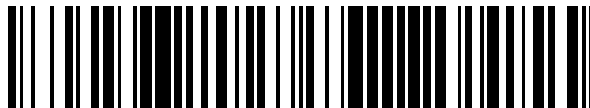


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 367**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/IB2013/053875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13171655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13731914 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2850436**

54 Título: **Un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis**

30 Prioridad:

14.05.2012 IT RM20120214

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

08.11.2017

73 Titular/es:

SIGNORILE, PIETRO GIULIO (50.0%)

Via Morbegno, 80

00166 Roma, IT y

BALDI, ALFONSO (50.0%)

72 Inventor/es:

SIGNORILE, PIETRO GIULIO y

BALDI, ALFONSO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 641 367 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

Un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis

- 5 La presente descripción se relaciona con un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis, un método in vitro para el seguimiento de una terapia contra la endometriosis y el uso de un kit para el diagnóstico de endometriosis y/o para el seguimiento de una terapia contra la endometriosis en un sujeto.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 La endometriosis es una condición patológica caracterizada por la presencia de tejido endometrial fuera del útero y está asociada con dolor pélvico e infertilidad (Giudice LC, y Kao LC: Endometriosis, The Lancet, 364: 1789-1799, 2004). Su incidencia se estima en aproximadamente 10% de la población femenina en edad reproductiva (Houston, DE: Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. Epidemiol Rev, 6: 167-191, 1984). Los síntomas son, en general, no muy específicos, y a menudo atribuidos erróneamente a otras patologías que causan dolores crónicos; por lo tanto, un diagnóstico de endometriosis difícilmente se realiza en las primeras etapas de la enfermedad. Además, un diagnóstico certero sólo puede realizarse mediante una metodología invasiva, que consiste en una inspección laparoscópica y un análisis histológico de las lesiones sospechosas. Por lo tanto, el diagnóstico de endometriosis siempre se plantea con retraso significativo: las estimaciones actuales indican un intervalo de tiempo de 8-12 años entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico de endometriosis (Hadfield R, Mardon H., Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. Hum Reprod 1996, 11: 878-880.). En la actualidad, no existe la posibilidad de realizar un diagnóstico temprano de la endometriosis mediante el uso de métodos menos invasivos. Una revisión reciente de la literatura sobre el tema destacó que, a pesar del gran número de publicaciones científicas sobre el tema, hasta la fecha no existe un biomarcador o grupo de biomarcadores que resultó clínicamente eficaz para plantear el diagnóstico de endometriosis mediante el uso de metodologías no invasivas, como, por ejemplo, una muestra de sangre periférica (May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtkley S, Kennedy SH, Becker CM: Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. Hum Reprod 2010, 16: 651-674). Un trabajo muy reciente de Fassbender et al. (Fassbender A, Waelkens E, Verbeeck N, Kyama CM, Bokor A, Vodolazkaia A, Van de Plas R, Meuleman C, Peeraer K, Tomassetti C, Gevaert O, Ojeda F, De Moor B, D'Hooghe T: Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. Obstet Gynecol 2012, 119: 276-285) ha aislado, a través de análisis proteómicos con base en la metodología MALDI-TOFF, un grupo de picos polipéptidos cuya expresión en sangre parece correlacionarse con la presencia o ausencia de la endometriosis. Sin embargo, los autores, aunque observan una variación en los patrones máximos de aproximadamente 10 péptidos/proteínas diferentes en diversas etapas de la endometriosis (desde el estadio mínimo hasta el severo) no identifican el origen de tales proteínas, que por lo tanto permanecen desconocidas y, como tales, no útiles para definir un grupo de biomarcadores cuya variación de expresión puede considerarse ventajosa para fines de diagnóstico.

- 40 El documento WO2011020839 divulga un método para predecir la respuesta a talidomida en un paciente con mieloma múltiple.

El documento US2009220994 divulga métodos para el diagnóstico de la prostatitis crónica/síndrome pélvico de dolor crónico.

- 45 El documento WO0132920 divulga el descubrimiento de genes y sus productos que están asociados con la enfermedad endometriosis

- 50 El documento WO2005008251 divulga polipéptidos marcadores asociados con endometriosis, en el estado de la técnica conocida, la necesidad de distinguir instrumentos diagnósticos no invasivos que permitan un diagnóstico preciso y posiblemente temprano de la endometriosis con el fin de definir una estrategia terapéutica ya en las primeras etapas de la enfermedad el desarrollo es muy sentida.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 55 La presente descripción se relaciona con un método in vitro y al uso de un kit para el diagnóstico de la endometriosis.

- 60 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la expresión de un grupo de proteínas, detallada en la siguiente sección, varía de una manera estadísticamente significativa en pacientes que padecen endometriosis con respecto a la población de controles sanos.

- 65 En particular, la observación de los inventores acerca de la diferencia cuantitativa de la expresión de las proteínas en cuestión en sujetos también en las primeras etapas de la patología con respecto a los pacientes control sanos permitió definir por primera vez un método para evaluar la presencia de dicha patología. Una de las ventajas de la presente invención consiste, por lo tanto, en la posibilidad de alcanzar un diagnóstico significativamente por delante de la aparición de los síntomas típicos de esta patología.

Por lo tanto, la observación de la variación de la concentración de tales proteínas puede utilizarse ventajosamente para definir un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis en sujetos femeninos. Esta variación de expresión se observa particularmente en muestras de sangre de sujetos con endometriosis. Por lo tanto, aún más ventajosamente, dicho método, en una realización de la misma, se lleva a cabo de una manera absolutamente no invasiva gracias al hecho de que la determinación de la concentración de las proteínas de interés puede realizarse en una muestra de sangre. En particular, teniendo en cuenta que para un diagnóstico firme de endometriosis existen actualmente métodos que contemplan prácticas quirúrgicas invasivas destinadas a obtener una muestra de tejido endometrial, se puede afirmar que, con respecto al estado de la técnica conocida, en una realización, el método de diagnóstico descrito en el presente documento alcanza un considerable avance técnico que consiste en un aumento notable del cumplimiento por los sujetos examinados.

Por lo tanto, un primer objeto de la presente solicitud es:

- un método in vitro para el diagnóstico de la endometriosis en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:
 - a) determinar la concentración de al menos una proteína que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una muestra biológica de dicho sujeto y en una muestra de control;
 - b) comparar dichas concentraciones en dicha muestra biológica y dicha muestra de control

en el que un aumento de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6 y/o una disminución de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 con respecto a la misma proteína en dicho control es indicativa de endometriosis.

Un segundo objeto de la presente descripción es:

- un procedimiento in vitro para la monitorización de una terapia contra la endometriosis en un sujeto bajo dicha terapia, que comprende las siguientes etapas:
 - a) determinar la concentración de al menos una proteína que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, o mutantes y/o variantes postraducción de los mismos, en una primera y segunda muestras biológicas, obtenidas en diferentes momentos, de dicho sujeto,
 - b) comparar dicha concentración obtenida para dichas primera y segunda muestras.

