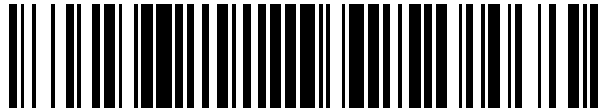


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 974**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2009 E 09772761 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2297205**

54 Título: **Utilización de la proteína IRAP para la realización de métodos de diagnóstico y de pronóstico**

30 Prioridad:

04.07.2008 FR 0803802

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER (100.0%)
621 Avenue Centrale Domaine Universitaire B.P.
53
38041 Grenoble Cedex 09, FR**

72 Inventor/es:

BOTTARI, SERGE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 453 974 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de la proteína IRAP para la realización de métodos de diagnóstico y de pronóstico.

- 5 La invención se refiere a la utilización de la proteína IRAP para la realización de métodos de diagnóstico y de pronóstico.

La proteína IRAP (Insulin-Regulated AminoPeptidase; EC 3.4.11.3) también conocida bajo el nombre de Leucina Amino Peptidasa Placentaria (P-LAP) y de Leucina-cistinil aminopeptidasa (L-CAP) es una proteína metaloproteínasa de zinc transmembranaria que existe en tres isoformas (Swiss-Prot: Q9UIQ6: 1, 2 y 3; representadas respectivamente por las SEC ID n^o 1 a 3).

Cuando está insertada a nivel de la membrana plasmática, su dominio extracelular puede ser escindido y segregado.

- 15 La parte segregada de una isoforma no especificada de la proteína presunta de ser IRAP se analizó en la sangre mediante un método enzimático utilizando un sustrato sintético no específico, la L-leucina-nitroanilida en presencia de metionina (Mizutani, S., Yoshino, M., y Oya, M. (1976) Clin Biochem 9(1), 16-18).

Utilizando este método, Mizutani, Oya y Tomoda han puesto en evidencia una cistinil-leucina aminopeptidasa en el suero de las mujeres embarazadas, cuya concentración aumenta durante el embarazo (Yamahara, N., Nomura, S., Suzuki, T., Itakura, A., Ito, M., Okamoto, T., Tsujimoto, M., Nakazato, H., y Mizutani, S. (2000) Life Sci 66(15), 1401-1410). Esta aminopeptidasa es esencialmente de origen placentario, razón por la cual se ha denominado P-LAP (Tsujimoto, M., Mizutani, S., Adachi, H., Kimura, M., Nakazato, H., y Tomoda, Y. (1992) Arch Biochem Biophys 292(2), 388-392) y corresponde al dominio segregado de la proteína.

25 Esta enzima degrada la oxitocina (Naruki, M., Mizutani, S., Goto, K., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Itakura, A., Mizuno, K., Kurauchi, O.; Kikkawa, F., y Tomoda, Y. (1996) Peptides 17(2), 257-261), la vasopresina (Wallis, M. G., Lankford, M. F., y Keller, S. R. (2007) Am J Physiol Endocrinol Metab 293(4), E1092-1102), la angiotensina II y III (Matsumoto, H., Rogi, T., Yamashiro, K., Kodama, S., Tsuruoka, N., Hattori, A., Takio, K., Mizutani, S., y Tsujimoto, M. (2000) Eur J Biochem 267(1), 46-52) así como una serie de otros péptidos (Albiston, A. L., Peck, G. R., Yeatman, H. R., Fernando, R., Ye, S., y Chai, S. Y. (2007) Pharmacol Ther 116(3), 417-427). Las concentraciones séricas de esta aminopeptidasa no se han citado nunca en el hombre ni en la mujer no gestante.

35 En el momento de su clonación, apareció que P-LAP corresponde a la proteína IRAP así como al receptor e la angiotensina IV (Keller, S. R., Scott, H. M., Mastick, C. C., Aebersold, R., y Lienhard, G. E. (1995) J Biol Chem 270(40), 23612-23618; Rogi, T., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Mizutani, S., y Tomoda, Y. (1996) J Biol Chem 271(1), 56-61; Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A., Simpson, R. J., Connolly, L. M., y Chai, S. Y. (2001) J Biol Chem 276(52), 48623-48626).

40 La solicitud de patente WO 2005/038462 describe un reactivo para el diagnóstico y/o una evaluación pronóstica de carcinomas que comprende un anticuerpo policlonal anti-P-LAP, obtenido por inmunización con la proteína P-LAP entera. Debido a la fuerte homología entre las diferentes aminopeptidasas, el anticuerpo no es aparentemente específico para IRAP y debería también reconocer otras aminopeptidasas. Por lo tanto, no debería permitir diagnosticar una patología relacionada de manera precisa a una modificación de la expresión o de la concentración plasmática de IRAP.

50 GLUT4 es el transportador de glucosa que permite la captación de la glucosa que circula por los músculos y el tejido adiposo en respuesta a la insulina. En unas condiciones no estimuladas (condiciones basales), GLUT4 está eficazmente retenido en el interior de la célula en unos compartimientos (vesículas) intracelulares, por un mecanismo de retención aún desconocido. En respuesta a la estimulación insulínica, GLUT4 es transportado y después insertado en la membrana plásmica por una translocación incrementada, permitiendo así la captación celular de glucosa.

55 La IRAP se co-localiza con el transportador de glucosa GLUT4 y es co-translocada con este de manera estequiométrica (Keller, S. R. (2004) Biol Pharm Bull 27(6), 761-764). Esta translocación hacia la membrana plásmica es estimulada por la insulina de la misma manera que la de GLUT4 (Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A., y McGraw, T. E. (2004) Mol Biol Cell 15(2), 870-882; Subtil, A., Lampson, M. A., Keller, S. R., y McGraw, T. E. (2000) J Biol Chem 275(7), 4787-4795).

60 Por otra parte, la expresión de IRAP condiciona la expresión de GLUT4 ya que en los animales transgénicos IRAP^{-/-}, los porcentajes de GLUT4 son reducidos del 50 al 80% (Keller, S. R., Davis, A. C., y Clairmont, K. B. (2002) J Biol Chem 277(20), 17677-17686).

65 En el diabético de tipo 2 se encuentra al mismo tiempo una reducción de la expresión y de la translocación de GLUT4 hacia la membrana plásmica en el músculo y el tejido adiposo (Kahn, B. B. (1992) J Clin Invest 89(5), 1367-1374).

Asimismo, y aunque los porcentajes celulares de IRAP no sean modificados, su translocación es igualmente disminuida en el músculo y el tejido adiposo de los diabéticos de tipo 2 (Garvey, W. T., Maianu, L., Zhu, J. H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., y Baron, A. D. (1998) *J Clin Invest* 101(11), 2377-2386; Maianu, L., Keller, S. R., y Garvey, W. T. (2001) *J Clin Endocrinol Metab* 86(11), 5450-5456).

Por otra parte, se ha mostrado una relación entre la proteína IRAP y el desarrollo de la quimiorresistencia a los medicamentos anticancerosos (Kondo C. *et al.*, *Int J. Cancer*, 118, 1390-1394, 2006). Según este artículo, la IRAP reduce en efecto la sensibilidad a los medicamentos anticancerosos inhibiendo la expresión del factor de activación de la apoptosis y el aumento de la expresión del factor de inhibición de la apoptosis.

El dominio extracelular de la IRAP está escindido por unas metaloproteasas que pertenecen aparentemente a la familia de las ADAM, de la cual ADAM9 (SwissProt Q13443) y ADAM12 (SwissProt 043184) (Ito, N., Nomura, S., Iwase, A., Ito, T., Kikkawa, F., Tsujimoto, M., Ishiura, S., y Mizutani, S. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 314(4), 1008-1013) y liberado en la circulación sanguínea. ADAM9 (MDC9) está expresada en diferentes tejidos, entre ellos el músculo esquelético y el tejido adiposo (Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N., y Ishiura, S. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 293(2), 800-805) y ADAM12 está esencialmente expresada en el músculo. Otros miembros diferentes de esta familia están igualmente expresados en el músculo y el tejido adiposo.

Hoy día, las únicas relaciones descritas entre la concentración del dominio extracelular de la IRAP en un medio biológico y una patología que se refiere a la preeclampsia severa, así como a la amenaza de parto prematuro. En estas dos patologías, las concentraciones de P-LAP circulante son inferiores a las observadas en las mujeres control de edad gestacional equivalente. Sin embargo, los métodos descritos en la técnica anterior están basados en el ensayo enzimático, por medio de un sustrato no específico del dominio extracelular de la IRAP.

Así, existe una necesidad real de proporcionar un método fiable y específico que permita ensayar el dominio extracelular de la IRAP circulante.

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un método de dosificación *in vitro* de la concentración en proteína IRAP en el suero o el plasma o los tejidos de un mamífero, específicamente del dominio extracelular de la proteína IRAP.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal específico del dominio extracelular de las diferentes isoformas de la proteína IRAP.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método de diagnóstico de patologías en las que están implicado un exceso o una disminución de la concentración en la proteína IRAP.

Un último objetivo es proporcionar un anticuerpo monoclonal específico del dominio extracelular de las diferentes isoformas de la proteína IRAP e inhibidor de su actividad enzimática en una óptica terapéutica.

Por consiguiente, la presente invención está ilustrada por la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP ("insulin-responsive aminopeptidase"), para la realización de un método de dosificación *in vitro* de la concentración en dominio extracelular segregado de la proteína IRAP en el suero, el plasma o los tejidos de un mamífero, en particular del ser humano.

La invención se refiere a la utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP ("insulin-responsive aminopeptidase"), para la realización de un método de dosificación *in vitro* de la concentración en dominio extracelular segregado de la proteína IRAP en el suero o el plasma de un mamífero, en particular del ser humano, siendo dicha dosificación efectuada con la ayuda de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la parte extracelular de la proteína IRAP, representada por las SEC ID n^o 7 a 11.

La proteína IRAP puede tener diferentes denominaciones, tales como: "Insulin responsive aminopeptidase", "Insulin-regulated membrane aminopeptidase", "Leucyl-cystinyl aminopeptidase (L-CAP)", "Placental leucine aminopeptidase (P-LAP)", "Cystinyl aminopeptidase", "Oxytocinase", "OTase", "Vesicle protein of 165 kDa", "Vp165", o "GP160". Corresponden todas a una o varias isoformas de la proteína registrada bajo los n^{os} Q9UIQ6 1, 2 y 3 de la base de datos Swiss-Prot.

Estas diferentes denominaciones podrán ser empleadas indistintamente a continuación en la descripción y designan la misma proteína.

La proteína IRAP, sean cuales sean sus isoformas, está constituida de una parte N-terminal de aproximadamente 110 aminoácidos, presente en el citoplasma, de una parte transmembranaria de aproximadamente 20 aminoácidos y de una parte C-terminal extracelular que comprende los aminoácidos restantes.

Como se ha indicado anteriormente, el dominio extracelular puede ser escindido o segregado.

En consecuencia, la expresión "dominio extracelular" comprende tanto el dominio extracelular aún unido a la membrana de la célula, y que se encuentra por lo tanto en los tejidos, como el dominio extracelular circulante, es decir después de la escisión y de la secreción, que se encuentra en la circulación sanguínea.

5 Por "mamífero" se entiende un taxón, incluido en los vertebrados y que agrupa cerca de 5400 especies. Dichas especies están definidas en: Wilson, D. E., y Reeder, D. M. (eds), *Mammal Species of the World*, Johns Hopkins University Press, 16/11/2005.

10 Una de las ventajas del método de dosificación *in vitro* de la invención es, por lo tanto, permitir la dosificación específica del dominio extracelular de la proteína IRAP en un mamífero y más particularmente:

- o bien el dominio extracelular circulante en el suero, o el plasma,
- o bien el dominio extracelular aún unido a la membrana en los tejidos, incluyendo las hemáties.

15 En un modo de realización ventajoso, la invención se refiere a la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP, en el que dicha proteína IRAP corresponde a una de sus isoformas, en particular las isoformas definidas por las SEC ID n° 1 a 3, o a una de sus variantes, en particular las variantes definidas por las SEC ID n° 4 a 6, estando dicho dominio extracelular representado por las SEC ID n° 7 a 11.

20 La proteína IRAP puede existir bajo por lo menos tres isoformas (Swiss-Prot: Q9UIQ6 1, 2 y 3; representadas por las SEC ID n° 1 a 3 respectivamente) así como varias variantes de la isoforma 1: 031616 (S86P, serina sustituida por una prolina en la posición 86), 012812 (A763T, alanina sustituida por una treonina en la posición 763) y 031617 (I1963V, isoleucina sustituida por una valina en la posición 963) representadas por las SEC ID n° 4 a 6 respectivamente.

El dominio extracelular de cada isoforma 1 a 3 está representado por las SEC ID n° 7 a 9 respectivamente, y el dominio extracelular de las variantes 031616, 0128412 y 031617 está representado por las SEC ID n° 7, 10 y 11.

30 En toda esta descripción, el término IRAP puede ser empleado sólo, pero incluye también sus isoformas y/o variantes.

35 En un modo de realización ventajoso, la invención está ilustrada por la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente y/o de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o de una de sus variantes definida anteriormente, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con defectos de translocación del transportador de la glucosa GLUT4 o de proteínas asociadas, incluyendo la IRAP.

40 La invención se refiere a la utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP definida anteriormente para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con defectos de translocación del transportador de la glucosa GLUT4 o de proteínas asociadas.

45 Por "diagnóstico *in vitro*" se debe entender el razonamiento que lleva a la identificación *in vitro* de la causa (el origen) de un fallo, de un problema o de una enfermedad.

Por "pronóstico *in vitro*", se debe entender la apreciación *in vitro* del grado de gravedad y de evolución ulterior de una enfermedad, incluyendo su desenlace.

50 Como se ha precisado anteriormente, la IRAP se co-localiza con el transportador de glucosa GLUT4 y se co-transloca con éste de manera estequiométrica.

55 Por lo tanto, la determinación de la concentración de la proteína IRAP o de una de sus isoformas, o de una de sus variantes definida anteriormente presente en el suero o en el plasma, los hemáties o los tejidos, es representativa de la translocación, y por lo tanto de la cantidad de transporte de glucosa.

Otra ventaja del método de dosificación de la invención es por lo tanto la determinación de un defecto de transporte de glucosa, y por lo tanto la identificación de la causa de una patología o de su grado de gravedad, o también el seguimiento de la patología y de su evolución.

60 En un modo de realización ventajoso, el método de dosificación definido anteriormente permite la evaluación de un tratamiento dirigido contra esta enfermedad por comparación de las concentraciones del dominio extracelular de la proteína IRAP obtenidas antes y después del tratamiento.

65 Las patologías relacionadas con el defecto de transporte de glucosa pueden ser, sin estar limitadas a estas: la insulino-resistencia, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional. Según un modo de realización más ventajoso, la invención se ilustra mediante la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente, y/o

de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o de una de sus variantes definida anteriormente, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión y/o al aumento de la translocación de la membrana plásmica de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes en un paciente, con respecto a un individuo sano.

La invención se refiere a la utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP definida anteriormente para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión y/o al aumento de la translocación hacia la membrana de la IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión de la IRAP y/o al aumento de la translocación hacia la membrana de la IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes en un paciente, con respecto a un individuo sano.

En el ámbito de una sobreexpresión y/o del aumento de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP, la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP, segregada o no, determinada en un paciente, mediante el método de dosificación de la invención, será superior a la obtenida en un individuo sano, indicando así una sobreexpresión de la proteína IRAP.

