta | tgaatgctga | agatacttca | tatctttctt | 19260 |
| 10 | taaaggaaat | atgtatctga | ctggaaaatt | acttgtagca | tatcaaagtg | ggcctaaaaa | 19320 |
| | atagcatgct | tggtatgtca | cttgaagatt | gaccttgtag | taataacata | tttgagtaag | 19380 |
| 15 | cttcttgaag | tgtagcgtaa | ggaaagatta | taatgccctt | ctttttgtag | atgcagtggt | 19440 |
| | tacattataa | tttaaaacat | gaatTTTTTT | ttcttctttc | actgagagca | atgcaacttt | 19500 |
| | aaagcaatag | tctgacattt | agagccatta | taacaaatgg | atztatgggtg | tatacacacc | 19560 |
| 20 | cacaggcaga | aatacacata | tagataaggg | cagttgaacc | tactgcatta | atccctgtac | 19620 |
| | cctgagtttg | ctctttaaag | ttgaaagtgg | tattaaacta | atgatgttaa | ttgtatatat | 19680 |
| 25 | tggcaaaata | ccaatagggc | tctTTTTTTT | gtcctataac | atggaatctg | gaggaaggat | 19740 |
| | catgctcagc | tcaggaagct | agggctgcag | gtcctcctct | atctgagtcc | cttgacttgg | 19800 |
| | ccttgccaat | tggtgacttc | 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 |
| | gcgtaggatt | taggtaagca | gtataaatgg | gtctgctaata | tctgctacct | ttattttcta | 20160 |
| 40 | taccaggct | ctgtctctgt | gatgctaaaa | caatgagtca | agttgactaa | tgtgacagtg | 20220 |
| | tagtttaatt | ggtgcagtga | gtagcagaaa | tcggttatac | tggtttgatc | aaaagtttga | 20280 |
| 45 | cctgtttaca | ctttatgaac | agactctctt | tcagattgct | ggaattctgt | tgtaacgaat | 20340 |
| | caaccctata | tatccttaga | atgctccctt | gcattcagta | accatagctg | tgcatgttat | 20400 |
| | aatgtatgtg | catggaaggt | ggctctacgg | gggtgattga | gggactatta | ctggacaaaa | 20460 |
| 50 | gagatcaggt | taaaggctgt | tgattcatgg | gctgctatat | tactgtccaa | accacccttt | 20520 |
| | tgcatTTTga | tcacgtcttg | gttagagggg | ggaaagtagc | actTTTTgag | aaccttgaag | 20580 |
| 55 | aagtgggaga | ctgttcaaca | gctgcctgta | tctcagtggg | ggccagtaaa | ctgaaacaag | 20640 |
| | tttataaggg | aataaaaaatc | aaccagtgac | aaggggttct | aatgtttaat | gcatatattg | 20700 |
| | gcaaaatgcc | agtagggcta | tgtaggggtg | tgagcactca | caattgttca | ctaaaatgct | 20760 |
| 60 | gtttttaaaa | caggaaagta | gaatggttga | gtgcaaatcc | atagcatgag | ataaattgag | 20820 |
| | cttcttaagg | caaatcagcc | taggcaaatt | catttccgtg | tttttTgtgta | tttgagatg | 20880 |
| 65 | ccagctcgtc | actcagccca | tggagcttac | aggctctgat | cacttgatct | aattgtatgg | 20940 |