Objeto de la presente descripción es también el uso de un kit para el diagnóstico de la endometriosis y/o la monitorización de una terapia contra la endometriosis en un sujeto, que comprende:

- al menos una alícuota de uno o más reactivos necesarios para la determinación de la concentración de al menos una proteína que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 o sus mutantes y/o sus variantes postraducción en una muestra biológica de dicho sujeto.

Otras ventajas, así como las características y las etapas de operación de la presente invención se pondrán de manifiesto en la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones preferidas de la misma, dada simplemente a modo de ejemplo y no con fines limitativos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F muestran histogramas relacionados con la expresión diferente respectivamente de las proteínas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 en muestras de suero de pacientes con endometriosis (grupo 2) con respecto a las muestras de suero de una población de control (grupo 1). CV = coeficiente de variación, AVG = valor medio, Fac = factor de regulación.

Las figuras 2A-F muestran un gel bidimensional en el que son visibles los diversos niveles de expresión de las proteínas de respectivamente las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 en muestras de control y en muestras de pacientes con endometriosis.

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA

SEQ ID NO 1 Proteína correspondiente al mutante de apolipoproteína E humana E3K (número de acceso en GenBank: GI 1506383A; 317 aminoácidos):

5 mkvlwaallv fflagcqakv kvavetepep elrqqtewqs qqrwelalgr fwdylrvwqt lseqvqeell ssqvtqlra lmdetmkelk aykseleelq
tpvaeetrar lskelqaaqa rlgadmedvc grlvqyrgev qamlgqstee lrvlrlashlr klrkrllrda dldqlrlavy qagaregaer gl saierlrg
plveqgrvra atvgsilagqp lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrdev keqvaevrak leeqaqqirl qaeafqark swfeplvedm qrwaglvk
vqaavgtasa pvpsdnh.

10 SEQ ID NO 2 Proteína correspondiente a la cadena A del complejo antitrombina lii humana (número de acceso en GenBank: GI 999513 1ATH_A; 432 aminoácidos):

15 hgspvdicta kprdiipnmp ciyrsppekka tedegseqki peatnrrvwe lskansrfat tfyqhladsk ndndniflsp lsistafamt klgacondtlq
qlmevfkfdt isektsdqih fffaklncl yrkanksskl vsanrlfgdk slfnetyqd iselvygaki qpldfkenae qsraainkwv snktegritd
vipseainel tvlrvntiy fkglwskfs pentrkelfy kadgescsas mmyqegkfry rvaegtqvl elpfgkddit mvlilpkpek slakvekelt
pevlqewlde leemmlvvhm prfriedgfs lkeqlqdmgl vdlfspekkl lpgivaegr dlyvsdafhk aflevneegs eaaastavvi agrslnprv
tfkanrplv firevplnti ifmrvanpc vk.

20 SEQ ID NO 3 Proteína correspondiente a la cadena A de la seroalbúmina humana (número de acceso en GenBank: GI 122920512 2I2Z_A; 585 aminoácidos):

25 dahksevahf fkdgeenfk alvliafaq lqqcpfedhv klvnevtefa ktcvadesae ncdkslhtif gdklctvatl retygemadc cakqeperne
cflqhkddnp nprlvpev dvmctafhdn eetfkkly eiarrhpyfy apellfakr ykaafteccq aadkaaclp kidelrdegk assakqrlxc
aslqkfgera fkwavarls qrfpkafae vsklvdtlk vhtecchgd lccaddradl akyicenqds issklkecce kplekshci aevendempa
dplslaadv eskdvcknya eakdvflgmf lyeyarrhpd ysvlllrla kyettlekc caaadphecy akvdefkpl veepqnlkq ncelfeqlge
yfkqnalvr ytkkvpqvst ptivevsnl gkvgsckckh peakrmpcae dylsvvlnql cvlhektpvs drvtkcctes lvnrrpcfsa levdeetyvpk
efnaetffh adictisek riqkkqatlv elvkhkpkat keqlkavmdd faafvekck addketcfae egkklvaasq aagl.

30 SEQ ID NO 4 Proteína correspondiente al precursor C3 del complemento [Homo sapiens]; número de acceso en GenBank: GI 115298678 NP_000055; 1663 aminoácidos):

35 mgptsgpsll llllthlpla lgspmysit pnrlrlesee tmvleahdaq gdpvptvtvh dfpgkklvlv sektvltpat nhmgvntfti panrefksek
grnkfvvtqa tfgtqvvekv vlvslqsgyl fiqtdkiyt pgstvlryif tvnhklpvg rtmvniemp egipvkqdsi ssnqlglvlp lswdipelvn
mgqwkirayy enspqqvst efevkeyvlp sfvivepte kfyiynekq levitarrl ygkkvegtaf vifgiqdgeq rispeslkr ipiedgsgev
vlsvkvlldg vqnpaedlv gkslyvsatv ilhsgsdmvq aersgipvt spyqihfkt pkyfkpgmpf dlmvfvtnpd gspayrvpva vqgedtvqsl
tqgdgvakls inthpsqkpl sitvrkkqe lseaeqatrt mqalpystvg nsnnylhsv lrtelrpgget lnvnlrmd raheakiry tyilmnkgrl
lkagrqvrep gqdlvvlpls ittdfipsr lvayytiliga sqgrevvads vvwvdvkdscv gslvkvsgqs edrqpvpgqq mtlkiegdhg arvvlavdk
gvfvlknknk ltqskiwdv ekadigctpg sgkdyagvfv daglfttss gqtaqrael qcpqpaarr rsvqltekm dkgvkypkel rkccedgmre
40 nprmfscqrr trfislgeac kvfldccny itelrrghar ashlgarsn ldediaeen ivsrsefepes wlvnvedlke ppkngistkl mnifkdsit
tweilavsms dkgkicvadp fevtvmqdf idlrlpysv mneqveirav lynyrqnel kvrvellhnp afcslattr rhqqtvtipp ksslsvpyvi
vplktglqev evkaavyhhf isdgvkrslk vvpegirmnk tvavrtldpe rlgrevgqke dippadlsdq vpdtesetri llqgtvpaqm tedavdaerl
khlivtsgc geqnmigmtp tvlavhyde teqwefggle krqgalelik kgytqlafr qpssafaafv krapstwta yvvvflav nliaidsqvl
cgavkwile kqkpdgvfge dapvihqemi gglnnnekdmaltavlis lqeaadicee qvnsipgsit kagdfleany mnlqrsytva iagyalaqmg
45 rikgpplnkf lttakdknrw edpgkqlynv eatsyallal lqkdfdfvp pvvrvlneqr ygggygstq atfmvfqala qyqkdapdhq elnlvslql
psrskithr ihwesaslrl seetkenegf tvtaegkgqg tsvvmyha kakkdltcnk fdlkvtkpa petekrpqda kntmileict ryrgdqdadm
sildismmtg faptdtdlkq langvdryis kyeldkafsd ntlilyldk vshseddcla fkvhyfve liqpgavkvy aaynleesct rfyhpekedg
klnklrdel crcaeencfi qksddkvtle erldkacepg vdyvyktrlv kvqlsndfde yimaieqtik sgsddevqvgq qrtfispikc realkleek
hymwglssd fwgekpnisy iigkdtvveh wpeedecqde enqkqcdlg aftesmvvfg cpn.