En el ámbito del seguimiento de una patología relacionada con una sobreexpresión y/o con el aumento de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP en un paciente, la disminución de la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada en dicho paciente durante el tratamiento por el método de dosificación de la invención, con respecto a la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada antes del tratamiento, permitirá demostrar la eficacia del tratamiento.

A la inversa, un aumento o una estabilización de la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada en dicho paciente durante el tratamiento, con respecto a la concentración del dominio extracelular, segregado o no, de la proteína IRAP determinada antes del tratamiento, mostrará la ineficacia del tratamiento, permitiendo así una modificación de las dosis o del principio activo utilizado.

Por consiguiente, se considera que hay sobreexpresión y/o aumento de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP en un individuo cuando el valor máximo de la concentración en proteína IRAP, segregada o no, anteriormente indicada, se incrementa en el 25% o más en un paciente.

Unos ejemplos de patologías relacionadas con la sobreexpresión y/o con el aumento de la translocación a la membrana plásmica de la proteína IRAP, sin estar limitado a estas, son todas las enfermedades que implican un fenómeno proliferativo, en particular los cánceres tales como, y de manera no exhaustiva: la adenocarcinoma ovárico, el cáncer de endometrio, el coriocarcinoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer del estómago, el cáncer del recto o los cánceres de la esfera ORL.

Según un modo de realización más ventajoso, la invención se ilustra por la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente, y/o de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o de una de sus variantes definida anteriormente, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación en la membrana plásmica de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación en la membrana plásmica de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes en un paciente.

La invención se refiere a la utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP definida anteriormente para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación hacia la membrana de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación hacia la membrana de la IRAP o de sus isoformas o variantes en un paciente.

En el ámbito de una subexpresión y/o de la disminución de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP, la concentración del dominio extracelular, segregado o no, de la proteína IRAP determinada en un paciente, mediante el método de ensaño de la invención, será inferior a la obtenida en un individuo sano, indicando así una subexpresión y/o la disminución de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP.

En el ámbito del seguimiento de una patología relacionada con una subexpresión y/o con la disminución de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP en un paciente, el aumento de la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada en dicho paciente durante el tratamiento mediante el método de dosificación de la invención, con respecto a la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada antes del tratamiento, permitirá mostrar la eficacia del tratamiento.

A la inversa, una disminución o una estabilización de la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada en dicho paciente durante el tratamiento, con respecto a la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP determinada antes del tratamiento, mostrará la ineficacia del tratamiento, permitiendo así una

modificación de las dosis o del principio activo utilizado.

Se considera que existe una subexpresión de la proteína IRAP cuando el valor mínimo de la concentración en proteína IRAP anteriormente indicada disminuye el 25% o más.

5 En un modo de realización ventajoso, la utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP definida anteriormente, y/o de una de sus isoformas definida anteriormente y/o de una de sus variantes definida anteriormente, permite el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de la quimiorresistencia a los medicamentos anticancerosos.

10 Mediante el término "quimiorresistencia" se debe entender una sensibilidad reducida o totalmente perdida en un tratamiento anticanceroso durante una quimioterapia por unos medicamentos anticancerosos, adquirida o inherente, y que restringe o aniquila completamente la eficacia del tratamiento anticanceroso.

15 Unos ejemplos de medicamentos anticancerosos, sin estar limitado a estos, son el paclitaxel (Taxol), el carboplatino, etc.

Por consiguiente, la dosificación del dominio extracelular de la IRAP y/o de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o de una de sus variantes definida anteriormente, que muestra una sobreexpresión y/o un aumento de la translocación en la membrana plásmica de la proteína IRAP en un individuo, en particular cuando el valor máximo de la concentración en proteína IRAP anteriormente indicada es incrementada en el 25% o más en un paciente, permite el diagnóstico y/o el pronóstico de la resistencia a la quimioterapia.

20 Según un modo de realización ventajoso, la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente y/o una de sus isoformas definida anteriormente y/o una de sus variantes definida anteriormente, permite el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con defectos de translocación del transportador de glucosa GLUT4 y en particular a la subexpresión de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes, y que están entre las asociadas a la insulinorresistencia, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional.

25 La insulinorresistencia se traduce por una peor captación de glucosa por los tejidos sensibles en respuesta a la insulina. Esta enfermedad evoluciona hacia la diabetes de tipo 2, que aparece cuando el índice de glucosa en la sangre (glicemia) supera los valores normales (110 mg/dl en ayunas y 140 mg/dl 2h después de la ingestión de 75 g de glucosa). Este aumento del índice de glucosa en la sangre hiperestimula el páncreas, que aumenta la secreción de insulina para compensar el aumento de la glicemia.

30 La diabetes gestacional representa cualquier estado de intolerancia a la glucosa, sea cual sea su gravedad, aparecida durante el embarazo en una mujer sin diabetes mellitus conocido anteriormente.

35 La preeclampsia es una enfermedad caracterizada por la asociación de una hipertensión arterial, de una proteinuria, de un aumento de peso con edemas.

La amenaza de un parto prematuro está caracterizada por unas contracciones uterinas que conllevan una disminución y una apertura del cuello que puede provocar un parto antes del final de al 36ª semana de gestación.

40 Por consiguiente, otra ventaja de la invención es permitir el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con unos defectos de translocación del transportador de glucosa GLUT4 tanto en los tejidos como en el suero, el plasma o los hematíes.

45 Según otro modo de realización ventajoso, la utilización del dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente y/o de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o de una de sus variantes definida anteriormente, permite el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con unos defectos de translocación del transportador de glucosa GLUT4, en particular de los cánceres, en particular en los que IRAP y/o sus isoformas y/o sus variantes están sobreexpresados, tal como la adenocarcinoma ovárico, el cáncer de endometrio, el coriocarcinoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el

50 cáncer de estómago, el cáncer de recto o los cánceres de la esfera ORL, las enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

55 El coriocarcinoma es un tumor altamente maligno hecho de la yuxtaposición de elementos celulares de citotrofoblasto y de sincitiotrofoblasto con desaparición completa de las vellosidades coriales.

60 En un modo de realización ventajoso, la detección de los cánceres citados en el documento WO 2005/038462 mediante el método de la invención se efectúa en el suero, pero también en el plasma o sobre los hematíes.

65 Por enfermedad autoinmune, se debe entender unas enfermedades debidas a una hiperactividad del sistema inmunitario frente a sustancias o tejidos que están normalmente presentes en el organismo, tales como las tiroiditis autoinmune, la poli-artritis reumatoide, la espondilartitis anquilosante, el síndrome de Goujerot-Sjögren.

Unos ejemplos de enfermedades inflamatorias, pero sin estar limitado a estas, son los siguientes:

5 la poliartritis reumatoide, el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren, la esclerodermia (esclerosis sistémica), la dermatomiositis, la polimiositis, la polimialgia reumática, la osteoartritis, la artritis séptica, la gota, la pseudogota, las espondilartropatías, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter, la artropatía psoriática, la espondilitis enteropática, la artropatía reactiva, la enfermedad de Crohn, la sarcoidosis, etc.

10 En el ámbito de un tratamiento por un medicamento anticanceroso, la IRAP reduce la sensibilidad a estos medicamentos inhibiendo la expresión del factor de promoción de la apoptosis y aumentando la expresión del factor inhibiendo la apoptosis (Kondo *et al.*, *Int. J. Cancer*: 118, 1390-1394; 2006).

15 Según un modo de realización más ventajoso, la realización de un método de dosificación *in vitro* mediante el dominio extracelular de la proteína IRAP definida anteriormente y/o de una de sus isoformas definida anteriormente y/o de una de sus variantes definida anteriormente, se efectúa con la ayuda de un anticuerpo.

20 El término "anticuerpo" se utiliza para designar unos anticuerpos policlonales o monoclonales específicos del dominio extracelular de una de las isoformas de la proteína IRAP y comprende asimismo unos fragmentos o unas moléculas que mimetizan los anticuerpos monoclonales específicos del dominio extracelular de la proteína IRAP, y en particular un fragmento que se une a un epítipo.

25 Unos fragmentos o unas moléculas pueden ser derivados de anticuerpos monoclonales por unas técnicas de ADN recombinante o por unos métodos enzimáticos o químicos y pueden presentar unas características de unión similares con respecto a un anticuerpo monoclonal para un fragmento de antígeno.

30 Los anticuerpos de la presente invención comprenden al mismo tiempo toda la longitud de los anticuerpos discutidos anteriormente, así como unos fragmentos de estos que se unen a los epítipos. Tal cual se utiliza a continuación, la expresión "fragmentos de anticuerpos" comprende cualquier parte de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse a un epítipo reconocido por toda la longitud del anticuerpo, generalmente denominado "fragmentos que se unen a un epítipo".

35 Unos ejemplos de fragmentos de anticuerpos comprenden, pero no se limitan a estos, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs (scFv) de cadena sencilla, unos anticuerpos de cadena sencilla, unos Fvs unidos por unos puentes disulfuro y unos fragmentos que comprenden una región VL o VH. Unos fragmentos que se unen a un epítipo, incluyendo unos anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(las) región(es) variable(s) sola(s), o en combinación con la totalidad o una parte de los elementos siguientes: región bisagra, los dominios CH1, CH2 y CH3.

40 Estos fragmentos pueden contener uno o los dos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Además, los fragmentos pueden ser o pueden combinar los miembros de cualquiera de las categorías siguientes inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de estas.

45 Unos fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden ser producidos por escisión proteolítica, utilizando unas enzimas tales como la papaína (fragmento Fab) o la pepsina (fragmento F(ab')₂).

50 Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos con la ayuda de métodos convencionales, que comprenden la inmunización de un animal y la recuperación de las células esplénicas para producir unas hibridomas por fusión celular. Los anticuerpos de la invención pueden ser utilizados ventajosamente en forma de una mezcla de anticuerpos monoclonales.

55 Según un modo de realización ventajoso, dicho anticuerpo definido anteriormente es un anticuerpo policlonal.

Por "anticuerpo policlonal" se entiende un anticuerpo que proviene de diferentes linajes de células de linfocitos B.

60 En un modo de realización ventajoso, dicho anticuerpo policlonal definido anteriormente se utiliza para la realización de un método de dosificación *in vitro* de la concentración de la proteína IRAP definida anteriormente y/o de una de sus isoformas definida anteriormente, y/o variantes en el suero, el plasma o los hematíes de un mamífero, en particular de un ser humano en el ámbito de la insulino-resistencia o del cáncer, o en unos tejidos de un mamífero en el ámbito de la insulino-resistencia.

65 Según otro modo de realización ventajoso, dicho anticuerpo definido anteriormente es un anticuerpo monoclonal.

Por "anticuerpo monoclonal" se entiende un anticuerpo que proviene de un solo clon de células, es decir un hibridoma.

En un modo de realización ventajoso, dicho anticuerpo monoclonal definido anteriormente se utiliza para la realización de un método de dosificación *in vitro* de la concentración de la proteína IRAP definida anteriormente y/o

de una de sus isoformas definida anteriormente y/o de una de sus variantes, en el suero, el plasma, los hematíes o unos tejidos de un mamífero, en particular del ser humano, en el ámbito de la insulino-resistencia o del cáncer.

5 Según un modo de realización ventajoso, el anticuerpo monoclonal tal como se define anteriormente está producido por un hibridoma.

Por "hibridoma" se debe entender una célula de fusión que produce continuamente unos anticuerpos, es decir unas células tumorales que pueden reproducirse sin fin y que son fusionadas con unas células de mamíferos.

10 Según otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que reconoce específicamente el dominio extracelular circulante, o uno de los epítomos del dominio extracelular, de la proteína IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) y/o de una de sus isoformas, en particular las isoformas definidas por las SEC ID n° 1 a 3, y/o una de sus variantes, en particular las variantes definidas por las SEC ID n° 4 a 6, estando dicho dominio extracelular definido por las secuencias SEC ID n° 7 a 11.

15 Una de las ventajas de la invención es por lo tanto proporcionar un anticuerpo específico del dominio extracelular o uno de los epítomos de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o de una de sus variantes, es decir que reconoce específicamente dicho dominio extracelular o uno de sus epítomos, que el dominio extracelular esté aún unido a la membrana plásmica de la célula o que haya sido escindido por unas metaloproteasas que pertenecen o no a la familia ADAM, en particular ADAM9 y ADAM12, y sea por lo tanto circulante, y que no reconoce la parte transmembranaria o la parte intracelular.

20 Por consiguiente, el anticuerpo de la invención reconoce específicamente dicho dominio extracelular o uno de sus epítomos, después de la co-translocación con el transportador de glucosa GLUT4, y permite por lo tanto un método de diagnóstico y/o de pronóstico *in vitro*, o de seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con defectos de translocación del transportador de glucosa GLUT4 o de proteínas asociadas.

25 En un modo de realización ventajoso, el anticuerpo definido anteriormente se utiliza como medicamento, en particular para el tratamiento de los síndromes proliferativos y cánceres, en particular aquéllos en los que la IRAP y/o sus isoformas y/o sus variantes están sobreexpresados, y/o cuya translocación hacia la membrana plásmica está incrementada, tal como la adenocarcinoma ovárico, el cáncer de endometrio, el coriocarcinoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de estómago, el cáncer de recto o los cánceres de la esfera ORL, las enfermedades autoinmunes o inflamatorias, o para el tratamiento de la resistencia a la quimioterapia.

30 La disminución de la expresión y/o de su translocación hacia la membrana plásmica de la IRAP, es decir el retorno a una concentración sérica o en los tejidos próximos a la normal, es decir antes de la aparición de la patología cancerosa o la inhibición parcial o total de su actividad con los anticuerpos de la invención, permite por lo tanto el tratamiento de los cánceres.

35 Asimismo, estando la proteína IRAP implicada en la reducción de la sensibilidad a los medicamentos anticancerosos, como se indica anteriormente, los anticuerpos de la invención permiten por lo tanto reducir la concentración de la IRAP o inhibir de manera parcial o total su actividad y/o su translocación hacia la membrana plásmica, y por lo tanto suprimir la reducción a la sensibilidad a los medicamentos anticancerosos que llevan al tratamiento de la resistencia a la quimioterapia y por lo tanto a la mejora de la eficacia de los anticancerosos.

Según un modo de realización ventajoso, el anticuerpo definido anteriormente es un anticuerpo policlonal.

Según un modo de realización ventajoso, el anticuerpo definido anteriormente es un anticuerpo monoclonal.

50 Otro modo de realización ventajoso de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal tal como se ha definido antes, estando dicho anticuerpo monoclonal seleccionado entre:

- 55 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hibridoma depositado en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, París, Francia), el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4181,
- el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4182,
- 60 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4183,
- 65 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4184, y

- el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4185.

5 A continuación, el anticuerpo monoclonal n° CNCM I-4181 se denomina también anticuerpo 17H10-3H5-3D8, o anticuerpo 17H10, el anticuerpo monoclonal n° CNCM I-4182 se denomina también anticuerpo 14A4-3H9-2B6, o anticuerpo 14A4, el anticuerpo monoclonal n° CNCM I-4183 se denomina también anticuerpo 4G6-3B6, o anticuerpo 4G6, el anticuerpo monoclonal n° CNCM I-4184 se denomina también anticuerpo 38E1-2G4-3A2, o anticuerpo 38E1, y el anticuerpo monoclonal n° CNCM I-4185 se denomina también anticuerpo 40C10-2G8, o anticuerpo 40C10.