ES 2 351 005 A1

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | atgtggtagt | ttgtcttccc | tggggcagaa | aacaaagctt | taatttggaa | ctaaaattgt | 21000 |
| | tattatnttg | catctaaagg | tatgagttta | tagactnttg | atgntagatt | tttaaattag | 21060 |
| 5 | aaggctactg | aaaatttccc | ttaaaaatga | ccccaacgaa | tttgtgtatt | ttgtataaat | 21120 |
| | tggnttgnta | tattaaagca | tacatacata | atctatatgt | gattatgtat | tcattaggaa | 21180 |
| 10 | tcaaactgaa | ttttggccat | tgatgcacag | cactgaatgt | tgtggaatgt | aatntttgnt | 21240 |
| | tgntnttgnt | tctgntntnt | gaggcagagc | cttgctctgt | cgcttaggct | ggagtgcagt | 21300 |
| | ggcgcaatct | cagctcattg | caatctctgc | ctccagggnt | taaatgattc | ttgtgcctta | 21360 |
| 15 | gcctcctgag | tagctgagat | tacaggtgct | ctaccagcc | tgnttaattt | ttgtgtgtgt | 21420 |
| | gtgtgtgtgt | ttntntntnt | gtagagacag | gntttcacca | tgntggccag | gctggtctcg | 21480 |
| 20 | aattgctgac | ctcaagtgat | ccaccgcct | catgcctcag | ccttaciaaag | tgctgggatt | 21540 |
| | acaggcatga | gccactgctc | ctggccgggg | aatgtatnta | aagatataac | acaagtatat | 21600 |
| | aactgaatac | cattgtgaaa | cattaattat | caatgntnta | ttgtgtctnt | taggtgntga | 21660 |
| 25 | aattccgtaa | acttaacttc | aatggggagg | gtgaaccgga | agaactgatg | gtggacaact | 21720 |
| | ggcgcccagc | tcagccactg | aagaacaggc | aatcaaagc | ttccttcaaa | taagatggct | 21780 |
| 30 | ccatagtctg | tatccaaata | atgaatcttc | gggtgntntc | ctntagctaa | gcacagatct | 21840 |
| | accttggtga | tttgaccct | gnttgctntg | tgtctagntt | tctagaccct | tcatctctta | 21900 |
| | cttgatagac | ttactaataa | aatgtgaaga | ctagaccaat | tgctatgctt | gacacaactg | 21960 |
| 35 | ctgtggctgg | ttggtgctnt | gnttatggta | gtagntnttc | tgtaacacag | aatataggat | 22020 |
| | aagaaataag | aataaagtac | cttgactntg | ttcacagcat | gtagggatgat | gagcactcac | 22080 |
| 40 | aattgntgac | taaaatgctg | ctnttaaaac | ataggaaagt | agaatggntg | agtgcaaatc | 22140 |
| | catagcacia | gataaattga | gctagttaag | gcaaatcagg | taaaatagtc | atgattctat | 22200 |
| | gtaatgtaaa | ccagaaaaaa | taaatgntca | tgatntcaag | atgnttatatt | aaagaaaaac | 22260 |
| 45 | tttaaaaatt | attatatatt | tatagcaaag | ttatcttaaa | tatgaattct | gnttgtaattt | 22320 |
| | aatgactntt | gaattacaga | gatataaatg | aagtattatc | tgtaaaaatt | gnttataatta | 22380 |
| | gagnttgat | acagagtata | tttcattca | gacaatatat | cataacttaa | taaatattgt | 22440 |
| 50 | atnttagata | tattctctaa | taaaattcag | aattctattc | tgggntatnt | atntatntat | 22500 |
| | ttntattata | ctntaagntt | tagggatcat | gtgcaciaacg | tgcaagnttg | ttacatatgt | 22560 |
| 55 | atacatgtgc | catgntggtg | tgctgcacc | attaactagt | catttagcat | taggtatatc | 22620 |
| | tcctaagtct | atccctcccc | actcccccaa | ccccacgaca | ggccccagtg | tgtgatgttc | 22680 |
| | cccttctgt | gtccatgtgt | tctcattgnt | caattccac | ctatgagtga | gaacatgtgg | 22740 |
| 60 | tgnttgntt | ttgtctctg | tgatagnttg | ctgagaataa | tggntccag | ttcatccgt | 22800 |
| | gtccctacia | aggacatgaa | ctcatcctnt | tttatggctg | catagtatnt | catggtgtat | 22860 |
| 65 | atgtgccaca | ttntcttaat | ccagtctatc | atntgntggac | atntgggntg | gntccaagtc | 22920 |

ES 2 351 005 A1

```

    tttgctattg tgaatagtgc tgcaataaac ataggtgtgc atgtgtcttt atagcagcat    22980
    gatttataat cctttgggta tatacccgagt 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
    gaatggtatt gcctaggttt tcttctacgg tttttatggg tttaggccta acatttaagt    23640
25  ctttaatcca tcttgaatta atttttgtaa aagatgtaag gaagggatcc agtttcagct    23700
    ttctacatat ggctagtcag ttttcccagc accatttatg aaatagggaa tcctttcccc    23760
    atttcttggt tttgtcaggt ttgtcaaaat attctggggt attttattgt gtactgagtg    23820
30  gtgggtaata cagtaatgga ggaacaaatg tctactttta caattcacia taattcctta    23880
    ttaataatga gccatcttaa ttggcttact gataattgaa aaagtctcca gaaaaggaaa    23940
35  aactctggaa gtcatttact tattatgcca agtacggttt taagtgctgt ctgagcattc    24000
    atgtgatctt cctgacaatc ctatgaagat taatcctgca agagaaatga ttacattaa    24060
    agtagcaagg tagagaaggg ggaagagtgt gcacactgaa tcaatataag ccccttggga    24120
40  aaaaaataaa taaaagttca ttttattcaa aaaggggaatt ctagtgatat ccagaagtga    24180
    aagaataatt tgaattttaa aaagagaaat taagctgagc atggtggctc actactgtat    24240
45  tcccagtact ttgggaggct gaggcaggat gattgcctta ggctgggagt ttgagaccag    24300
    cctaggcaac atagcgaggc ttcactctta caaaaaatgt aaaaattatt tgagtgtggt    24360
    gttgcatacc tatagtcata gctatttggg tgtctcgggc 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

20

ES 2 351 005 A1

<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

ES 2 351 005 A1

| | | |
|----|--------------------------------|----|
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial Sequence | |
| 5 | <220> | |
| | <223> cebador reverso de GAPDH | |
| | <400> 8 | |
| 10 | tagcccagga tgatgccctt tagt | 24 |
| | <210> 9 | |
| 15 | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial Sequence | |
| 20 | <220> | |
| | <223> cebador directo de Ki-67 | |
| 25 | <400> 9 | |
| | agacgtgact ggttccaac | 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 TECNICA

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).