50 SEQ ID NO 5 Proteína aislada de Homo sapiens (número de acceso en GenBank: GI 194380608 BAG58457; 763 aminoácidos):

55 mrlwgliwa ssfftlslqk prllfsvv vhlgvplsvg vqlqdvprgq vvkgsvlrn psrnnvpcsp kvdfllsser dfallsiqvp lkdakscglh qlirgpevql
vahspwlkds lsrttniqgi nllfssrrgh flqtdqpiy npgqrvryr faldqkmrps tdtitvmen shglrvrke vmpssifqd dfvipdisep
gtwkisarfs dglesnsstq fevkkylpn fevkitpgkp yiltvpgld emqldiqary iygkpvqgva yvrfgllded gkktffrgle sctlvngqs
hislkaefq daleklnmgi tdlqglrlv aaaiiespgg emeaeeltsw yvsspsfld lsktrhlpv gapfillqal remsgspasg ipvksatvs
spgsvpevqd iqqntdgsqg vsipiipqt iselqlsvsa gshpaialr tvaappsggp gflsierpds rprvrgdtln lnrvagsga fshyymil
srgqivfmnr epkrtlsvs vfdhhlaps fyvafyyhg dhpvanlrv dvqagacegk lelsvdgakq yrngeevklh letdslalva lgaltdalya
60 agskshkpln mgkvfeamns ydlgcpggg dsalqvfaa glafsdgdqw tlrkriscp kektrkkrn vnfqkainek lqgyasptak rccdqgvtrl
pmmrscqra arvqqpdcre pflsccqfae slrksrdkg qeglgpsar spa.

SEQ ID NO 6 Proteína correspondiente a Zn-alfa-2-glicoproteína aislada de Homo sapiens (número de acceso en GenBank: GI 38026 CAA42438; 302 aminoácidos):

mwasmrmlp vlslillg pavpqnqdg rylstyitg lskhvedvpa fqalgsindl qffrynsldr ksqpmglwrq vegmedwkqd sqlikaredi
 5 fmetlkdiv yndngshv lqgrfgeie nrrsgafwk yydgdgyie fnkeipawvp fdpaaiqtq kweaepvyvq rakayleec patlrkylky
 sknilrdqp psvvvtshqa pgekkklkcl aydfypgkid vhwtragevq epelrgdvlh nngtyqswv vvavppqda pyschvqhss laqplvpwe
 as.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis en un sujeto.

El objeto del método descrito aquí es permitir el diagnóstico preferiblemente precoz de endometriosis en sujetos
 15 hembras en ausencia o en presencia incluso sólo de ligeros síntomas asociados a la enfermedad. En particular, es
 posible llevar a cabo el diagnóstico no sólo en cada uno de los cuatro estadios convencionales de la enfermedad,
 sino también antes de su representación clínica.

En particular, el método se caracteriza por la determinación de la concentración de al menos una proteína que
 20 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2,
 SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 en una muestra biológica de un sujeto bajo examen.

En una realización preferida de la presente invención, dicha proteína comprende o consiste en la SEQ ID NO 6. De
 hecho, como se mencionó en lo anterior, los Autores de la presente invención demostraron que la variación de la
 25 concentración de al menos una de las proteínas anteriores sólo se correlaciona con la presencia o ausencia de
 endometriosis. Específicamente, dicha al menos una proteína cuya concentración se ha de determinar es una
 proteína que comprende dentro de su secuencia de aminoácidos a la SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 3
 o SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6. En otros términos, por lo tanto, de acuerdo con el método descrito
 aquí, las proteínas detectables y/o detectadas son las proteínas (denominadas esquemáticamente como proteínas
 A-F) a continuación:

- proteína A que comprende o consiste en la SEQ ID NO 1,
- proteína B que comprende o consiste en la SEQ ID NO 2,
- proteína C que comprende o consiste en la SEQ ID NO 3,
- proteína D que comprende o consiste en la SEQ ID NO 4,
- proteína E que comprende o consiste en la SEQ ID NO 5 y/o
- proteína F que comprende o consiste en la SEQ ID NO 6.

En particular, en una realización preferida de la invención, las proteínas detectables y/o detectadas tienen una
 40 secuencia de aminoácidos que consiste exclusivamente en: SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 3 o SEQ ID
 NO 4 o SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6.

Las proteínas detectables y/o detectadas en los extremos de la presente invención pueden ser una o dos, tres,
 cuatro, cinco o seis y de acuerdo con una cualquiera de las combinaciones posibles. Sólo a modo de ejemplo,
 45 cuando las proteínas a detectar (detectables) y/o detectadas son tres, éstas pueden ser la proteína A (SEQ ID NO
 1), la proteína D (SEQ ID NO 4) y la proteína F (SEQ ID NO 5) o la proteína B (SEQ ID NO 2), la proteína C (SEQ ID
 NO 3) y la proteína F (SEQ ID NO 6), o de nuevo la proteína A (SEQ ID NO 1), la proteína C (SEQ ID NO 3) y la
 proteína F (SEQ ID NO 6). Aparentemente, cualquier posible combinación de las 6 proteínas definidas anteriormente
 se puede utilizar para los fines del presente método y, por lo tanto, está comprendida como tal dentro del ámbito
 protector de la invención descrita aquí.

Además, comprendidos dentro del ámbito de protección definido aquí están también secuencias mutadas y/o
 50 variantes postraducción de las secuencias definidas por las SEQ ID NO 1-6.

"Secuencias mutadas" en la presente invención significa una secuencia de aminoácidos X que tiene, con respecto a
 55 la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO 1 o la SEQ ID NO 2 o la SEQ ID NO 3 o la SEQ ID NO 4 o
 la SEQ ID NO 5 o la SEQ ID NO 6, al menos 90% de homología. En otros términos, al menos el 90, 91, 92, 93, 94,
 95, 96, 97, 98, 99% de la secuencia de aminoácidos podría ser idéntica a cada una de las SEQ IDs anteriormente
 definidas.

En su lugar, "variantes postraducción" significa las secuencias de aminoácidos que difieren de las secuencias SEQ
 60 ID NO 1-6, o sus mutantes, para la presencia de uno o más aminoácidos sobre los cuales grupos funcionales como,
 a modo de ejemplo no limitativo se han agregado, grupos glucídicos, fosfato, acetilo.

Por consiguiente, en la realización del método descrito aquí, también pueden detectarse proteínas que comprenden
 65 o que consisten en secuencias mutadas y/o variantes postraducción de las SEQ ID NO 1-6.

La determinación de la concentración de las proteínas anteriores se puede realizar de acuerdo con cualquiera de los métodos considerados adecuados para ello por el técnico en el campo. Tales métodos son ampliamente conocidos en la literatura y se describen en detalle en la mayoría de los manuales de laboratorio, por lo que no es necesario profundizar más en ellos aquí.

Sólo a modo de ejemplo, la concentración de las proteínas anteriores en una muestra, con respecto a una muestra de control, se puede determinar por métodos inmunométricos cuantitativos y semicuantitativos. En particular, dichos métodos se basan en el reconocimiento por anticuerpos específicos de las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 1-6.