10 Según un modo de realización ventajoso, el anticuerpo monoclonal está marcado con un compuesto seleccionado entre un radionucleido, un fluoróforo, un punto cuántico, un marcador de enzima, un sustrato de enzima, un co-factor de enzima, un inhibidor de enzima o un hapteno.

15 El marcador particular o el grupo detectable utilizado en el ensayo no es generalmente un aspecto crítico de la invención, mientras que no interfiere con la unión específica del anticuerpo utilizado en la dosificación. El grupo detectable puede ser cualquier material que tiene una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables han sido bien desarrollados en el dominio de los ensayos inmunológicos y, en general, casi cualquier marcador útil en tales métodos se puede aplicar al método de la presente invención.

20 Así, un marcador es cualquier composición detectable por unas técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, eléctricas, ópticas, radiológicas o unos medios químicos. Unos marcadores útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a ellos, unas bolas magnéticas (por ejemplo Dynabeads™), unos colorantes fluorescentes (por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, la rodamina), unos marcadores radiomarcados (por ejemplo ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), unas enzimas (por ejemplo la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y otros habitualmente utilizados en un ensayo ELISA), y unos marcadores colorimétricos tales como el oro coloidal, unas bolas de vidrio o de plástico (por ejemplo el poliestireno, el polipropileno, el látex, etc.) coloreadas y los puntos cuánticos.

30 El marcador puede ser acoplado directa o indirectamente al elemento deseado del ensayo según unos métodos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado antes, se puede utilizar una gran variedad de marcadores, la selección del marcador depende de la sensibilidad necesaria, la facilidad de conjugación con el compuesto, unas exigencias de estabilidad, los instrumentos disponibles y las condiciones de eliminación. Unos marcadores radioactivos se unen frecuentemente mediante medios indirectos.

35 Como regla general, una molécula ligando (por ejemplo la biotina) está unida de manera covalente al anticuerpo. El ligando se une entonces a una molécula anti-ligando (por ejemplo estreptavidina), que o bien es por sí misma detectable, o bien se une de manera covalente a un sistema de señal, como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Se puede utilizar un cierto número de ligandos y de anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo la biotina, la tiroxina, y el cortisol, éste se puede utilizar en asociación con el anti-ligando natural marcado. Alternativamente, un compuesto hapténico o antigénico puede ser utilizado en combinación con un anticuerpo.

45 Los anticuerpos pueden también ser conjugados directamente a unos compuestos que generan una señal, por ejemplo en conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés, utilizadas como marcadores, son principalmente unas hidrolasas, en particular unas fosfatasas, unas esterasas y unas glicosidasas, o unas oxidoreductasas, en particular unas peroxidasas.

50 Unos compuestos fluorescentes comprenden la fluoresceína y sus derivados, la rodamina y sus derivados, el dansilo, la umbeliferona, etc. Unos compuestos quimioluminiscentes comprenden la luciferina, y las 2,3-dihidroftalazinedionas, por ejemplo, el luminol y los puntos cuánticos. Un repaso de los marcadores o de otros sistemas de producción de la señal está disponible en la patente americana n° 4.391.904.

55 En la técnica, son bien conocidos unos medios para detectar los marcadores. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radioactivo, los medios de detección comprenden un contador γ o β de centelleo o unas películas fotográficas, como para la autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, este se puede detectar por excitación del fluoróforo en las ondas largas de la luz o láser apropiadas y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede ser detectada visualmente, mediante una película fotográfica, por la utilización de detectores electrónicos, tales como los dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) o unos fotomultiplicadores y los equivalentes.

60 Asimismo, unos marcadores enzimáticos pueden ser detectados proporcionando los sustratos apropiados a la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Por último, se pueden detectar unos marcadores colorimétricos simples observando simplemente el color asociado a dicho marcador.

65 Según un modo de realización ventajoso, dicho anticuerpo monoclonal definido anteriormente es un anticuerpo humanizado.

Por "anticuerpo humanizado" se debe entender un anticuerpo genéticamente modificado en el que la parte mínima de un anticuerpo de ratón está integrada a un anticuerpo humano; generalmente los anticuerpos humanizados comprenden el 5-10% de anticuerpos de ratones y del 90 al 95% de anticuerpos humanos.

5 Los anticuerpos humanizados tienen la ventaja de bloquear las respuestas HAMA (anticuerpos humanos dirigidos contra unos anticuerpos de ratones) y HACA (anticuerpos humanos dirigidos contra los anticuerpos quiméricos) observadas con la utilización de anticuerpos de ratones o quiméricos, y que presentan sólo una respuesta mínima o ninguna respuesta del sistema inmune humano contra ellos.

10 Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, tal como se ha definido anteriormente.

15 Otro aspecto ventajoso de la invención se refiere a un hibridoma, tal como se ha definido anteriormente, estando dicho hibridoma seleccionado entre:

- el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4181,
- el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4182,
- 20 - el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4183,
- el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4184, y
- el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4185.

La obtención de estos hibridomas está descrita en los ejemplos.

25 Según otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de dosificación *in vitro* de la concentración en proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas y/o de una de sus variantes, en un mamífero que comprende una etapa de determinación de la concentración del dominio extracelular de la proteína IRAP y/o una de sus isoformas y/o una de sus variantes en el suero, el plasma, los hematíes o los tejidos de un mamífero.

30 El procedimiento de la invención permite, por lo tanto, la dosificación específica del dominio extracelular de la proteína IRAP después de la co-translocación con el transportador de glucosa GLUT4, y permite por lo tanto determinar la sobreexpresión o la subexpresión y/o el aumento o la disminución de la translocación de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o de una de sus variantes responsables de patologías asociadas.

35 Procedimiento de dosificación según la reivindicación 18, en el que la dosificación se efectúa o bien mediante un método inmunoenzimático, o bien mediante un método inmunohistoquímico, o bien mediante RIA o IRMA.

40 La dosificación del dominio extracelular de la proteína IRAP se puede efectuar bien mediante ensayo inmunoenzimático (ejemplo 3), o bien mediante ensayo inmunohistoquímico (ejemplo 4), RIA (radio inmuno-assay) o IRMA (immunoradiometric assay). En estos últimos casos, el ensayo se efectúa con la ayuda de anticuerpos, o bien de la proteína o de un fragmento de esta, marcados con yodo 125 o con cualquier otro radioisótopo apropiado.

45 Según otro aspecto, la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a la insulino-resistencia, así como a la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional, la hipertensión gestacional (preeclampsia), la amenaza de parto prematuro, y que comprende las etapas siguientes:

- a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, es decir también expresado a nivel de la membrana plásmica de los hematíes, y/o de una de sus isoformas, y/o de una de sus variantes, en un mamífero con la ayuda de un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente,
- 50 b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero sano,
- c. la deducción a partir de la etapa b. anterior del hecho de que el mamífero presenta una insulino-resistencia, si la concentración obtenida en la etapa a. es inferior a la de la etapa b.

55 Otra ventaja de la invención es por lo tanto proporcionar un método de diagnóstico y/o de pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías en las que la proteína IRAP y/o una de sus isoformas y/o una de sus variantes está subexpresada.

60 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a los síndromes proliferativos, incluyendo los cánceres, en particular aquéllos en los que la IRAP y/o una de sus isoformas y/o una de sus variantes está sobreexpresada, y/o cuya translocación hacia la membrana plásmica está incrementada, tales como el adenocarcinoma ovárico, o a enfermedades autoinmunes o inflamatorias, o a la resistencia a la quimioterapia, y que comprenden las etapas siguientes:

- a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, es decir

también expresado a nivel de la membrana plásmica de los hematíes, y/o de una de sus isoformas, y/o de una de sus variantes, en un mamífero con la ayuda de un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente,

- 5
- b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero control,
 - c. la deducción a partir de la etapa b. anterior del hecho de que el mamífero presenta un cáncer, si la concentración obtenida en la etapa a. es inferior a la de la etapa b.

10 Otra ventaja de la invención es por lo tanto proporcionar un método de diagnóstico y/o de pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías en las que la proteína IRAP y/o una de sus isoformas y/o una de sus variantes, está sobreexpresada o cuya translocación en la membrana plásmica está incrementada.

15 Según también otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o una de sus isoformas y/o variantes, en un mamífero que comprende por lo menos un tampón, y por lo menos un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente.

20 En un modo de realización preferido, el kit definido anteriormente comprende también un sustrato de la proteína IRAP así como un péptido o un fragmento de IRAP reconocido por el anticuerpo.

Unos ejemplos de sustrato, sin estar limitado a estos, son la L-leucina-nitroanilida, la vasopresina, la ocitocina, las met-enkefalinas, etc.

25 Por "péptido reconocido por el anticuerpo" se debe entender la proteína IRAP recombinante o un fragmento de esta reconocido por el anticuerpo.

30 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a los cánceres, en particular aquéllos en los que la IRAP, y/o una de sus isoformas y/o una de sus variantes está sobreexpresada, o cuya translocación en la membrana plásmica está incrementada, tal como el adenocarcinoma ovárico, o a unas enfermedades autoinmunes o inflamatorias, o a la resistencia a la quimioterapia, y que comprende las etapas siguientes:

- 35
- a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas, y/o de una de sus variantes, en un mamífero con la ayuda de un anticuerpo monoclonal, tal como se ha definido anteriormente, preferentemente 2 anticuerpos monoclonales tales como se han definido anteriormente, en particular los anticuerpos 17H10 y 4G6 o 40C10,
 - b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero control,
 - c. la deducción a partir de la etapa b. anterior del hecho de que el mamífero presenta un cáncer, si la concentración obtenida en la etapa a. es inferior a la de la etapa b.
- 40

45 Según otro aspecto, la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a la insulino-resistencia así como la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional, la hipertensión gestacional (preeclampsia), la amenaza de parto prematuro, y que comprende las etapas siguientes:

- 50
- a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas, y/o de una de sus variantes, en un mamífero con la ayuda de un anticuerpo monoclonal, tal como se ha definido anteriormente, preferentemente 2 anticuerpos monoclonales, tales como se han definido anteriormente, en particular los anticuerpos 17H10 y 4G6 o 40C10,
 - b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero sano,
 - c. la deducción a partir de la etapa b. anterior del hecho de que el mamífero presenta una insulino-resistencia, si la concentración obtenida en la etapa a. es inferior a la de la etapa b.
- 55

Las figuras y los ejemplos siguientes ilustrarán mejor la invención, sin por ello limitar su alcance.

60 Las figuras 1A-E representan unos gráficos que corresponden a la medición de la afinidad de los anticuerpos monoclonales 17H10, 14A4, 4G6, 38E1, 40C10 para la proteína IRAP.

65 La figura 1A muestra un gráfico que mide la detección de la proteína IRAP (■) o IRAP His (◆) en función de la concentración del anticuerpo 4G6.

La figura 1B muestra un gráfico que mide la detección de la proteína IRAP (▲) o IRAP His (X) en función de la concentración del anticuerpo 14H4.

5 La figura 1C muestra un gráfico que mide la detección de la proteína IRAP (●) o IRAP His (*) en función de la concentración del anticuerpo 17H10.

La figura 1D muestra un gráfico que mide la detección de la proteína IRAP (+) o IRAP His (-) en función de la concentración del anticuerpo 38E1.

10 La figura 1E muestra un gráfico que mide la detección de la proteína IRAP (◆) o IRAP His (--) en función de la concentración del anticuerpo 40C10.

15 La figura 2 representa la curva dosis-respuesta de detección de IRAP en un ELISA en el que el anticuerpo monoclonal 17H10 se utiliza como anticuerpo de captura y el anticuerpo monoclonal 4G6 como anticuerpo de detección. (◆) representa el ensayo de la IRAP recombinante, (■) representa el ensayo de la IRAP en el suero de mujer embarazada, y (▲) representa el ensayo de la IRAP en el suero de hombre.

20 La figura 3 representa la curva dosis de saturación de la detección de la IRAP en un ELISA en el que el anticuerpo monoclonal 17H10 se utiliza como anticuerpo de captura, y el anticuerpo monoclonal 40C10 como anticuerpo de detección, (◆) representa el ensayo de la IRAP recombinante, (■) representa el ensayo de la IRAP recombinante diluida en un suero de mujer embarazada, y (▲) representa el ensayo de la IRAP recombinante diluida en suero de hombre.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de la proteína IRAP

1. Clonación:

30 Se ha construido un vector de expresión que contiene la secuencia que codifica el dominio extracelular de la IRAP en función con un péptido señal de insecto, y una etiqueta de histidina 6 escindible en la proteasa Tev en N-terminal, y se ha verificado su conformidad con la secuencia de la base de datos Swiss-Prot (Q9UIQ6) mediante secuenciación (pGTPb302-mel-His-Tev-PLAPextra, referencia C640-CAP-06).

35 Se ha elaborado un bacmid recombinante y se ha controlado la presencia del casete de expresión en dicho bacmid mediante PCR.

Se ha generado el virus recombinante por transfección del bacmid en la línea celular de insecto Sf9.

40 Después de una amplificación viral, el virus de segunda generación se tituló y se utilizó para una serie de ensayos de expresión en un sistema células de insectos/baculovirus.

2. Expresión y purificación de la secuencia extracelular circulante de la IRAP o de una de sus isoformas o de una de sus variantes. Pueden ser utilizados tres métodos diferentes:

45 - 1º método: expresión de la proteína IRAP o de una de sus isoformas por una cepa apropiada de *E. coli*. La proteína IRAP o una de sus isoformas segregada se purifica después por afinidad sobre matriz de Ni⁺⁺ o Co⁺⁺. Por último, las secuencias poli-His son escindidas con la ayuda de una proteasa específica.

50 - 2º método: expresión de la proteína IRAP o de una de sus isoformas o de una de sus variantes mediante unas células Sf9 de insecto después de la clonación del ADNc modificado en baculovirus: los ensayos de expresión se realizaron sobre 2 líneas celulares: Sf9 y HighFive haciendo variar el MOI (multiplicity of infection) así como la duración de la infección. El análisis de los ensayos de expresión se realizó por transferencia western anti-His sobre unas muestras de sobrenadante de cultivo extraídas a 24, 48 y 72 horas de infección y la condición más productiva es de 48h de infección (HighFive MOI 0,1)

55 La proteína IRAP o una de sus isoformas o una de sus variantes segregadas se purifica después por afinidad sobre matriz de Ni⁺⁺ o Co⁺⁺. Por último, las secuencias poli-His son escindidas con la ayuda de una proteasa específica.

60 Ejemplo 2: Producción de los anticuerpos monoclonales

Línea general

65 El protocolo procede de la técnica del hibridoma (protocolo de Köhler y Milstein, 1976), y se divide en 5 etapas:

- Etapa 1 - Inmunización: inyección subcutánea en ratones de varios péptidos que corresponden a secuencias específicas comunes de la parte extracelular de las isoformas de la IRAP o de una de sus variantes. Estas secuencias peptídicas no se encuentran en las otras aminopeptidasas de mamíferos.

5 Los antisueros son ensayados contra la proteína recombinante purificada IRAP o una de sus isoformas por ELISA. Los bazos de ratones que responden son utilizados para la generación de hibridomas. Los anticuerpos producidos por estos son después reensayados por ELISA contra la proteína IRAP o una de sus isoformas y en el suero de mujeres embarazadas y no gestantes.

- Etapa 2 - Fusión: extracción de las células de bazos y fusión de estas células con unas células de mieloma en presencia de polietilenglicol (agente químico de fusión). Distribución de la mezcla en unos pocillos de microplaca a una dilución tal que de media cada pocillo contiene menos de una célula híbrida. Cultivo de las células en un medio selectivo en el que sólo las células híbridas se multiplican y perduran, mientras que las células mielomatosas y los plasmocitos de bazo no fusionados mueren rápidamente.

- Etapa 3 - Cribado: búsqueda en cada pocillo de anticuerpos dirigidos contra la proteína IRAP o una de sus isoformas o una de sus variantes recombinantes.

- Etapa 4 - Clonación y caracterización: trasplante de las células híbridas que producen unos anticuerpos con el fin de obtener unos clones celulares. Conservación de una copia de cada clon en el nitrógeno líquido. Isotipado de los anticuerpos producidos.

- Etapa 5 - Cultivo y producción: dos modos posibles de cultivo de los hibridomas para producir los anticuerpos anti-IRAP o una de sus isoformas o una de sus variantes:

* cultivo *in vitro* de las células (producción de los anticuerpos en el medio de cultivo)

* cultivo *in vivo* por inyección de las células en la cavidad peritoneal de ratones. Esto provoca la aparición de un tumor, de una inflamación y de una producción de líquido de ascitis en la zona de inyección. Extracción del líquido de ascitis que contiene los anticuerpos (1 a 10 mg/ml).

Hibridomas específicos

1 - Inmunización

Se inmunizaron 6 ratones hembras OF1 Charles River (19-20 g) mediante inyección intravenosa y subcutánea de una mezcla de péptidos SEC ID n° 7 a 11, estando los 5 péptidos acoplados a la KLH (hemocianina de *Megathura crenulata*) en presencia de adyuvante completo de Freund. Tres ratones (ratones 1 a 3) recibieron 50 µg de la mezcla de los péptidos y 2 ratones (ratones 4 y 5) recibieron 15 µg de la mezcla de los péptidos.

Tres semanas después de la primera inyección, los ratones se reinyectan con la mezcla de los dos péptidos en presencia de adyuvante incompleto de Freund (1° recuerdo).

Tres semanas después de la segunda inyección, los ratones se reinyectaron con la mezcla de los dos péptidos en presencia de adyuvante incompleto de Freund (segundo recuerdo).

Un mes después de la primera inyección, se extrajeron unas muestras de suero de los ratones inyectados, se ensayaron dichos sueros para la presencia de anticuerpos dirigidos contra los péptidos SEC ID n° 7 a 11.

Los sueros de todos los ratones presentaban unos anticuerpos que reconocen por lo menos uno de los péptidos y así se conservaron.

Diez días después del ensayo del suero, 3 ratones recibieron un estímulo intraperitoneal e intravenoso de 20 µg de la mezcla de los péptidos. Los bazos se extrajeron 3 días después de dicho estímulo.

Un mes después del ensayo del suero, los 3 ratones restantes han recibido un estímulo intraperitoneal e intravenoso de 15 µg de la mezcla de los péptidos. Los bazos se extrajeron 3 días después de dicho estímulo.

2 - Fusión celular

Los ratones se sangraron y sus bazos se extrajeron estérilmente con DMEM. Los bazos se trituraron y filtraron sobre rejilla.

En paralelo, la cavidad intraperitoneal de los ratones se lava con DMEM, y se recupera el DMEM que comprende unos macrófagos. Los macrófagos se contaron en una célula de Malassez con el fin de preparar una solución de 104

ES 2 453 974 T3

macrófagos/ml en medio DMEM HAT SVF 20% ATB (DMEM, 4 mM glutamina, HAT (hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM, timidina 16 µM), 20% de suero de ternera fetal descomplementado, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina)).

5 Los esplenocitos obtenidos se lavaron entonces tres veces con DMEM.

En paralelo, unas células de mieloma de ratones BalB/c Sp2/O Ag14 (ATCC n° CRL 1581) son asimismo lavadas 3 veces en DMEM.

10 Los esplenocitos y las células de mieloma se mezclaron con una relación esplenocitos/mieloma de 5/1 y se centrifugaron con 244 g durante 7 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PEG (solución al 40% de polietilenglicol, PM 1500 calentada a 37°C).

15 Las células se centrifugaron a 800 rpm (108 g) durante 12 minutos, se añadieron lentamente 10 ml de medio DMEM HAT SVF 20% ATB (DMEM, 4 mM glutamina, HAT (hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM, timidina 16 µM), 20% de suero de ternera fetal descomplementado).

20 Las células se centrifugaron a 1200 rpm (244 g) durante 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió sobre el residuo un volumen v de medio DMEM HAT SVF 20% tal que:

$v \text{ (en ml)} = nb \text{ de esplenocitos} / 107 \text{ (es decir } 107 \text{ células/ml)}$

25 El tubo se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora antes de darle la vuelta delicadamente para reponer las células en suspensión.

En unas placas de 96 pocillos, se añadieron 100 µl/pocillo de la solución con 104 macrófagos/ml y después se añadieron 100 µl por pocillo de células fusionadas a las diluciones siguientes:

30 dilución 1/10: 3 placas con 105 esplenocitos por pocillo
dilución 1/20: 5 placas (2 x 50 ml) con 5 x 104 esplenocitos por pocillo
dilución 1/40: 2 placas con 2,5 x 104 esplenocitos por pocillo

35 Las placas se colocaron en la estufa a 37°C, 5% de CO2 durante 10 días.

3 - Selección de los hibridomas

Después de 10 días de cultivo de los productos de fusión, se realizaron dos ensayos de selección:

- 40
- Ensayo 1: se analizan los pocillos cuyas células han alcanzado la confluencia:
 - para las fusiones procedentes de los esplenocitos de los 3 primeros ratones, y después se analizaron 1017 pocillos,
 - 45 - para las fusiones procedentes de los esplenocitos de los 3 últimos ratones, y después se analizaron 714 pocillos.

50 Se extrajeron 100 µl de sobrenadante de cada uno de estos pocillos y se ensayaron dichos sobrenadantes mediante un ensayo ELISA para la detección de los anticuerpos dirigidos contra uno o varios péptidos SEC ID n° 7 a 11 (véase Cribado de los sobrenadantes de los hibridomas anti-IRAP).

55 Después del ensayo ELISA, las células seleccionadas (que segregan unos anticuerpos dirigidos contra uno o varios péptidos SEC ID n° 7 a 11) se pasaron en 0,4 ml de medio en pocillo de una placa de 24 pocillos.

Cuando las células empezaban a multiplicarse (24 a 48 horas) a 1 ml del medio DMEM HAT SVF 15% HCF 1% ATB (DMEM, 4 mM glutamina, HAT (hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM, timidina 16 µM), se añadieron 15% de suero de ternera fetal descomplementado, 1% de HCF (hybridoma cloning factor macrophage-like origin), 1% de antibióticos (penicilina/Estreptomicina)).

60 Se seleccionaron y congelaron así 111 clones.

- Ensayo 2: se analizan los pocillos cuyas células procedentes de los 111 clones, seleccionados por el ensayo 1, alcanzaron la confluencia:
 - para las fusiones procedentes de los esplenocitos de los 3 primeros ratones, se analizaron después 39

pocillos de placa de 24 pocillos,

- para las fusiones procedentes de los esplenocitos de los 3 últimos ratones, se analizaron después 72 pocillos de placa de 24 pocillos,

5 se extrajeron 100 µl de sobrenadante de cada uno de estos pocillos y se ensayaron dichos sobrenadantes mediante un ensayo ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos contra el dominio segregado de la IRAP (véase Cribado de los sobrenadantes de los hibridomas anti-IRAP).

10 Se seleccionaron y congelaron así 23 clones.

4 - Cribado de los sobrenadantes de los hibridomas anti-IRAP

15 Antígenos (Ag) utilizados: KLH-péptidos SEC ID nº 7 a 11 (1º screening) y dominio segregado de la IRAP recombinante expresado en unas células de insecto HighFive (segundo screening).

ETAPAS	CONDICIONES
Coating (adsorción de Ag.) Concentración de Ag Tampón Volumen / pocillo Incubación	Placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) 1 µg/ml PBS 50 µl 1 noche a temperatura ambiente
Lavado: x1	PBS - 0,05% (v/v) Tween 20
Saturación Tampón Volumen / pocillo Incubación	PBS-leche 2,5% (p/v) 150 µl 1h a 25°C
Lavado: x1	PBS - 0,05% (v/v) Tween 20
Anticuerpo a ensayar Sobrenadante de cultivo puro Volumen / pocillo Incubación	50 µl 2h a 25°C
Lavado: x3	PBS - 0,05% (v/v) Tween 20
Anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa) Dilución Tampón Volumen / pocillo Incubación	Anti-IgG e IgM (115-036-044, Jackson) 1/10 000 PBS-0,05% (v/v) Tween 20-0,5% (p/v) BSA 50 µl 1h a 25°C
Lavado: x3	PBS - 0,05% (v/v) Tween 20
Revelación Reactivo Volumen / pocillo Incubación	Tetrametilbenzidina (50-76-05, KPL, Inc.) 50 µl 10 min.
Parada de la reacción Volumen	H ₂ SO ₄ 1M (S1526, Sigma) 50 µl

5 - Isotipado de los anticuerpos

20 El isotipo de los anticuerpos se determinó utilizando el kit SouthernBiotech SBA Clonotyping System/HRP (Cliniscience, Montrouge, Francia) de la siguiente manera:

1. Coating de las placas

25 Diluir el anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratones a la concentración de 5 µg/ml. Depositar 50 µl por pocillo e incubar durante 1 hora a 37°C o 16 horas a temperatura ambiente.

2. Lavado

30 Aclarar 1 vez con 200 µl/pocillo de PBS-Tween 20 0,05% (v/v).

3. Bloqueo

Añadir en cada pocillo 150 µl de PBS-leche 2,5% (p/v) e incubar durante 1 hora a 37°C.

35

4. Lavado

Aclarar 1 vez con el tampón PBS-Tween 20 0,05% (v/v).

5 5. Preparación de las muestras de anticuerpos a ensayar

Diluir los sobrenadantes de cultivo del hibridoma al 1/10 en PBS-Tween 20 0,05% (v/v)-BSA 0,5% (p/v). Depositar 50 µl por pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

10 6. Lavado

Aclarar 3 veces con el tampón PBS-Tween 20 0,05% (v/v).

15 7. Anticuerpo secundario

Depositar 50 µl por pocillo de anticuerpo anti-ratón IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgM conjugados con peroxidasa (HRP) (diluidos al 1/2000 en PBS-Tween20 0,05%(v/v)-BSA 0,5%(p/v)) e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

20 8. Lavado

Aclarar 3 veces con el tampón PBS-Tween20 0,05%(v/v).

25 9. Reacción con el sustrato

Depositar 50 µl por pocillo de tetrametilbencidina (KPL, Inc.) e incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente.

30 10. Parada de la reacción

Añadir 50 µl de H₂SO₄ en cada pocillo y leer la absorbencia a 450 nm, con lector de microplacas (Dy nex).

6 - Resultados

35 Se conservaron 5 hibridomas: 17H10, 14A4, 4G6, 38E1, 40C10 por su excelente afinidad para uno de los péptidos SEC ID n° 7 a 11, así como para el dominio segregado de la IRAP, recombinante como se indica en las figuras 1A-E.

40 Cada uno de los anticuerpos 17H10, 14A4, 4G6, 38E1, 40C10 se ensayó mediante ELISA sobre unas placas en las que se inmovilizaron 1 mg/ml de IRAP, o 2 mg/ml de IRAP etiquetado con una etiqueta 6 His. Los anticuerpos son incubados en las placas, y su detección se revela con la ayuda de un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (HRP), que reconoce la parte constante de los anticuerpos monoclonales. El complejo inmune IRAP-anticuerpo monoclonal-anticuerpo marcado se revela con TMB ((3,3',5,5'-tetrametilbencidina), un sustrato cromógeno de la peroxidasa, cuyo color cambia al azul en presencia de peróxido de hidrógeno y cuyo color se vuelve amarillo en presencia de ácido sulfúrico (parada de la reacción). La reacción se puede cuantificar mediante
45 detección a 450 nm.

Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos monoclonales seleccionados pueden ser utilizados como anticuerpos para la detección del dominio segregado de la IRAP en ELISA sándwich. La curva dosis-respuesta indica un límite de detección del dominio segregado de la IRAP de 1 a 100 ng/ml según el anticuerpo.

50 Los clones se conservaron y clonaron realizando unas diluciones límites en unas placas de 96 pocillos que contienen 10, 5, 3, 1 o 5 células de media por pocillos.

55 Los productos de la clonación se congelaron en un medio DMEM HT SVF 15% HCF 1% ATB (2): DMEM, 4 mM glutamina, HAT (hipoxantina 100 µM, timidina 16 µM), 15% de suero de ternera fetal descomplementado, 1% de HEF (hibridoma enhancing supplement), 1% de antibióticos (penicilina/estreptovidina) completado con el 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido)

60 **Ejemplo 3: Dosificación de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o una de sus variantes mediante un método inmunoenzimático en el suero o el plasma**

La proteína IRAP y/o una de sus isoformas, buscada en el suero o el plasma, se enlaza mediante el anticuerpo específico absorbido en unas placas multi-pocillos. La proteína IRAP así como sus isoformas, incluso una o varias de sus variantes enlazadas, son después reveladas y cuantificadas mediante medición de su actividad enzimática
65 utilizando la L-leucina-paranitroanilida como sustrato en presencia de 20 mM de L-metionina, permitiendo esta última evitar una reacción cruzada con eventuales contaminaciones por otras aminopeptidasas (Yamahara, N., Nomura, S.,

Suzuki, T., Itakura, A., Ito, M., Okamoto, T., Tsujimôto, M., Nakazato, H., y Mizutani, S. (2000) Life Sci 66(15), 1401-1410).

5 Los métodos enzimáticos, y en particular los que utilizan el sustrato L-leucina-paranitroanilida, permiten detectar la IRAP a partir de una concentración de 10 µg/ml. Un enriquecimiento de la IRAP por inmunocaptura reduce el límite de detección a 1 µg/ml.

Sin embargo, estos límites de detección elevados son poco compatibles con la detección de la IRAP en el suero.

10 Así, la utilización de anticuerpos monoclonales muy específicos para purificar la IRAP es indispensable, con el fin de disminuir el límite de detección.

Con el fin de validar la eficacia de los anticuerpos monoclonales, se realizó un ELISA sándwich utilizando los anticuerpos 14H10 y 4G6.

15 El anticuerpo monoclonal 17H10 se utiliza como anticuerpo de captura a 15 µg/ml y el anticuerpo monoclonal 4G6 se utiliza como anticuerpo de detección. Los complejos 17H10-IRAP-4G6 son revelados mediante un anticuerpo anti-isotipo dirigido contra las IgG2a de ratones conjugado con peroxidasa (HRP), a partir de muestras de la IRAP recombinante, o de plasma de mujer embarazada (14-16 semanas) o de hombre.