El desarrollo de un anticuerpo capaz de reconocer selectivamente una secuencia de aminoácidos dada cae ahora dentro de las técnicas de laboratorio convencionales; de hecho, dicho desarrollo no sólo se describe en manuales de laboratorio, sino que también se realiza, a petición, como un servicio de varias empresas de biotecnología. Por lo tanto, hoy en día es posible desarrollar un anticuerpo, tanto de tipo policlonal como monoclonal, por ejemplo, contra las SEQ ID NO: 1-6, simplemente proporcionando a una empresa, como por ejemplo, Antibody Resource (<http://www.antibodyresource.com/customantibody.html>) las secuencias de interés con el fin de obtener un anticuerpo específico para cada una de las SEQ ID NO 1-6.

Preferiblemente, los anticuerpos desarrollados de acuerdo con la presente invención son anticuerpos monoclonales.

Para completar la información, recordemos que para hacer el anticuerpo primario de tipo monoclonal, cualquier técnica estándar para desarrollar anticuerpos monoclonales será suficiente, como por ejemplo, aquella definida por Koler y Mirstaein en 1967: debe recordarse brevemente aquí que cada anticuerpo específico, que reconoce un determinante antigénico específico (epítipo), es producido por un linfocito B específico. El aislamiento y cultivo in vitro de una célula capaz de producir un único anticuerpo representa una fuente de anticuerpos monoclonales (por lo tanto, anticuerpos monoespecíficos). Sin embargo, los linfocitos B, cuando se cultivan in vitro, mueren después de un tiempo muy corto y por lo tanto no pueden ser una fuente para la producción a largo plazo de anticuerpos.

La tecnología de anticuerpos monoclonales comprende el aislamiento de estos linfocitos B y su posterior fusión con células transformadas (células mielomatosas), útiles por sus características de mayor crecimiento y supervivencia.

Muchas de las células híbridas (o hibridomas) resultantes, que se cultivan in vitro, conservarán la inmortalidad, además de producir grandes cantidades del anticuerpo monoclonal.

La fusión entre los linfocitos B (provenientes del bazo y los ganglios linfáticos de un animal inmunizado) y el mieloma de ratón (el animal más utilizado), se obtiene mediante la intervención de un promotor de fusión de membrana, como el polietilenglicol.

El medio en el que se cultivan los híbridos es de tipo selectivo, conocido bajo el nombre de HAT, que, debido a su composición, inhibe el crecimiento tanto de mielomas como de células de bazo no fusionadas, pero no del hibridoma que completa las dos líneas originales. Los hibridomas se someten a la criba para buscar anticuerpos específicos de interés, y los seleccionados son enviados a almacenamiento o producción en masa.

Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, específicos para las secuencias de aminoácidos definidas anteriormente, son por lo tanto anticuerpos (primarios) que reconocen específicamente cada una de las secuencias anteriores, y que a su vez pueden ser reconocidas por un anticuerpo secundario adecuado, por supuesto específico para el organismo en el que se ha desarrollado el anticuerpo primario. Dicho anticuerpo secundario podría marcarse, por ejemplo, con cualquier fluorocromo comúnmente usado en marcado de anticuerpos secundarios, como, por ejemplo, sustancias fluorescentes (a modo de ejemplo: FITC, Cy3, Cy5, Alexa 488, PEe) o enzimas o sustancias detectables por la citología enzimática (por ejemplo, peroxidasa de rábano) para permitir de este modo la detección del anticuerpo primario y, por tanto, de la proteína o proteínas de interés de acuerdo con métodos convencionales de detección.

Preferiblemente, por lo tanto, la determinación de la concentración de al menos una de las proteínas indicadas anteriormente se puede realizar, a modo de ejemplo, por inmunoprecipitación western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), inmunoquímica o matriz de proteínas.

En particular, una matriz de proteínas consiste en un soporte sólido sobre el cual diversos reactivos, entre los que, por ejemplo, anticuerpos específicos para las proteínas descritas aquí, se depositan ("sembrado", en jerga técnica) de una manera ordenada y a una densidad específica y definida. Cada uno de estos anticuerpos, al enlazar a su propia proteína diana y, de este modo, aislarla de una mezcla compleja, tal como puede ser, por ejemplo, un lisado celular, permite, sobre la base de las interacciones proteína (antígeno)-proteína (anticuerpo) resaltar y cuantificar la proteína específica de interés.

Alternativamente, la determinación de la concentración de al menos una de las proteínas descritas aquí puede realizarse por espectrometría de masas.

5 A continuación, se compara el valor relacionado con la concentración de dicha al menos una proteína de interés presente en una muestra biológica del sujeto examinado con el valor de control, es decir, el valor de concentración obtenido para la misma proteína en una muestra perteneciente a un sujeto sano. Como resultará evidente para un técnico en el campo, el valor de control será preferiblemente el valor medio de la concentración de dicha al menos una proteína calculada con respecto a una cohorte de sujetos sanos.

10 De acuerdo con el método para el diagnóstico y/o la evaluación del riesgo de desarrollar endometriosis descrito aquí, la variación de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, o mutantes y/o variantes postraducción de los mismos en la muestra del sujeto bajo examen con respecto al valor de control proporcionará información sobre la presencia de endometriosis o el riesgo de desarrollar endometriosis.

15 En particular, si al menos una proteína que comprende uno entre las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 demuestra tener una concentración estadísticamente inferior con respecto a la misma proteína analizada en la muestra de control, se diagnosticará endometriosis o riesgo de desarrollar endometriosis al sujeto bajo examen.

20 Además, si al menos una proteína que comprende una entre las SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6 demuestra tener una concentración estadísticamente más alta con respecto a la misma proteína en la muestra de control, se diagnosticará endometriosis o riesgo de desarrollar endometriosis al sujeto bajo examen.

En una realización preferida del presente método, dicha proteína comprende o consiste en la SEQ ID NO 6.

25 Por lo tanto, en resumen, de acuerdo con el método descrito aquí, una disminución de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende uno entre las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y/o un aumento de la concentración de dicha proteína que comprende las SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6 con respecto a dicho control es indicativo de endometriosis o del riesgo de desarrollar endometriosis. En particular, a modo de ejemplo, incluso la simple observación de que sólo uno o dos, tres entre las SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 6 están aumentando, y/o solo uno o dos, tres, entre las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 están en disminución con respecto al control, es indicativo de la presencia de endometriosis.

30 Con el fin de facilitar la determinación de la concentración, preferiblemente, el método descrito aquí también puede comprender una etapa preliminar en la que se obtiene un extracto proteico de la muestra biológica a analizar.

35 Como se ha resaltado anteriormente, el problema técnico adicional resuelto por la presente invención es el desarrollo de un método no invasivo para el diagnóstico de la endometriosis. Los autores han observado una modulación de la expresión de las proteínas anteriores en muestras de suero de pacientes con endometriosis. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, la muestra biológica está representada por una muestra de sangre o suero del paciente bajo examen.

40 Además, como es evidente por el tipo de patología en cuestión, es decir, endometriosis, el paciente bajo examen es un sujeto femenino, preferiblemente un sujeto humano. Sin embargo, cualquier animal en el que sea posible observar la endometriosis análogamente a un ser humano, como por ejemplo, en caballos, puede considerarse el "sujeto" de acuerdo con lo que se describe aquí.