20 Los resultados están indicados en la figura 2.

En estas condiciones de utilización, la combinación de anticuerpo 17H10 - 4G6 -anti-IgG2a/HRP permite detectar el dominio segregado de la proteína IRAP hasta una concentración de 0,1 µg/ml.

25 Esta combinación no permite detectar la IRAP en estos plasmas a las diluciones ensayadas. La utilización de un cuarto anticuerpo anti-HRP conjugado con fosfatasa alcalina permite aumentar la sensibilidad hasta 1 ng/ml.

30 **Ejemplo 4: Dosificación de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o de una de sus variantes mediante un método inmunohistoquímico en los tejidos humanos.**

El ensayo inmunohistoquímico se efectuó utilizando la técnica avidina-biotina inmunoperoxidasa. Se efectuaron unos cortes de tejidos humanos previamente extraídos de un grosor de 4 µm y se marcaron mediante el método estreptavidina/biotina/peroxidasa.

35 Los cortes liberados de sus parafinas se colocaron en un tampón citrato 0,01 M y se trataron tres veces durante 5 minutos cada uno a 90°C y 750 W en un horno de microondas.

40 Después, los cortes se incubaron en agua oxigenada durante 20 minutos y se incubaron con un suero del animal hospedante del anticuerpo secundario al 10% durante 10 minutos para bloquear la actividad peroxidasa endógena y la unión con las inmunoglobulinas no específicas, respectivamente.

45 Un anticuerpo monoclonal del ejemplo 2 a una dilución de 1:100 se añadió a los cortes de tejidos y se incubó durante 1 hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente para la dosificación de IRAP y/o de sus isoformas y/o de una de sus variantes.

La unión del anticuerpo se reveló mediante un anticuerpo anti-Ig de ratones biotinilado, seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante.

50 El desarrollo cromogénico se efectuó mediante inmersión de los cortes en un 3-amino-9-etilcarbazol.

Los clichés se analizaron por coloración de contraste con hematoxilina de Mayer.

55 **Ejemplo 5: Dosificación de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o una de sus variantes para el pronóstico de la quimiorresistencia.**

La quimiorresistencia es la consecuencia de la sobreexpresión de la IRAP. Por lo tanto se puede dosificar según el ejemplo 3 o 4 o mediante RIA o IRMA.

60 **Ejemplo 6: Dosificación de la proteína IRAP y/o de una de sus isoformas y/o una de sus variantes para medir la aparición de parto prematuro.**

La concentración de la IRAP aumenta durante el embarazo. Por lo tanto se puede predecir en caso de bajada de la concentración circulante de la IRAP dosificada según el ejemplo 3 o 4 o mediante RIA o IRMA.

65 **Ejemplo 7: Especificidad de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la parte extracelular de IRAP.**

Con el fin de validar la especificidad de los anticuerpos de la invención, se realizaron unas mediciones de interacción IRAP-anticuerpo en presencia de sueros diluidos o no.

5 La interacción anticuerpo-IRAP se midió en función de la concentración en IRAP recombinante, o de IRAP recombinante diluida en suero de hombre o de mujer embarazada diluido al 1/100, con la ayuda de ELISA sándwich utilizando los anticuerpos 17H10 y 40C10.

Los resultados son mostrados en la figura 3.

10 Estos resultados muestran que la IRAP es detectable a una concentración de 0,1 µg/ml en un suero diluido, sin que haya interferencia con las otras aminopeptidasas contenidas en el suero.

Estos resultados muestran que los anticuerpos monoclonales son muy específicos de IRAP.

15

Listado de secuencias

<110> Université Joseph Fourier BOTTARI, Serge

20 <120> UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA IRAP PARA LA REALIZACIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y DE PRONÓSTICO

<130> WOB 08 AW UJF IRAP

25 <150> FR 08/03802
<151> 2004-07-04

<150> FR 08/03802
<151> 2008-07-04

30

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 1025
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(1025)

45 <400> 1

ES 2 453 974 T3

Met Glu Pro Phe Thr Asn Asp Arg Leu Gln Leu Pro Arg Asn Met Ile
1 5 10 15

Glu Asn Ser Met Phe Glu Glu Glu Pro Asp Val Val Asp Leu Ala Lys
 20 25 30

Glu Pro Cys Leu His Pro Leu Glu Pro Asp Glu Val Glu Tyr Glu Pro
 35 40 45

Arg Gly Ser Arg Leu Leu Val Arg Gly Leu Gly Glu His Glu Met Glu
 50 55 60

Glu Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Ser Ser Ala Lys Leu Leu Gly Met Ser
65 70 75 80

Phe Met Asn Arg Ser Ser Gly Leu Arg Asn Ser Ala Thr Gly Tyr Arg
 85 90 95

Gln Ser Pro Asp Gly Ala Cys Ser Val Pro Ser Ala Arg Thr Met Val
 100 105 110

Val Cys Ala Phe Val Ile Val Val Ala Val Ser Val Ile Met Val Ile

ES 2 453 974 T3

	115		120		125														
Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Cys	Thr	Phe	Thr	Lys	Glu	Gly	Cys	His	Lys	Lys				
	130					135					140								
Asn	Gln	Ser	Ile	Gly	Leu	Ile	Gln	Pro	Phe	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Leu				
145					150					155					160				
Phe	Pro	Trp	Ala	Gln	Ile	Arg	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Arg				
				165					170					175					
Tyr	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Pro	Asn	Leu	Thr	Ser	Met	Thr	Phe	Arg	Gly				
			180					185					190						
Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Val	Thr	Trp	Asn	Ile	Ile				
		195					200					205							
Leu	His	Ser	Thr	Gly	His	Asn	Ile	Ser	Arg	Val	Thr	Phe	Met	Ser	Ala				
	210					215					220								
Val	Ser	Ser	Gln	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	His				
225					230					235					240				
Gly	Gln	Ile	Ala	Ile	Val	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	His	Asn				
				245					250					255					
Tyr	Thr	Leu	Lys	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ala	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr				
			260					265					270						
Gly	Phe	Tyr	Gly	Phe	Ser	Tyr	Thr	Asp	Glu	Ser	Asn	Glu	Lys	Lys	Tyr				
		275					280					285							
Phe	Ala	Ala	Thr	Gln	Phe	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Ala	Phe	Pro				
	290					295					300								
Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Ala	Phe	Lys	Ala	Thr	Phe	Ile	Ile	Lys	Ile	Ile				
305					310					315					320				
Arg	Asp	Glu	Gln	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ser	Asn	Met	Pro	Lys	Lys	Ser	Ser				
				325					330					335					
Val	Val	Leu	Asp	Asp	Gly	Leu	Val	Gln	Asp	Glu	Phe	Ser	Glu	Ser	Val				
			340					345					350						
Lys	Met	Ser	Thr	Tyr	Leu	Val	Ala	Phe	Ile	Val	Gly	Glu	Met	Lys	Asn				
		355					360					365							

ES 2 453 974 T3

Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro
 370 375 380

Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu
 385 390 395 400

Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys
 405 410 415

Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn
 420 425 430

Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn
 435 440 445

Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His
 450 455 460

Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe
 485 490 495

Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu
 500 505 510

Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His
 515 520 525

Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe
 530 535 540

Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys
 545 550 555 560

Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu
 565 570 575

His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser
 580 585 590

Phe Asn Glu Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys
 595 600 605

ES 2 453 974 T3

Thr Trp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys
 610 615 620

Gly Lys Glu Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys
 625 630 635 640

Pro Glu Ile Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile Pro Leu
 645 650 655

Ser Tyr Val Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser Val Ser
 660 665 670

Leu Leu Asp Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu Val Leu
 675 680 685

Trp Val Lys Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val His Tyr
 690 695 700

Ala Asp Asp Asp Trp Glu Ala Leu Ile His Gln Leu Lys Ile Asn Pro
 705 710 715 720

Tyr Val Leu Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn Leu Ile Asn Asn Ile Phe
 725 730 735

Glu Leu Ala Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu Lys Arg Ala Phe Asp Leu
 740 745 750

Ile Asn Tyr Leu Gly Asn Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Thr Glu Ala
 755 760 765

Leu Phe Gln Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Leu Gly Tyr
 770 775 780

Met Asp Leu Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg Val Phe Lys Leu Leu Gln
 785 790 795 800

Asn Gln Ile Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp Glu Gly Thr Pro Ser Met
 805 810 815

Arg Glu Leu Arg Ser Ala Leu Leu Glu Phe Ala Cys Thr His Asn Leu
 820 825 830

Gly Asn Cys Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu Phe Asp Asp Trp Met Ala
 835 840 845

ES 2 453 974 T3

Ser Asn Gly Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe
 850 855 860

Lys Val Gly Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys
 865 870 875 880

Tyr Ile Ser Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala
 885 890 895

Leu Ala Ser Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser
 900 905 910

Ser Leu Asn Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile
 915 920 925

Arg Thr Val Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe
 930 935 940

Val Lys Glu Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser
 945 950 955 960

Tyr Thr Ile Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr
 965 970 975

Lys Thr His Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu
 980 985 990

Ala Thr Phe Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln
 995 1000 1005

Leu Asn Ile Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp
 1010 1015 1020

Trp Leu
 1025

- <210> 2
- <211> 1011
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(1011)

<400> 2

Met Ile Glu Asn Ser Met Phe Glu Glu Glu Pro Asp Val Val Asp Leu

ES 2 453 974 T3

1	5	10	15
Ala Lys Glu Pro Cys Leu His Pro Leu Glu Pro Asp Glu Val Glu Tyr	20	25	30
Glu Pro Arg Gly Ser Arg Leu Leu Val Arg Gly Leu Gly Glu His Glu	35	40	45
Met Glu Glu Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Ser Ser Ala Lys Leu Leu Gly	50	55	60
Met Ser Phe Met Asn Arg Ser Ser Gly Leu Arg Asn Ser Ala Thr Gly	65	70	80
Tyr Arg Gln Ser Pro Asp Gly Ala Cys Ser Val Pro Ser Ala Arg Thr	85	90	95
Met Val Val Cys Ala Phe Val Ile Val Val Ala Val Ser Val Ile Met	100	105	110
Val Ile Tyr Leu Leu Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His	115	120	125
Lys Lys Asn Gln Ser Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly	130	135	140
Lys Leu Phe Pro Trp Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro	145	150	160
Leu Arg Tyr Glu Leu Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe	165	170	175
Arg Gly Ser Val Thr Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn	180	185	190
Ile Ile Leu His Ser Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met	195	200	205
Ser Ala Val Ser Ser Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala	210	215	220
Tyr His Gly Gln Ile Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly	225	230	240
His Asn Tyr Thr Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser	245	250	255

ES 2 453 974 T3

Tyr Tyr Gly Phe Tyr Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys
 260 265 270

Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala
 275 280 285

Phe Pro Cys Phe Asp Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys
 290 295 300

Ile Ile Arg Asp Glu Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu
 325 330 335

Ser Val Lys Met Ser Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met
 340 345 350

Lys Asn Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala
 355 360 365

Val Pro Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val
 370 375 380

Lys Leu Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu
 385 390 395 400

Lys Lys Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met
 405 410 415

Glu Asn Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp
 420 425 430

Ser Asn Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile
 435 440 445

Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys
 450 455 460

Trp Trp Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu
 465 470 475 480

Tyr Phe Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp
 485 490 495

ES 2 453 974 T3

Phe Leu Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser
 500 505 510

Ser His Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu
 515 520 525

Met Phe Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met
 530 535 540

Leu Lys Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu
 545 550 555 560 565

Tyr Leu His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp
 565 570 575

Asp Ser Phe Asn Glu Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met
 580 585 590

Met Lys Thr Trp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln
 595 600 605

Lys Lys Gly Lys Glu Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn
 610 615 620

Met Lys Pro Glu Ile Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile
 625 630 635 640

Pro Leu Ser Tyr Val Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser
 645 650 655

Val Ser Leu Leu Asp Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu
 660 665 670

Val Leu Trp Val Lys Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val
 675 680 685

His Tyr Ala Asp Asp Asp Trp Glu Ala Leu Ile His Gln Leu Lys Ile
 690 695 700

Asn Pro Tyr Val Leu Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn Leu Ile Asn Asn
 705 710 715 720

Ile Phe Glu Leu Ala Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu Lys Arg Ala Phe
 725 730 735

ES 2 453 974 T3

Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Gly Asn Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Thr
 740 745 750

Glu Ala Leu Phe Gln Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Leu
 755 760 765

Gly Tyr Met Asp Leu Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg Val Phe Lys Leu
 770 775 780

Leu Gln Asn Gln Ile Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp Glu Gly Thr Pro
 785 790 795 800

Ser Met Arg Glu Leu Arg Ser Ala Leu Leu Glu Phe Ala Cys Thr His
 805 810 815

Asn Leu Gly Asn Cys Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu Phe Asp Asp Trp
 820 825 830

Met Ala Ser Asn Gly Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr
 835 840 845

Val Phe Lys Val Gly Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu
 850 855 860

Gly Lys Tyr Ile Ser Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu
 865 870 875 880

Glu Ala Leu Ala Ser Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met
 885 890 895

Lys Ser Ser Leu Asn Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe
 900 905 910

Ile Ile Arg Thr Val Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp
 915 920 925

Asp Phe Val Lys Glu Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu
 930 935 940

Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe
 945 950 955 960

Ser Thr Lys Thr His Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln
 965 970 975

Ser Glu Ala Thr Phe Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val
 980 985 990

Ile Gln Leu Asn Ile Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr
 995 1000 1005

Trp Trp Leu
 1010

ES 2 453 974 T3

<211> 1006
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(1006)

<400> 3

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

10

ES 2 453 974 T3

Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr
 165 170 175

Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser
 180 185 190

Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser
 195 200 205

Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile
 210 215 220

Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu
 225 230 235 240

Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr
 245 250 255

Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala
 260 265 270

Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp
 275 280 285

Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu
 290 295 300

Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu
 305 310 315 320

Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser
 325 330 335

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln
 340 345 350

Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile
 355 360 365

Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe
 370 375 380

Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu
 385 390 395 400

ES 2 453 974 T3

Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu
 405 410 415

Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser
 420 425 430

Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala
 435 440 445

His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu
 450 455 460

Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu
 465 470 475 480

Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg
 485 490 495

Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser
 500 505 510

Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu
 515 520 525

Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu
 530 535 540

Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His
 545 550 555 560

Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu
 565 570 575

Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr
 580 585 590

Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys Gly Lys Glu
 595 600 605

Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys Pro Glu Ile
 610 615 620

Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile Pro Leu Ser Tyr Val
 625 630 635 640

ES 2 453 974 T3

Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser Val Ser Leu Leu Asp
645 650 655

Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu Val Leu Trp Val Lys
660 665 670

Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val His Tyr Ala Asp Asp
675 680 685

Asp Trp Glu Ala Leu Ile His Gln Leu Lys Ile Asn Pro Tyr Val Leu
690 695 700

Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn Leu Ile Asn Asn Ile Phe Glu Leu Ala
705 710 715 720

Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu Lys Arg Ala Phe Asp Leu Ile Asn Tyr
725 730 735

Leu Gly Asn Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Thr Glu Ala Leu Phe Gln
740 745 750

Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Met Asp Leu
755 760 765

Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg Val Phe Lys Leu Leu Gln Asn Gln Ile
770 775 780

Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp Glu Gly Thr Pro Ser Met Arg Glu Leu
785 790 795 800

Arg Ser Ala Leu Leu Glu Phe Ala Cys Thr His Asn Leu Gly Asn Cys
805 810 815

Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu Phe Asp Asp Trp Met Ala Ser Asn Gly
820 825 830

Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe Lys Val Gly
835 840 845

Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys Tyr Ile Ser
850 855 860

Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser
865 870 875 880

Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn

ES 2 453 974 T3

				885						890									895
Gly	Asp	Asn	Phe	Arg	Thr	Gln	Lys	Leu	Ser	Phe	Ile	Ile	Arg	Thr	Val				
			900					905					910						
Gly	Arg	His	Phe	Pro	Gly	His	Leu	Leu	Ala	Trp	Asp	Phe	Val	Lys	Glu				
		915					920					925							
Asn	Trp	Asn	Lys	Leu	Val	Gln	Lys	Phe	Pro	Leu	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile				
	930					935					940								
Gln	Asn	Ile	Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Tyr	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Thr	His				
945					950					955					960				
Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Ala	Phe	Phe	Glu	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Thr	Phe				
				965					970						975				
Arg	Leu	Arg	Cys	Val	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu	Val	Ile	Gln	Leu	Asn	Ile				
			980					985						990					
Gln	Trp	Met	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Trp	Trp	Leu						
		995					1000						1005						

<210> 4
 <211> 1025
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(1025)

<400> 4

Met	Glu	Pro	Phe	Thr	Asn	Asp	Arg	Leu	Gln	Leu	Pro	Arg	Asn	Met	Ile				
1				5					10					15					
Glu	Asn	Ser	Met	Phe	Glu	Glu	Glu	Pro	Asp	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Lys				
			20					25					30						
Glu	Pro	Cys	Leu	His	Pro	Leu	Glu	Pro	Asp	Glu	Val	Glu	Tyr	Glu	Pro				
		35					40					45							
Arg	Gly	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	His	Glu	Met	Glu				
	50					55					60								
Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Tyr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Met	Ser				
65					70					75				80					

ES 2 453 974 T3

Arg Asp Glu Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser
 325 330 335

Val Val Leu Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val
 340 345 350

Lys Met Ser Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn
 355 360 365

Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro
 370 375 380

Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu
 385 390 395 400

Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys
 405 410 415

Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn
 420 425 430

Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn
 435 440 445

Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His
 450 455 460

Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe
 485 490 495

Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu
 500 505 510

Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His
 515 520 525

Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe
 530 535 540

Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys
 545 550 555 560

ES 2 453 974 T3

Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu
565 570 575

His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser
580 585 590

Phe Asn Glu Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys
595 600 605

Thr Trp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys
610 615 620

Gly Lys Glu Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys
625 630 635 640

Pro Glu Ile Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile Pro Leu
645 650 655

Ser Tyr Val Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser Val Ser
660 665 670

Leu Leu Asp Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu Val Leu
675 680 685

Trp Val Lys Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val His Tyr
690 695 700

Ala Asp Asp Asp Trp Glu Ala Leu Ile His Gln Leu Lys Ile Asn Pro
705 710 715 720

Tyr Val Leu Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn Leu Ile Asn Asn Ile Phe
725 730 735

Glu Leu Ala Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu Lys Arg Ala Phe Asp Leu
740 745 750

Ile Asn Tyr Leu Gly Asn Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Thr Glu Ala
755 760 765

Leu Phe Gln Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Leu Gly Tyr
770 775 780

Met Asp Leu Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg Val Phe Lys Leu Leu Gln
785 790 795 800

Asn Gln Ile Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp Glu Gly Thr Pro Ser Met

ES 2 453 974 T3

Met Glu Pro Phe Thr Asn Asp Arg Leu Gln Leu Pro Arg Asn Met Ile
 1 5 10 15

Glu Asn Ser Met Phe Glu Glu Glu Pro Asp Val Val Asp Leu Ala Lys
 20 25 30

Glu Pro Cys Leu His Pro Leu Glu Pro Asp Glu Val Glu Tyr Glu Pro
 35 40 45

Arg Gly Ser Arg Leu Leu Val Arg Gly Leu Gly Glu His Glu Met Glu
 50 55 60

Glu Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Ser Ser Ala Lys Leu Leu Gly Met Ser
 65 70 75 80

Phe Met Asn Arg Ser Ser Gly Leu Arg Asn Ser Ala Thr Gly Tyr Arg
 85 90 95

Gln Ser Pro Asp Gly Ala Cys Ser Val Pro Ser Ala Arg Thr Met Val
 100 105 110

Val Cys Ala Phe Val Ile Val Val Ala Val Ser Val Ile Met Val Ile
 115 120 125

Tyr Leu Leu Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys
 130 135 140

Asn Gln Ser Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu
 145 150 155 160

Phe Pro Trp Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg
 165 170 175

Tyr Glu Leu Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly
 180 185 190

Ser Val Thr Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile
 195 200 205

ES 2 453 974 T3

Leu His Ser Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala
 210 215 220
 Val Ser Ser Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His
 225 230 235 240
 Gly Gln Ile Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn
 245 250 255
 Tyr Thr Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr
 260 265 270
 Gly Phe Tyr Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr
 275 280 285
 Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro
 290 295 300
 Cys Phe Asp Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile
 305 310 315 320
 Arg Asp Glu Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser
 325 330 335
 Val Val Leu Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val
 340 345 350
 Lys Met Ser Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn
 355 360 365
 Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro
 370 375 380
 Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu
 385 390 395 400
 Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys
 405 410 415
 Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn
 420 425 430
 Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn
 435 440 445

ES 2 453 974 T3

Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His
450 455 460

Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp
465 470 475 480

Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe
485 490 495

Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu
500 505 510

Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His
515 520 525

Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe
530 535 540

Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys
545 550 555 560

Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu
565 570 575

His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser
580 585 590

Phe Asn Glu Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys
595 600 605

Thr Trp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys
610 615 620

Gly Lys Glu Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys
625 630 635 640

Pro Glu Ile Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile Pro Leu
645 650 655

Ser Tyr Val Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser Val Ser
660 665 670

Leu Leu Asp Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu Val Leu
675 680 685

Trp Val Lys Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val His Tyr

ES 2 453 974 T3

690						695									700
Ala	Asp	Asp	Asp	Trp	Glu	Ala	Leu	Ile	His	Gln	Leu	Lys	Ile	Asn	Pro
705					710					715					720
Tyr	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ile	Phe
				725					730					735	
Glu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Lys	Val	Pro	Leu	Lys	Arg	Ala	Phe	Asp	Leu
			740					745					750		
Ile	Asn	Tyr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asn	His	Thr	Thr	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
		755					760					765			
Leu	Phe	Gln	Thr	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Tyr
	770					775					780				
Met	Asp	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Arg	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Gln
785					790					795					800
Asn	Gln	Ile	Gln	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Pro	Ser	Met
			805						810					815	
Arg	Glu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Phe	Ala	Cys	Thr	His	Asn	Leu
			820					825					830		
Gly	Asn	Cys	Ser	Thr	Thr	Ala	Met	Lys	Leu	Phe	Asp	Asp	Trp	Met	Ala
		835					840					845			
Ser	Asn	Gly	Thr	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Val	Met	Thr	Thr	Val	Phe
	850					855					860				
Lys	Val	Gly	Ala	Lys	Thr	Asp	Lys	Gly	Trp	Ser	Phe	Leu	Leu	Gly	Lys
865					870					875					880
Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Asn	Lys	Ile	Leu	Glu	Ala
				885					890					895	
Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Asp	Val	Arg	Lys	Leu	Tyr	Trp	Leu	Met	Lys	Ser
			900					905					910		
Ser	Leu	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	Arg	Thr	Gln	Lys	Leu	Ser	Phe	Ile	Ile
		915					920					925			
Arg	Thr	Val	Gly	Arg	His	Phe	Pro	Gly	His	Leu	Leu	Ala	Trp	Asp	Phe
	930					935						940			

ES 2 453 974 T3

Val Lys Glu Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser
 945 950 955 960

Tyr Thr Ile Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr
 965 970 975

Lys Thr His Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu
 980 985 990

Ala Thr Phe Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln
 995 1000 1005

Leu Asn Ile Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp
 1010 1015 1020

Trp Leu
 1025

<210> 6
 <211> 1025
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(1025)

<400> 6

Met Glu Pro Phe Thr Asn Asp Arg Leu Gln Leu Pro Arg Asn Met Ile
 1 5 10 15

Glu Asn Ser Met Phe Glu Glu Glu Pro Asp Val Val Asp Leu Ala Lys
 20 25 30

Glu Pro Cys Leu His Pro Leu Glu Pro Asp Glu Val Glu Tyr Glu Pro
 35 40 45

Arg Gly Ser Arg Leu Leu Val Arg Gly Leu Gly Glu His Glu Met Glu
 50 55 60

Glu Asp Glu Glu Asp Tyr Glu Ser Ser Ala Lys Leu Leu Gly Met Ser
 65 70 75 80

Phe Met Asn Arg Ser Ser Gly Leu Arg Asn Ser Ala Thr Gly Tyr Arg
 85 90 95

15

ES 2 453 974 T3

Gln Ser Pro Asp Gly Ala Cys Ser Val Pro Ser Ala Arg Thr Met Val
 100 105 110

Val Cys Ala Phe Val Ile Val Val Ala Val Ser Val Ile Met Val Ile
 115 120 125

Tyr Leu Leu Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys
 130 135 140

Asn Gln Ser Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu
 145 150 155 160

Phe Pro Trp Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg
 165 170 175

Tyr Glu Leu Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly
 180 185 190

Ser Val Thr Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile
 195 200 205

Leu His Ser Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala
 210 215 220

Val Ser Ser Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His
 225 230 235 240

Gly Gln Ile Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn
 245 250 255

Tyr Thr Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr
 260 265 270

Gly Phe Tyr Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr
 275 280 285

Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro
 290 295 300

Cys Phe Asp Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile
 305 310 315 320

Arg Asp Glu Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser
 325 330 335

ES 2 453 974 T3

Val Val Leu Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val
 340 345 350

Lys Met Ser Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn
 355 360 365

Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro
 370 375 380

Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu
 385 390 395 400

Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys
 405 410 415

Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn
 420 425 430

Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn
 435 440 445

Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His
 450 455 460

Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe
 485 490 495

Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu
 500 505 510

Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His
 515 520 525

Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe
 530 535 540

Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys
 545 550 555 560

Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu
 565 570 575

His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser

ES 2 453 974 T3

580					585					590					
Phe	Asn	Glu	Val	Thr	Asn	Gln	Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Arg	Met	Met	Lys
	595						600					605			
Thr	Trp	Thr	Leu	Gln	Lys	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Thr	Val	Gln	Lys	Lys
	610					615					620				
Gly	Lys	Glu	Leu	Phe	Ile	Gln	Gln	Glu	Arg	Phe	Phe	Leu	Asn	Met	Lys
625					630					635					640
Pro	Glu	Ile	Gln	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Tyr	Leu	Trp	His	Ile	Pro	Leu
				645					650					655	
Ser	Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Gln	Ser	Val	Ser
			660					665						670	
Leu	Leu	Asp	Lys	Lys	Ser	Gly	Val	Ile	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Leu
		675					680					685			
Trp	Val	Lys	Val	Asn	Ile	Asn	Met	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Val	His	Tyr
	690					695						700			
Ala	Asp	Asp	Asp	Trp	Glu	Ala	Leu	Ile	His	Gln	Leu	Lys	Ile	Asn	Pro
705					710					715					720
Tyr	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ile	Phe
				725					730					735	
Glu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Lys	Val	Pro	Leu	Lys	Arg	Ala	Phe	Asp	Leu
			740					745					750		
Ile	Asn	Tyr	Leu	Gly	Asn	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala
		755					760					765			
Leu	Phe	Gln	Thr	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Tyr
	770					775					780				
Met	Asp	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Arg	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Gln
785					790					795					800
Asn	Gln	Ile	Gln	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Pro	Ser	Met
				805					810					815	
Arg	Glu	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Phe	Ala	Cys	Thr	His	Asn	Leu
			820					825					830		

ES 2 453 974 T3

Gly Asn Cys Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu Phe Asp Asp Trp Met Ala
 835 840 845

Ser Asn Gly Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe
 850 855 860

Lys Val Gly Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys
 865 870 875 880

Tyr Ile Ser Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala
 885 890 895

Leu Ala Ser Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser
 900 905 910

Ser Leu Asn Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile
 915 920 925

Arg Thr Val Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe
 930 935 940

Val Lys Glu Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser
 945 950 955 960

Tyr Thr Val Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr
 965 970 975

Lys Thr His Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu
 980 985 990

Ala Thr Phe Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln
 995 1000 1005

Leu Asn Ile Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp
 1010 1015 1020

Trp Leu
 1025

- <210> 7
- <211> 894
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(894)
- <400> 7

ES 2 453 974 T3

Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys Asn Gln Ser
 1 5 10 15
 Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu Phe Pro Trp
 20 25 30
 Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr
 50 55 60
 Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser
 65 70 75 80
 Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser
 85 90 95
 Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile
 100 105 110
 Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu
 115 120 125
 Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr
 130 135 140
 Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala
 145 150 155 160
 Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp
 165 170 175
 Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu
 180 185 190
 Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu
 195 200 205
 Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser
 210 215 220

ES 2 453 974 T3

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln
 225 230 235 240

Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile
 245 250 255

Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe
 260 265 270

Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu
 275 280 285

Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu
 290 295 300

Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser
 305 310 315 320

Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala
 325 330 335

His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu
 340 345 350

Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu
 355 360 365

Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg
 370 375 380

Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu
 405 410 415

Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu
 420 425 430

Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His
 435 440 445

Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu
 450 455 460

Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr

ES 2 453 974 T3

465	470	475	480												
Leu	Gln	Lys	Gly	Phe	Pro	Leu	Val	Thr	Val	Gln	Lys	Lys	Gly	Lys	Glu
				485					490					495	
Leu	Phe	Ile	Gln	Gln	Glu	Arg	Phe	Phe	Leu	Asn	Met	Lys	Pro	Glu	Ile
			500					505					510		
Gln	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Tyr	Leu	Trp	His	Ile	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val
		515					520					525			
Thr	Glu	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Asp
	530						535				540				
Lys	Lys	Ser	Gly	Val	Ile	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Leu	Trp	Val	Lys
545						550				555					560
Val	Asn	Ile	Asn	Met	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Val	His	Tyr	Ala	Asp	Asp
				565					570					575	
Asp	Trp	Glu	Ala	Leu	Ile	His	Gln	Leu	Lys	Ile	Asn	Pro	Tyr	Val	Leu
			580					585					590		
Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ile	Phe	Glu	Leu	Ala
		595					600					605			
Gly	Leu	Gly	Lys	Val	Pro	Leu	Lys	Arg	Ala	Phe	Asp	Leu	Ile	Asn	Tyr
	610						615				620				
Leu	Gly	Asn	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln
625					630					635					640
Thr	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Tyr	Met	Asp	Leu
				645					650					655	
Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Arg	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Ile
			660					665					670		
Gln	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Pro	Ser	Met	Arg	Glu	Leu
		675					680					685			
Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Phe	Ala	Cys	Thr	His	Asn	Leu	Gly	Asn	Cys
	690					695					700				
Ser	Thr	Thr	Ala	Met	Lys	Leu	Phe	Asp	Asp	Trp	Met	Ala	Ser	Asn	Gly
705					710					715					720

ES 2 453 974 T3

Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe Lys Val Gly
 725 730 735

Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys Tyr Ile Ser
 740 745 750

Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser
 755 760 765

Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn
 770 775 780

Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile Arg Thr Val
 785 790 795 800

Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe Val Lys Glu
 805 810 815

Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser Tyr Thr Ile
 820 825 830

Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr Lys Thr His
 835 840 845

Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu Ala Thr Phe
 850 855 860

Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln Leu Asn Ile
 865 870 875 880

Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp Trp Leu
 885 890

<210> 8
 <211> 951
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(951)

<400> 8

Lys Leu Leu Gly Met Ser Phe Met Asn Arg Ser Ser Gly Leu Arg Asn
 1 5 10 15

15

ES 2 453 974 T3

Ser Ala Thr Gly Tyr Arg Gln Ser Pro Asp Gly Ala Cys Ser Val Pro
 20 25 30

Ser Ala Arg Thr Met Val Val Cys Ala Phe Val Ile Val Val Ala Val
 35 40 45

Ser Val Ile Met Val Ile Tyr Leu Leu Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys
 50 55 60

Glu Gly Cys His Lys Lys Asn Gln Ser Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Gly Lys Leu Phe Pro Trp Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr
 85 90 95

Ala Val Val Pro Leu Arg Tyr Glu Leu Ser Leu His Pro Asn Leu Thr
 100 105 110

Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln
 115 120 125

Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser Thr Gly His Asn Ile Ser Arg
 130 135 140

Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile
 145 150 155 160

Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala
 165 170 175

Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn
 180 185 190

Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu
 195 200 205

Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala
 210 215 220

Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr
 225 230 235 240

Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn
 245 250 255

ES 2 453 974 T3

Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp
 260 265 270

Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile
 275 280 285

Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln Asp Val Asn Gly Thr Leu Val
 290 295 300

Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile Gly Gln Val His Tyr Ala Leu
 305 310 315 320

Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile
 325 330 335

Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu
 340 345 350

Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr
 355 360 365

Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser Met Ala Asp Arg Lys Leu Val
 370 375 380

Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala His Gln Trp Phe Gly Asn Leu
 385 390 395 400

Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala
 405 410 415

Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser
 420 425 430

Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp
 435 440 445

Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu
 450 455 460

Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu Ser Glu Asp Val Phe Gln His
 485 490 495

Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser

ES 2 453 974 T3

500 505 510

Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp
515 520 525

Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu
530 535 540

Val Thr Val Gln Lys Lys Gly Lys Glu Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg
545 550 555 560

Phe Phe Leu Asn Met Lys Pro Glu Ile Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr
565 570 575

Leu Trp His Ile Pro Leu Ser Tyr Val Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser
580 585 590

Lys Tyr Gln Ser Val Ser Leu Leu Asp Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn
595 600 605

Leu Thr Glu Glu Val Leu Trp Val Lys Val Asn Ile Asn Met Asn Gly
610 615 620

Tyr Tyr Ile Val His Tyr Ala Asp Asp Asp Trp Glu Ala Leu Ile His
625 630 635 640

Gln Leu Lys Ile Asn Pro Tyr Val Leu Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn
645 650 655

Leu Ile Asn Asn Ile Phe Glu Leu Ala Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu
660 665 670

Lys Arg Ala Phe Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Gly Asn Glu Asn His Thr
675 680 685

Ala Pro Ile Thr Glu Ala Leu Phe Gln Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu
690 695 700

Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Met Asp Leu Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg
705 710 715 720

Val Phe Lys Leu Leu Gln Asn Gln Ile Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp
725 730 735

Glu Gly Thr Pro Ser Met Arg Glu Leu Arg Ser Ala Leu Leu Glu Phe
740 745 750

ES 2 453 974 T3

Ala Cys Thr His Asn Leu Gly Asn Cys Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu
755 760 765

Phe Asp Asp Trp Met Ala Ser Asn Gly Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp
770 775 780

Val Met Thr Thr Val Phe Lys Val Gly Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp
785 790 795 800

Ser Phe Leu Leu Gly Lys Tyr Ile Ser Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys
805 810 815

Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu
820 825 830

Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln
835 840 845

Lys Leu Ser Phe Ile Ile Arg Thr Val Gly Arg His Phe Pro Gly His
850 855 860

Leu Leu Ala Trp Asp Phe Val Lys Glu Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln
865 870 875 880

Lys Phe Pro Leu Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser
885 890 895

Thr Tyr Leu Phe Ser Thr Lys Thr His Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe
900 905 910

Phe Glu Asn Gln Ser Glu Ala Thr Phe Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu
915 920 925

Ala Leu Glu Val Ile Gln Leu Asn Ile Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu
930 935 940

Lys Ser Leu Thr Trp Trp Leu
945 950

<210> 9
<211> 894
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(894)

<400> 9

ES 2 453 974 T3

Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys Asn Gln Ser
 1 5 10 15
 Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu Phe Pro Trp
 20 25 30
 Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr
 50 55 60
 Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser
 65 70 75 80
 Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser
 85 90 95
 Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile
 100 105 110
 Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu
 115 120 125
 Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr
 130 135 140
 Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala
 145 150 155 160
 Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp
 165 170 175
 Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu
 180 185 190
 Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu
 195 200 205
 Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser
 210 215 220

ES 2 453 974 T3

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln
225 230 235 240

Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile
245 250 255

Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe
260 265 270

Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu
275 280 285

Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu
290 295 300

Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser
305 310 315 320

Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala
325 330 335

His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu
340 345 350

Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu
355 360 365

Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg
370 375 380

Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser
385 390 395 400

Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu
405 410 415

Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu
420 425 430

Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His
435 440 445

Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu
450 455 460

Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr

ES 2 453 974 T3

Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe Lys Val Gly
 725 730 735

Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys Tyr Ile Ser
 740 745 750

Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser
 755 760 765

Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn
 770 775 780

Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile Arg Thr Val
 785 790 795 800

Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe Val Lys Glu
 805 810 815

Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser Tyr Thr Ile
 820 825 830

Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr Lys Thr His
 835 840 845

Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu Ala Thr Phe
 850 855 860

Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln Leu Asn Ile
 865 870 875 880

Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp Trp Leu
 885 890

<210> 10
 <211> 894
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(894)

<400> 10

Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys Asn Gln Ser
 1 5 10 15

15

ES 2 453 974 T3

Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu Phe Pro Trp
 20 25 30

Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg Tyr Glu Leu
 35 40 45

Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr
 50 55 60

Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser
 65 70 75 80

Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser
 85 90 95

Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile
 100 105 110

Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu
 115 120 125

Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr
 130 135 140

Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala
 145 150 155 160

Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp
 165 170 175

Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu
 180 185 190

Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu
 195 200 205

Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser
 210 215 220

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln
 225 230 235 240

Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile
 245 250 255

ES 2 453 974 T3

Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe
 260 265 270

Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu
 275 280 285

Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu
 290 295 300

Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser
 305 310 315 320

Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala
 325 330 335

His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu
 340 345 350

Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu
 355 360 365

Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg
 370 375 380

Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu
 405 410 415

Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu
 420 425 430

Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His
 435 440 445

Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu
 450 455 460

Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr
 465 470 475 480

Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys Gly Lys Glu
 485 490 495

Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys Pro Glu Ile

ES 2 453 974 T3

	500		505		510														
Gln	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Tyr	Leu	Trp	His	Ile	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val				
		515					520					525							
Thr	Glu	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Asp				
	530					535					540								
Lys	Lys	Ser	Gly	Val	Ile	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Val	Leu	Trp	Val	Lys				
545					550					555					560				
Val	Asn	Ile	Asn	Met	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Val	His	Tyr	Ala	Asp	Asp				
				565					570					575					
Asp	Trp	Glu	Ala	Leu	Ile	His	Gln	Leu	Lys	Ile	Asn	Pro	Tyr	Val	Leu				
			580					585					590						
Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ile	Phe	Glu	Leu	Ala				
		595					600					605							
Gly	Leu	Gly	Lys	Val	Pro	Leu	Lys	Arg	Ala	Phe	Asp	Leu	Ile	Asn	Tyr				
	610					615					620								
Leu	Gly	Asn	Glu	Asn	His	Thr	Thr	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln				
625					630					635					640				
Thr	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Tyr	Met	Asp	Leu				
				645					650					655					
Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Arg	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Ile				
			660					665					670						
Gln	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Pro	Ser	Met	Arg	Glu	Leu				
		675					680					685							
Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Phe	Ala	Cys	Thr	His	Asn	Leu	Gly	Asn	Cys				
	690					695					700								
Ser	Thr	Thr	Ala	Met	Lys	Leu	Phe	Asp	Asp	Trp	Met	Ala	Ser	Asn	Gly				
705					710					715					720				
Thr	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	Asp	Val	Met	Thr	Thr	Val	Phe	Lys	Val	Gly				
				725					730					735					
Ala	Lys	Thr	Asp	Lys	Gly	Trp	Ser	Phe	Leu	Leu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ser				
			740					745					750						

ES 2 453 974 T3

Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser
755 760 765

Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn
770 775 780

Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile Arg Thr Val
785 790 795 800

Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe Val Lys Glu
805 810 815

Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser Tyr Thr Ile
820 825 830

Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr Lys Thr His
835 840 845

Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu Ala Thr Phe
850 855 860

Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln Leu Asn Ile
865 870 875 880

Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp Trp Leu
885 890

<210> 11
<211> 894
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(894)

<400> 11

Pro Arg Cys Thr Phe Thr Lys Glu Gly Cys His Lys Lys Asn Gln Ser
1 5 10 15

Ile Gly Leu Ile Gln Pro Phe Ala Thr Asn Gly Lys Leu Phe Pro Trp
20 25 30

Ala Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ala Val Val Pro Leu Arg Tyr Glu Leu
35 40 45

15

ES 2 453 974 T3

Ser Leu His Pro Asn Leu Thr Ser Met Thr Phe Arg Gly Ser Val Thr
50 55 60

Ile Ser Val Gln Ala Leu Gln Val Thr Trp Asn Ile Ile Leu His Ser
65 70 75 80

Thr Gly His Asn Ile Ser Arg Val Thr Phe Met Ser Ala Val Ser Ser
85 90 95

Gln Glu Lys Gln Ala Glu Ile Leu Glu Tyr Ala Tyr His Gly Gln Ile
100 105 110

Ala Ile Val Ala Pro Glu Ala Leu Leu Ala Gly His Asn Tyr Thr Leu
115 120 125

Lys Ile Glu Tyr Ser Ala Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Phe Tyr
130 135 140

Gly Phe Ser Tyr Thr Asp Glu Ser Asn Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala
145 150 155 160

Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg Ser Ala Phe Pro Cys Phe Asp
165 170 175

Glu Pro Ala Phe Lys Ala Thr Phe Ile Ile Lys Ile Ile Arg Asp Glu
180 185 190

Gln Tyr Thr Ala Leu Ser Asn Met Pro Lys Lys Ser Ser Val Val Leu
195 200 205

Asp Asp Gly Leu Val Gln Asp Glu Phe Ser Glu Ser Val Lys Met Ser
210 215 220

Thr Tyr Leu Val Ala Phe Ile Val Gly Glu Met Lys Asn Leu Ser Gln
225 230 235 240

Asp Val Asn Gly Thr Leu Val Ser Ile Tyr Ala Val Pro Glu Lys Ile
245 250 255

Gly Gln Val His Tyr Ala Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Leu Glu Phe
260 265 270

Phe Gln Asn Tyr Phe Glu Ile Gln Tyr Pro Leu Lys Lys Leu Asp Leu
275 280 285

ES 2 453 974 T3

Val Ala Ile Pro Asp Phe Glu Ala Gly Ala Met Glu Asn Trp Gly Leu
 290 295 300

Leu Thr Phe Arg Glu Glu Thr Leu Leu Tyr Asp Ser Asn Thr Ser Ser
 305 310 315 320

Met Ala Asp Arg Lys Leu Val Thr Lys Ile Ile Ala His Glu Leu Ala
 325 330 335

His Gln Trp Phe Gly Asn Leu Val Thr Met Lys Trp Trp Asn Asp Leu
 340 345 350

Trp Leu Asn Glu Gly Phe Ala Thr Phe Met Glu Tyr Phe Ser Leu Glu
 355 360 365

Lys Ile Phe Lys Glu Leu Ser Ser Tyr Glu Asp Phe Leu Asp Ala Arg
 370 375 380

Phe Lys Thr Met Lys Lys Asp Ser Leu Asn Ser Ser His Pro Ile Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Val Gln Ser Ser Glu Gln Ile Glu Glu Met Phe Asp Ser Leu
 405 410 415

Ser Tyr Phe Lys Gly Ser Ser Leu Leu Leu Met Leu Lys Thr Tyr Leu
 420 425 430

Ser Glu Asp Val Phe Gln His Ala Val Val Leu Tyr Leu His Asn His
 435 440 445

Ser Tyr Ala Ser Ile Gln Ser Asp Asp Leu Trp Asp Ser Phe Asn Glu
 450 455 460

Val Thr Asn Gln Thr Leu Asp Val Lys Arg Met Met Lys Thr Trp Thr
 465 470 475 480

Leu Gln Lys Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Gln Lys Lys Gly Lys Glu
 485 490 495

Leu Phe Ile Gln Gln Glu Arg Phe Phe Leu Asn Met Lys Pro Glu Ile
 500 505 510

Gln Pro Ser Asp Thr Ser Tyr Leu Trp His Ile Pro Leu Ser Tyr Val
 515 520 525

Thr Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Lys Tyr Gln Ser Val Ser Leu Leu Asp

ES 2 453 974 T3

530 535 540

Lys Lys Ser Gly Val Ile Asn Leu Thr Glu Glu Val Leu Trp Val Lys
 545 550 555 560

Val Asn Ile Asn Met Asn Gly Tyr Tyr Ile Val His Tyr Ala Asp Asp
 565 570 575

Asp Trp Glu Ala Leu Ile His Gln Leu Lys Ile Asn Pro Tyr Val Leu
 580 585 590

Ser Asp Lys Asp Arg Ala Asn Leu Ile Asn Asn Ile Phe Glu Leu Ala
 595 600 605

Gly Leu Gly Lys Val Pro Leu Lys Arg Ala Phe Asp Leu Ile Asn Tyr
 610 615 620

Leu Gly Asn Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Thr Glu Ala Leu Phe Gln
 625 630 635 640

Thr Asp Leu Ile Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Met Asp Leu
 645 650 655