45 Otro objeto de la presente descripción es un método in vitro para la monitorización de la endometriosis en un sujeto. El término "monitorización" aquí significa el control del patrón del estado patológico de un paciente en el tiempo. Por lo tanto, "monitorización" significa controles en serie en el tiempo de las variaciones cuantitativas de las proteínas en un sujeto con respecto a los valores cuantitativos de la misma proteína o proteínas en los controles. Preferiblemente, dicha monitorización puede ser, sin limitarse a ello, una monitorización de una terapia contra la endometriosis. Por lo tanto, el objeto de este caso es evaluar antes, durante y/o después de un intervalo de tiempo genérico o una vía terapéutica, una posible mejora o empeoramiento del estado patológico que, en el caso específico en que el paciente se somete a terapia, corresponde a la posible ventaja o desventaja de la terapia prescrita para tratar y/o desacelerar y/o prevenir la endometriosis.

55 En particular, dicho método de monitorización comprende la etapa clave de determinar la concentración de al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. En una realización preferida de la presente invención dicha proteína comprende o consiste en la SEQ ID NO 6. Análogamente a lo ya mencionado para el método de diagnóstico anterior, la determinación de la concentración de dicha al menos una proteína puede estar relacionado tanto con proteínas que comprenden y que consisten exclusivamente en las SEQ ID NO 1-6, así como a mutantes y/o variantes postraducción de los mismos. En particular, los aspectos técnicos relacionados con las proteínas a analizar, así como las metodologías para determinar la concentración de proteínas, útiles para los fines del método de monitorización, deben ser consideradas análogas a las ya descritas anteriormente para el método de diagnóstico.

65 Por lo tanto, en particular, el método podría comprender además una etapa de obtención de un extracto proteico de dichas muestras biológicas que, preferiblemente, son muestras de sangre o suero.

La determinación de la concentración de proteína a los extremos de la monitorización debe realizarse en una primera muestra biológica y en al menos una segunda muestra biológica de un sujeto, obtenida respectivamente en un tiempo $t=0$ y $t>0$. El sujeto bajo examen puede ser, en particular, tanto un sujeto sometido a terapia contra la endometriosis como un sujeto monitoreado a tiempo sin necesariamente someterse a ningún tipo de terapia. En otros términos, por lo tanto, la primera muestra biológica obtenida en el momento $t=0$ puede ser una muestra adquirida, en un sujeto sometido a terapia contra la endometriosis, por ejemplo, antes del inicio de la terapia en sí, y en su lugar un sujeto no sometido a terapia, adquirido en un tiempo genérico $t=0a$. De lo contrario, la segunda muestra biológica puede adquirirse en uno o más intervalos de tiempo a partir de dicho tiempo $t=0$, por lo tanto definida como tiempos $t>0$, por ejemplo, cada 15, 20, 30 días. Preferiblemente, la primera y segunda muestra se obtienen respectivamente antes del inicio de una terapia contra la endometriosis y durante y/o después de dicha terapia. A continuación, una comparación entre la concentración obtenida en dicha primera y dicha al menos segunda muestra para una misma proteína, entre las indicadas aquí, proporcionará información sobre el curso del estado patológico del paciente.

La variación de la concentración de al menos una de las proteínas que comprende o que consiste en las SEQ ID NO 1-6 entre las dos muestras analizadas es, por lo tanto, el instrumento que permite al clínico una evaluación de la efectividad o ineficacia de la estrategia terapéutica seleccionada. En particular, una disminución de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende o que consiste en las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 y/o un aumento de la concentración de dicha proteína que comprende o consiste en las SEQ ID NO 2, SEC ID NO 3 o SEQ ID NO 6 en dicha primera muestra con respecto a dicho al menos al segundo, es indicativo de una progresión de la endometriosis, en otros términos, por lo tanto, de una terapia escasamente eficaz. Viceversa, un aumento de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende o que consiste en las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 4 o SEQ ID NO 5 y/o una disminución de la concentración de dicha proteína que comprende o consiste en las SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 6 en dicha primera muestra con respecto a dicho al menos segundo, es indicativo de la efectividad de la terapia contra la endometriosis. Alternativamente, una no variación de la concentración de las proteínas anteriores en dichas muestras puede indicar una desaceleración y/o detención de la progresión de la endometriosis en el paciente.

Como ya se ha resaltado, el tipo de terapia a monitorizar es una terapia genérica contra la endometriosis. En particular, la terapia también puede ser un tratamiento de tipo quirúrgico.

Un objeto de la presente descripción es también el uso de un kit para el diagnóstico de la endometriosis y/o la monitorización de la endometriosis en un sujeto. Preferiblemente, el kit puede ser un kit para la monitorización de una terapia contra la endometriosis. En particular, dicho kit comprende al menos una alícuota de uno o más reactivos necesarios para la determinación de la concentración de al menos una proteína que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, o mutantes y/o variantes postraducción de los mismos, en una muestra biológica de dicho sujeto. En una realización preferida de la presente invención, dichos uno o más reactivos son necesarios para la determinación de la concentración de una proteína que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 6.

Preferiblemente, el kit de acuerdo con la invención podría contener una o más alícuotas de al menos un anticuerpo específico monoclonal o policlonal primario contra una de las secuencias definidas en las SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 o SEQ ID NO. 6. El kit también podría contener una o más alícuotas de un anticuerpo secundario marcado o no marcado, siendo dicho anticuerpo secundario, por supuesto, específico para el sistema inmune del que se hizo el anticuerpo primario. Por lo tanto, si el anticuerpo primario se hace en ratón, el secundario será anti-ratón, si se hace en ratón será anti-conejo, etc.

El kit podría además contener controles negativos y/o controles positivos. En particular, el kit puede contener como control positivo una o más alícuotas que comprenden una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

Además, el kit puede comprender reactivos y medios adecuados para el procedimiento de detección de las proteínas anteriores mediante el uso de anticuerpos, tales como el regulador PBS u otros reactivos comúnmente utilizados para la detección de anticuerpos.

Los siguientes ejemplos y resultados experimentales tienen el propósito de indicar modos de realización de la presente descripción, sin ser sin embargo limitativos de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Recolección y almacenamiento de material biológico

Diez muestras de plasma, respectivamente de 5 pacientes con endometriosis determinada, después de la recolección de suero con cirugía y examen histológico, y de 5 pacientes sanos de control, se recolectaron y se almacenaron a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En detalle, las recolecciones de sangre realizadas por punción de las

venas periféricas se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y del plasma obtenido se tomó una alícuota y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 2: Análisis proteómico por método de gel bidimensional

5 Las muestras de plasma se agotaron antes de las proteínas más abundantes presentes en el suero (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y aptoglobina), para poder resaltar con mayor claridad las proteínas expresadas de forma diferente en los dos grupos de pacientes. A continuación, se extrajeron proteínas de 10 muestras de plasma y se separaron dichas proteínas por electroforesis en geles bidimensionales (gel 2DE de 20x30 cm). Las proteínas se resaltaron sobre el gel mediante una tinción con base en plata, adecuada para una posterior aplicación de espectrometría de masas. Mediante el uso de un software dedicado, las imágenes de los diferentes geles se compararon con puntos individuales expresados de manera constante y significativamente diferente en los dos grupos de pacientes. Se utilizaron pruebas estadísticas apropiadas para confirmar la validez estadística de estas diferencias. Este análisis identificó 5 puntos de forma significativa y constantemente expresados de manera diferente en pacientes con endometriosis con respecto a pacientes de control sanos.