Ala Ser Arg Leu Val Thr Arg Val Phe Lys Leu Leu Gln Asn Gln Ile
 660 665 670

Gln Gln Gln Thr Trp Thr Asp Glu Gly Thr Pro Ser Met Arg Glu Leu
 675 680 685

Arg Ser Ala Leu Leu Glu Phe Ala Cys Thr His Asn Leu Gly Asn Cys
 690 695 700

Ser Thr Thr Ala Met Lys Leu Phe Asp Asp Trp Met Ala Ser Asn Gly
 705 710 715 720

Thr Gln Ser Leu Pro Thr Asp Val Met Thr Thr Val Phe Lys Val Gly
 725 730 735

Ala Lys Thr Asp Lys Gly Trp Ser Phe Leu Leu Gly Lys Tyr Ile Ser
 740 745 750

Ile Gly Ser Glu Ala Glu Lys Asn Lys Ile Leu Glu Ala Leu Ala Ser
 755 760 765

Ser Glu Asp Val Arg Lys Leu Tyr Trp Leu Met Lys Ser Ser Leu Asn
 770 775 780

ES 2 453 974 T3

Gly Asp Asn Phe Arg Thr Gln Lys Leu Ser Phe Ile Ile Arg Thr Val
785 790 795 800

Gly Arg His Phe Pro Gly His Leu Leu Ala Trp Asp Phe Val Lys Glu
805 810 815

Asn Trp Asn Lys Leu Val Gln Lys Phe Pro Leu Gly Ser Tyr Thr Val
820 825 830

Gln Asn Ile Val Ala Gly Ser Thr Tyr Leu Phe Ser Thr Lys Thr His
835 840 845

Leu Ser Glu Val Gln Ala Phe Phe Glu Asn Gln Ser Glu Ala Thr Phe
850 855 860

Arg Leu Arg Cys Val Gln Glu Ala Leu Glu Val Ile Gln Leu Asn Ile
865 870 875 880

Gln Trp Met Glu Lys Asn Leu Lys Ser Leu Thr Trp Trp Leu
885 890

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP ("insulin responsive aminopeptidase"), para la realización de un método de dosificación *in vitro* de la concentración en dominio extracelular segregado de la proteína IRAP en el suero o el plasma de un mamífero, en particular del ser humano, siendo dicha dosificación efectuada con la ayuda de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la parte extracelular de la proteína IRAP representada por las SEC ID n° 7 a 11.
- 10 2. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP según la reivindicación 1, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro*, o el seguimiento *in vitro* de patologías relacionadas con defectos de translocación del transportador de glucosa GLUT4 o de proteínas asociadas.
- 15 3. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP según la reivindicación 2, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión y/o al aumento de la translocación hacia la membrana de la IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la sobreexpresión y/o al aumento de la translocación hacia la membrana de la IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes en un paciente, con respecto a un individuo sano.
- 20 4. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP según la reivindicación 2, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación hacia la membrana de IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes con respecto a un individuo sano, o el seguimiento *in vitro* de patologías asociadas a la subexpresión y/o a la disminución de la translocación hacia la membrana de la IRAP o de sus isoformas o variantes en un paciente.
- 25 5. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP según la reivindicación 2, para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de la quimiorresistencia a los medicamentos anticancerosos.
- 30 6. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o 4, en la que las patologías están entre las asociadas a la insulino-resistencia, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional, la hipertensión gestacional, la hipertensión gravídica (preclamsia) y la amenaza de parto prematuro.
- 35 7. Utilización del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP y/o de sus isoformas y/o variantes según la reivindicación 1 o 2, en la que las patologías son unas enfermedades proliferativas y en particular los cánceres, en particular aquéllos en los que están sobreexpresadas la IRAP y/o sus isoformas y/o variantes y/o cuya translocación hacia la membrana está aumentada, tales como el adenocarcinoma ovárico, el cáncer de endometrio, el coriocarcinoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de estómago, el cáncer de recto o los cánceres de la esfera ORL, las enfermedades autoinmunes o inflamatorias.
- 40 8. Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el dominio extracelular circulante, o uno de sus epítomos del dominio extracelular, de la proteína IRAP (insulin responsive aminopeptidase), estando dicho dominio extracelular definido por las secuencias SEC ID n° 7 a 11.
- 45 9. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 8, siendo dicho anticuerpo monoclonal elegido de entre:
- el anticuerpo monoclonal segregado por el hibridoma depositado en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, Francia), el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4181,
 - 50 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4182,
 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4183,
 - 55 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4184, y
 - el anticuerpo monoclonal segregado por el hidridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4185.
- 60 10. Anticuerpo según la reivindicación 8 o 9, estando dicho anticuerpo marcado con un compuesto seleccionado de entre un radionucleido, un fluoróforo, un punto cuántico, un marcador de enzima, un sustrato de enzima, un co-factor de enzima, un inhibidor de enzima o un hapteno.
- 65 11. Anticuerpo según la reivindicación 8 o 9, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo humanizado.

- 5 12. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para una utilización como medicamento, en particular para el tratamiento de los cánceres, en particular aquéllos en los que están sobreexpresadas la IRAP y/o sus isoformas y/o variantes, y/o cuya translocación hacia la membrana está aumentada, tales como el adenocarcinoma ovárico, el cáncer de endometrio, el coriocarcinoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el
- 10 13. Hibridoma que produce un anticuerpo según la reivindicación 8 o 9, en particular un hibridoma seleccionado de entre:
- 15 a. el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4181,
 b. el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4182,
 c. el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4183,
 d. el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4184, y
 e. el hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009, bajo el número de registro CNCM I-4185.
- 20 14. Procedimiento de dosificación *in vitro* de la concentración en proteína IRAP en un mamífero, que comprende una etapa de determinación de la concentración del dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, en suero o plasma de un mamífero, en el que la dosificación se efectúa o bien mediante un método inmunoenzimático, o bien mediante un método inmunohistoquímico, o bien por RIA o IRMA.
- 25 15. Método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a la insulino-resistencia, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional, la hipertensión gravídica (preeclampsia), la amenaza de parto prematuro, y que comprende las etapas siguientes:
- 30 a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas, en un mamífero con la ayuda de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11,
 b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero sano,
 c. la deducción a partir de la etapa b. anterior, del hecho de que el mamífero presenta una insulino-resistencia, si la concentración obtenida en la etapa a. es inferior a la de la etapa b.
- 35 16. Método de diagnóstico *in vitro* de patologías asociadas a los cánceres, en particular aquéllos en los que está sobreexpresada la IRAP y/o una de sus isoformas, y/o cuya translocación hacia la membrana está incrementada, tales como el adenocarcinoma ovárico, o a enfermedades autoinmunes o inflamatorias, o a la resistencia a la quimioterapia, y que comprenden las etapas siguientes:
- 40 a. la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas, y/o variantes en un mamífero, con la ayuda de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11,
 b. la comparación de dicha concentración obtenida en la etapa a. con la obtenida *in vitro* en un mamífero control,
 c. la deducción a partir de la etapa b. anterior, del hecho de que el mamífero presenta un cáncer, si la concentración obtenida en la etapa a. es superior a la de la etapa b.
- 45 17. Kit para la determinación *in vitro* de la concentración de dominio extracelular circulante de la proteína IRAP, y/o de una de sus isoformas en un mamífero, que comprende por lo menos un tampón, y por lo menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 50 18. Kit según la reivindicación 17, que comprende asimismo un sustrato de la proteína IRAP así como un péptido reconocido por el anticuerpo.
- 55

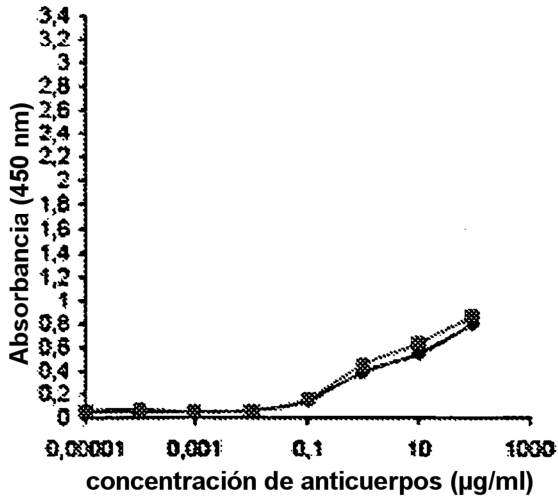


FIGURA 1A

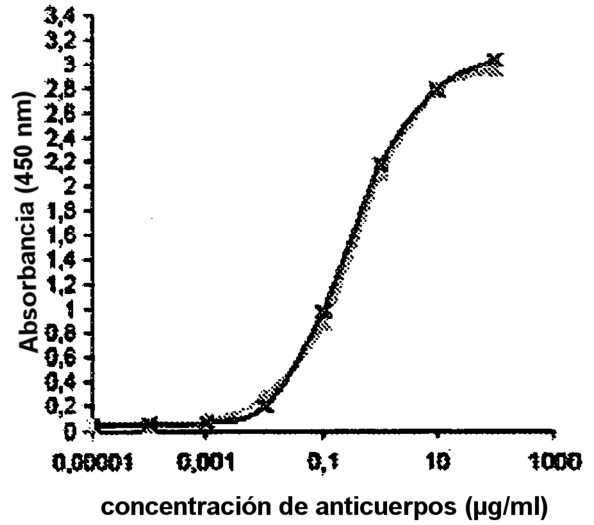


FIGURA 1B

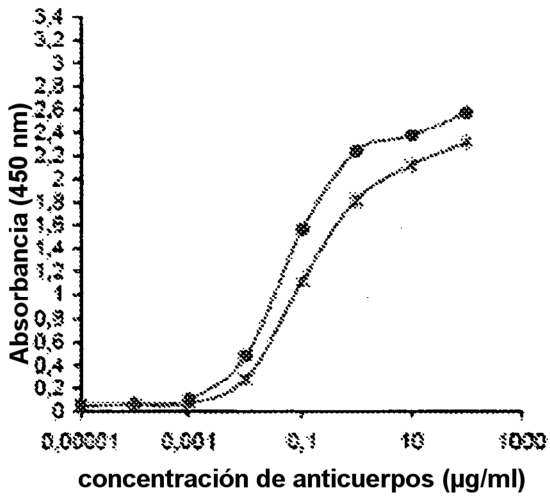


FIGURA 1C

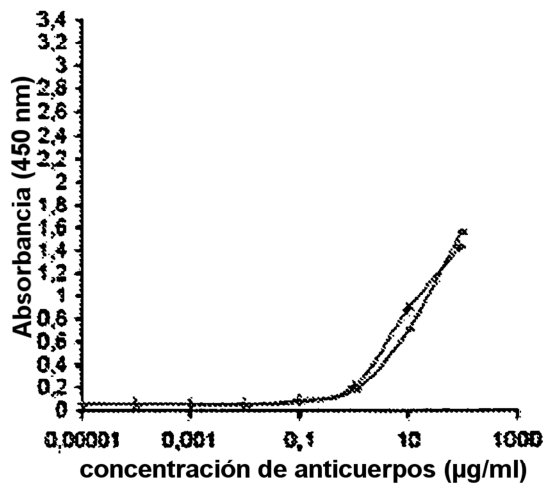


FIGURA 1D

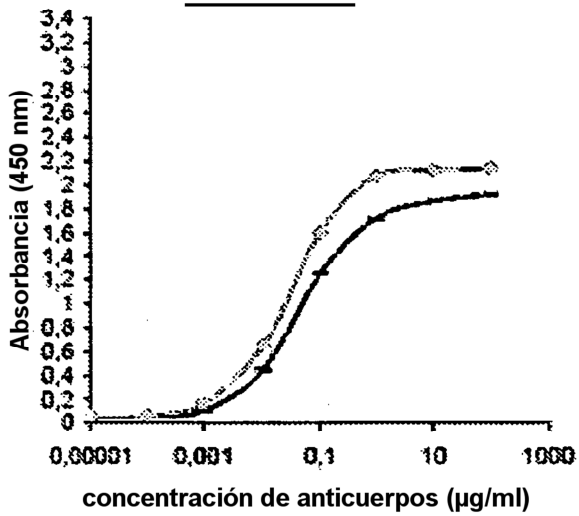


FIGURA 1E

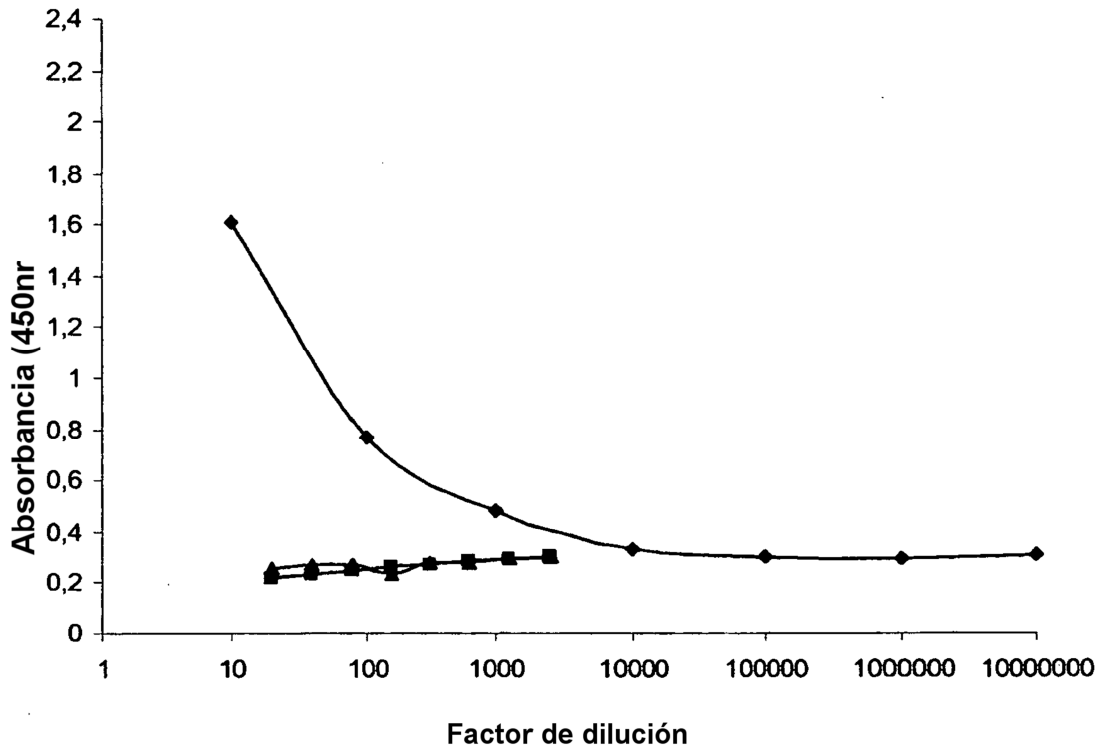


FIGURA 2

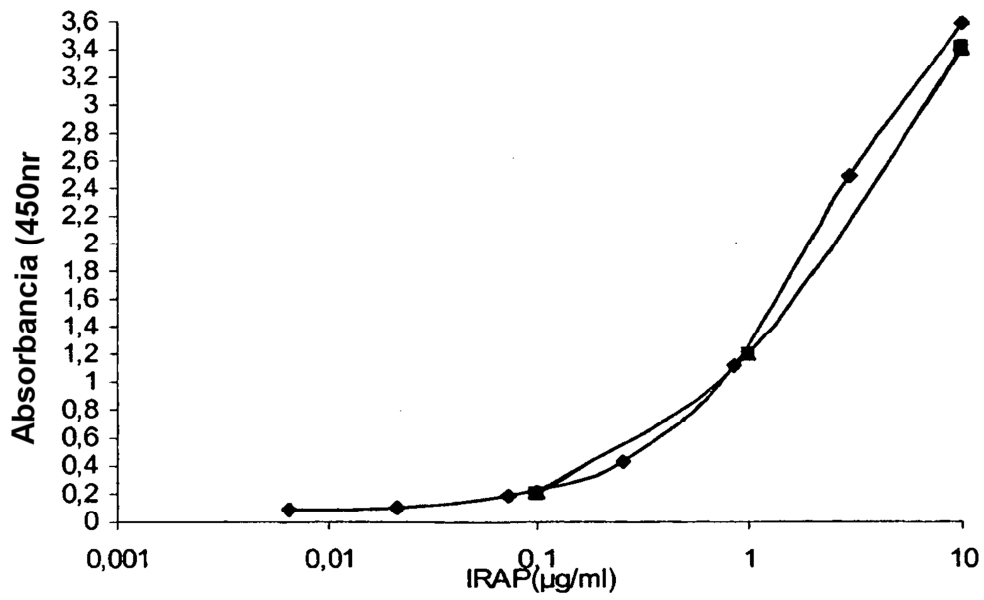


FIGURA 3