Por un método de espectrometría de masas (LC ESI MS/MS), las proteínas que corresponden a dichos puntos expresados diferencialmente fueron señalados. La identificación de las proteínas correspondientes a las manchas identificadas por gel 2D se realizó mediante la tecnología nanoLC-ESI-MS/MS. El aparato MS era un sistema de nanoLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania), un NanoMate 100 (Advion, Ithaca, EE.UU.) y un espectrofotómetro de masas Finnigan LTQ-FT (ThermoFisher, Bremen, Alemania). Las manchas de proteína se digirieron directamente en el gel con tripsina (Promega, Mannheim, Alemania) y se aplicaron al sistema nanoLC-ESI-MS/MS. Los péptidos producidos por la digestión de las manchas de proteínas fueron atrapados en una columna específica de enriquecimiento (Zorbax SB C18, 0,3 x 5 mm, Agilent) durante cinco minutos, usando acetonitrilo al 1%/ácido fórmico al 0,5% como eluyente; posteriormente los péptidos se separaron en una columna Zorbax 300 SB C18 de 75 µm x 150 mm (Agilent) usando un gradiente de acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1% desde 5% a 40% de acetonitrilo durante un período de 40 minutos. Los espectros de masas se registraron automáticamente mediante espectrómetro de masas, siguiendo las condiciones de uso indicadas por el fabricante para los análisis nanoLC-ESI-MS/MS. Las proteínas correspondientes se identificaron a continuación utilizando el sistema de investigación MS/MS del motor de búsqueda Mascot (Matrix Science, Londres, Inglaterra) y la base de datos apropiada de proteínas (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.).

Las proteínas identificadas a través de dicho método son respectivamente:

- 35 1) Proteína correspondiente al mutante de apolipoproteína E humana E3K (SEQ ID NO: 1);
- 2) Proteína correspondiente a la cadena A del complejo de antitrombina lii humana (SEQ ID NO: 2);
- 3) Proteína correspondiente a la cadena A de la seroalbúmina humana (SEQ ID NO: 3);
- 4) Proteína correspondiente al precursor C3 del complemento (SEQ ID NO: 4);
- 40 5) Proteína aislada de Homo sapiens (SEQ ID NO: 5);
- 6) Proteína correspondiente a la glicoproteína Zn-alfa 2 (SEQ ID NO: 6)

En las Figuras 1A-F se muestran los histogramas que muestran la expresión diferente de las proteínas anteriores en una muestra de suero de pacientes con endometriosis, con respecto a las muestras de suero de una población de control.

45 REFERENCIA

- Fassbender A, Waelkens E, Verbeeck N, Kyama CM, Bokor A, Vodolazkaia A, Van de Plas R, Meuleman C, Peeraer K, Tomassetti C, Gevaert O, Ojeda F, De Moor B, D'Hooghe T: Proteomics analysis of plasma for early diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol* 2012, 119: 276-285.
- 50 - Giudice LC, and Kao LC: Endometriosis. *The Lancet*, 364: 1789-1799, 2004.
- Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod* 1996, 11: 878-880.
- Houston DE: Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. *Epidemiol Rev*, 6: 167-191, 1984.
- 55 - May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtkley S, Kennedy SH, Becker CM: Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod* 2010, 16: 651-674.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> signorile/baldi, pietrogiludio/alfonso
<120> Un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis
<130> BW708R

10 <160> 5
<170> BiSSAP 1.0

15 <210> 1
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..317
<223> /mol_tipo="proteina"/organismo="Homo sapiens"

<400> 1

```

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1      5      10      15
Gln Ala Lys Val Lys Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
      20      25      30
Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
      35      40      45
Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
      50      55      60
Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
      65      70      75      80
Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
      85      90      95
Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
      100      105      110
Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
      115      120      125
Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
      130      135      140
Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
      145      150      155      160
Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
      165      170      175
Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
      180      185      190
Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
      195      200      205
Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
      210      215      220
Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
      225      230      235      240
Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
      245      250      255
Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
      260      265      270
Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
      275      280      285
Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
      290      295      300
Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His

```

305

310

315

<210> 2
 <211> 432
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..432
 <223> /mol_tipo="proteina"/organismo="Homo sapiens"

<400> 2

ES 2 641 367 T3

His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
 1 5 10 15
 Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
 20 25 30
 Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
 35 40 45
 Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
 50 55 60
 His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
 85 90 95
 Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
 115 120 125
 Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
 130 135 140
 Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
 145 150 155 160
 Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
 165 170 175
 Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
 180 185 190
 Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
 195 200 205
 Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
 210 215 220
 Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
 225 230 235 240
 Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
 245 250 255
 Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
 260 265 270
 Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
 275 280 285
 Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
 290 295 300
 Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
 305 310 315 320
 Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
 325 330 335
 Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
 340 345 350
 Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
 355 360 365
 His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
 370 375 380
 Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
 385 390 395 400
 Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
 405 410 415
 Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
 420 425 430

ES 2 641 367 T3

<210> 3
<211> 585
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..585
10 <223> /mol_tipo="proteina"/organismo="Homo sapiens"

<400> 3

ES 2 641 367 T3

Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
			20					25					30		
Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
		35					40				45				
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
	50					55					60				
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
65				70						75					80
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
				85					90					95	
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu
			100					105					110		
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
		115					120					125			
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
	130					135					140				
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg
145				150						155					160
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
				165					170					175	
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser
			180					185					190		
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Xaa	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu
		195					200					205			
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro
	210					215					220				
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys
225					230					235					240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp
				245					250					255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser
			260					265					270		
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
		275					280					285			
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser
	290					295					300				
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala
305					310					315					320
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg
				325					330					335	
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr
			340					345					350		
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu

		355					360					365				
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	
	370					375					380					
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	
385					390			395							400	
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	
				405				410						415		
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	
			420					425					430			
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	
		435				440						445				
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	
	450					455					460					
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	
465					470				475						480	
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	
				485					490					495		
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	
			500					505					510			
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	
	515						520					525				
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	
	530				535						540					
Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	
545				550				555							560	
Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	
				565				570						575		
Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu								
			580					585								

<210> 4
 <211> 1663
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..1663

10 <223> /mol_tipo="proteína"/organismo="Homo sapiens"

<400> 4

ES 2 641 367 T3

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

ES 2 641 367 T3

Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys
 675 680 685
 Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg
 690 695 700
 Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys
 705 710 715 720
 Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg
 725 730 735
 Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp
 740 745 750
 Glu Asp Ile Ile Ala Glu Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro
 755 760 765
 Glu Ser Trp Leu Trp Asn Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn
 770 775 780
 Gly Ile Ser Thr Lys Leu Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr
 785 790 795 800
 Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys
 805 810 815
 Val Ala Asp Pro Phe Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp
 820 825 830
 Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg
 835 840 845
 Ala Val Leu Tyr Asn Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val
 850 855 860
 Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg
 865 870 875 880
 Arg His Gln Gln Thr Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val
 885 890 895
 Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val
 900 905 910
 Lys Ala Ala Val Tyr His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser
 915 920 925
 Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val
 930 935 940
 Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu
 945 950 955 960
 Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser
 965 970 975
 Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu
 980 985 990
 Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser
 995 1000 1005
 Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala
 1010 1015 1020
 Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu
 1025 1030 1035 1040
 Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln
 1045 1050 1055
 Leu Ala Phe Arg Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg
 1060 1065 1070
 Ala Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu
 1075 1080 1085
 Ala Val Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val
 1090 1095 1100
 Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu
 1105 1110 1115 1120
 Asp Ala Pro Val Ile His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn Asn
 1125 1130 1135
 Asn Glu Lys Asp Met Ala Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser Leu Gln
 1140 1145 1150
 Glu Ala Lys Asp Ile Cys Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser
 1155 1160 1165
 Ile Thr Lys Ala Gly Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln

ES 2 641 367 T3

1170	1175	1180													
Arg Ser Tyr Thr Val	Ala Ile Ala Gly Tyr	Ala Leu Ala Gln Met Gly													
1185	1190	1195													1200
Arg Leu Lys Gly Pro	Leu Leu Asn Lys Phe	Leu Thr Thr Ala Lys Asp													
	1205	1210													1215
Lys Asn Arg Trp Glu	Asp Pro Gly Lys Gln	Leu Tyr Asn Val Glu Ala													
	1220	1225													1230
Thr Ser Tyr Ala Leu	Leu Ala Leu Leu Gln	Leu Lys Asp Phe Asp Phe													
	1235	1240													1245
Val Pro Pro Val Val	Arg Trp Leu Asn Glu	Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly													
	1250	1255													1260
Gly Tyr Gly Ser Thr	Gln Ala Thr Phe Met	Val Phe Gln Ala Leu Ala													
1265	1270	1275													1280
Gln Tyr Gln Lys Asp	Ala Pro Asp His Gln	Glu Leu Asn Leu Asp Val													
	1285	1290													1295
Ser Leu Gln Leu Pro	Ser Arg Ser Ser Lys	Ile Thr His Arg Ile His													
	1300	1305													1310
Trp Glu Ser Ala Ser	Leu Leu Arg Ser Glu	Glu Thr Lys Glu Asn Glu													
	1315	1320													1325
Gly Phe Thr Val Thr	Ala Glu Gly Lys Gly	Gln Gly Thr Leu Ser Val													
	1330	1335													1340
Val Thr Met Tyr His	Ala Lys Ala Lys Asp	Gln Leu Thr Cys Asn Lys													
1345	1350	1355													1360
Phe Asp Leu Lys Val	Thr Ile Lys Pro Ala	Pro Glu Thr Glu Lys Arg													
	1365	1370													1375
Pro Gln Asp Ala Lys	Asn Thr Met Ile Leu	Glu Ile Cys Thr Arg Tyr													
	1380	1385													1390
Arg Gly Asp Gln Asp	Ala Thr Met Ser Ile	Leu Asp Ile Ser Met Met													
	1395	1400													1405
Thr Gly Phe Ala Pro	Asp Thr Asp Asp Leu	Lys Gln Leu Ala Asn Gly													
	1410	1415													1420
Val Asp Arg Tyr Ile	Ser Lys Tyr Glu Leu	Asp Lys Ala Phe Ser Asp													
1425	1430	1435													1440
Arg Asn Thr Leu Ile	Ile Tyr Leu Asp Lys	Val Ser His Ser Glu Asp													
	1445	1450													1455
Asp Cys Leu Ala Phe	Lys Val His Gln Tyr	Phe Asn Val Glu Leu Ile													
	1460	1465													1470
Gln Pro Gly Ala Val	Lys Val Tyr Ala Tyr	Tyr Asn Leu Glu Glu Ser													
	1475	1480													1485
Cys Thr Arg Phe Tyr	His Pro Glu Lys Glu	Asp Gly Lys Leu Asn Lys													
	1490	1495													1500
Leu Cys Arg Asp Glu	Leu Cys Arg Cys Ala	Glu Glu Asn Cys Phe Ile													
1505	1510	1515													1520
Gln Lys Ser Asp Asp	Lys Val Thr Leu Glu	Glu Arg Leu Asp Lys Ala													
	1525	1530													1535
Cys Glu Pro Gly Val	Asp Tyr Val Tyr Lys	Thr Arg Leu Val Lys Val													
	1540	1545													1550
Gln Leu Ser Asn Asp	Phe Asp Glu Tyr Ile	Met Ala Ile Glu Gln Thr													
	1555	1560													1565
Ile Lys Ser Gly Ser	Asp Glu Val Gln Val	Gly Gln Gln Arg Thr Phe													
	1570	1575													1580
Ile Ser Pro Ile Lys	Cys Arg Glu Ala Leu	Lys Leu Glu Glu Lys Lys													
1585	1590	1595													1600
His Tyr Leu Met Trp	Gly Leu Ser Ser Asp	Phe Trp Gly Glu Lys Pro													
	1605	1610													1615
Asn Leu Ser Tyr Ile	Ile Gly Lys Asp Thr	Trp Val Glu His Trp Pro													
	1620	1625													1630
Glu Glu Asp Glu Cys	Gln Asp Glu Glu Asn	Gln Lys Gln Cys Gln Asp													
	1635	1640													1645
Leu Gly Ala Phe Thr	Glu Ser Met Val Val	Phe Gly Cys Pro Asn													
	1650	1655													1660

ES 2 641 367 T3

<210> 5
<211> 763
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..763
<223> /mol_tipo="proteína"/organismo="Homo sapiens"

10

<400> 5

ES 2 641 367 T3

Met	Arg	Leu	Leu	Trp	Gly	Leu	Ile	Trp	Ala	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Leu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Gln	Lys	Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Val	His
			20						25				30		
Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Val	Pro	Arg
		35					40					45			
Gly	Gln	Val	Val	Lys	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Arg	Asn	Pro	Ser	Arg	Asn
		50				55					60				
Asn	Val	Pro	Cys	Ser	Pro	Lys	Val	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Arg
65					70					75					80
Asp	Phe	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Pro	Leu	Lys	Asp	Ala	Lys	Ser
				85					90						95
Cys	Gly	Leu	His	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Ala
			100					105					110		
His	Ser	Pro	Trp	Leu	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Asn	Ile	Gln
		115					120					125			
Gly	Ile	Asn	Leu	Leu	Phe	Ser	Ser	Arg	Arg	Gly	His	Leu	Phe	Leu	Gln
	130						135				140				
Thr	Asp	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Arg	Tyr	Arg	Val
145					150					155					160
Phe	Ala	Leu	Asp	Gln	Lys	Met	Arg	Pro	Ser	Thr	Asp	Thr	Ile	Thr	Val
				165						170					175
Met	Val	Glu	Asn	Ser	His	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Val	Tyr
			180					185					190		
Met	Pro	Ser	Ser	Ile	Phe	Gln	Asp	Asp	Phe	Val	Ile	Pro	Asp	Ile	Ser
		195					200					205			
Glu	Pro	Gly	Thr	Trp	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Glu
		210				215						220			
Ser	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Phe	Glu	Val	Lys	Lys	Tyr	Val	Leu	Pro	Asn
225					230					235					240
Phe	Glu	Val	Lys	Ile	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Tyr	Ile	Leu	Thr	Val	Pro
				245						250				255	
Gly	His	Leu	Asp	Glu	Met	Gln	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala	Arg	Tyr	Ile	Tyr
			260					265					270		
Gly	Lys	Pro	Val	Gln	Gly	Val	Ala	Tyr	Val	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp
		275					280					285			
Glu	Asp	Gly	Lys	Lys	Thr	Phe	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Ser	Gln	Thr	Lys
	290					295					300				
Leu	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	His	Ile	Ser	Leu	Ser	Lys	Ala	Glu	Phe	Gln
305					310						315				320
Asp	Ala	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Met	Gly	Ile	Thr	Asp	Leu	Gln	Gly	Leu
				325						330				335	
Arg	Leu	Tyr	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Ile	Glu	Ser	Pro	Gly	Gly	Glu	Met
			340						345					350	
Glu	Glu	Ala	Glu	Leu	Thr	Ser	Trp	Tyr	Phe	Val	Ser	Ser	Pro	Phe	Ser
		355					360					365			
Leu	Asp	Leu	Ser	Lys	Thr	Lys	Arg	His	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Pro	Phe
	370					375					380				
Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Met	Ser	Gly	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly
385					390					395					400
Ile	Pro	Val	Lys	Val	Ser	Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Val	Pro
				405					410					415	

Glu Val Gln Asp Ile Gln Gln Asn Thr Asp Gly Ser Gly Gln Val Ser
 420 425 430
 Ile Pro Ile Ile Ile Pro Gln Thr Ile Ser Glu Leu Gln Leu Ser Val
 435 440 445
 Ser Ala Gly Ser Pro His Pro Ala Ile Ala Arg Leu Thr Val Ala Ala
 450 455 460
 Pro Pro Ser Gly Gly Pro Gly Phe Leu Ser Ile Glu Arg Pro Asp Ser
 465 470 475 480
 Arg Pro Pro Arg Val Gly Asp Thr Leu Asn Leu Asn Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Gly Ser Gly Ala Thr Phe Ser His Tyr Tyr Tyr Met Ile Leu Ser Arg
 500 505 510
 Gly Gln Ile Val Phe Met Asn Arg Glu Pro Lys Arg Thr Leu Thr Ser
 515 520 525
 Val Ser Val Phe Val Asp His His Leu Ala Pro Ser Phe Tyr Phe Val
 530 535 540
 Ala Phe Tyr Tyr His Gly Asp His Pro Val Ala Asn Ser Leu Arg Val
 545 550 555 560
 Asp Val Gln Ala Gly Ala Cys Glu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Val Asp
 565 570 575
 Gly Ala Lys Gln Tyr Arg Asn Gly Glu Ser Val Lys Leu His Leu Glu
 580 585 590
 Thr Asp Ser Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Ala Leu Asp Thr Ala Leu
 595 600 605
 Tyr Ala Ala Gly Ser Lys Ser His Lys Pro Leu Asn Met Gly Lys Val
 610 615 620
 Phe Glu Ala Met Asn Ser Tyr Asp Leu Gly Cys Gly Pro Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 Asp Ser Ala Leu Gln Val Phe Gln Ala Ala Gly Leu Ala Phe Ser Asp
 645 650 655
 Gly Asp Gln Trp Thr Leu Ser Arg Lys Arg Leu Ser Cys Pro Lys Glu
 660 665 670
 Lys Thr Thr Arg Lys Lys Arg Asn Val Asn Phe Gln Lys Ala Ile Asn
 675 680 685
 Glu Lys Leu Gly Gln Tyr Ala Ser Pro Thr Ala Lys Arg Cys Cys Gln
 690 695 700
 Asp Gly Val Thr Arg Leu Pro Met Met Arg Ser Cys Glu Gln Arg Ala
 705 710 715 720
 Ala Arg Val Gln Gln Pro Asp Cys Arg Glu Pro Phe Leu Ser Cys Cys
 725 730 735
 Gln Phe Ala Glu Ser Leu Arg Lys Lys Ser Arg Asp Lys Gly Gln Glu
 740 745 750
 Gly Leu Gly Ser Pro Ser Ala Arg Ser Pro Ala
 755 760

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para el diagnóstico de endometriosis en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) determinar la concentración de la SEQ ID NO: 6, (Zn-alfa-2-glicoproteína (ZAG)) o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una muestra biológica de dicho sujeto y en una muestra de control;
- b) comparar dicha concentración en dicha muestra biológica y dicha muestra de control
- 10 en el que un aumento de la concentración de dicha SEQ ID NO 6 con respecto a la misma proteína en dicho control es indicativo de endometriosis.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha etapa a) comprende además la determinación de al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID
- 15 NO 3, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 1, o mutantes y/o variantes postraducción de la misma en una muestra biológica de dicho sujeto.
- en el que un aumento de la concentración de dicha por lo menos SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 2 y/o una disminución de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de las
- 20 SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 1 con respecto a la misma proteína en dicho control es indicativa de endometriosis.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además una etapa de obtención de un extracto proteico de dicha muestra biológica.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha muestra biológica es sangre o suero.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha determinación se realiza mediante inmunoprecipitación Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), inmunoquímica, matriz de proteínas, espectrometría de masas.
- 30 6. Un método in vitro para la monitorización de la endometriosis en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:
- 35 a) determinar la concentración de al menos una proteína que comprende la SEQ ID NO 6, o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una primera y una segunda muestras biológicas, obtenidas respectivamente en un tiempo $t=0$ y $t>0$, de dicho sujeto,
- b) comparar dicha concentración obtenida para dichas primera y segunda muestra.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha etapa a) comprende además la determinación de al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 1, o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una muestra biológica de dicho sujeto.
- 45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que un aumento de la concentración de dicha proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de las SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 2 y/o una disminución de la concentración de dicha al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de las SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 1 en dicha primera muestra con respecto a dicha segunda
- 50 muestra es indicativa de una progresión de endometriosis.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dichas primera y segunda muestra se obtienen respectivamente antes del inicio de una terapia y durante y/o después de dicha terapia.
- 55 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además una etapa de obtener un extracto proteico de dichas muestras biológicas.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que dichas muestras biológicas son sangre o suero.
- 60 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha terapia es un tratamiento quirúrgico.

13. El uso de un kit que comprende:

5 - al menos una alícuota de uno o más reactivos necesarios para la determinación de la concentración de al menos una proteína que comprende la SEQ ID NO 6, (Zn-alfa-2-glicoproteína (ZAG)) o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una muestra biológica de dicho sujeto y al menos una alícuota de uno o más reactivos necesarios para la determinación de la concentración de al menos una proteína que comprende una secuencia seleccionada del grupo de: SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 1, o mutantes y/o variantes postraducción de la misma, en una muestra biológica de dicho sujeto en un método de acuerdo con la reivindicación 1.

10 14. El uso del kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además al menos una alícuota de un control positivo que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de: SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 1.

15

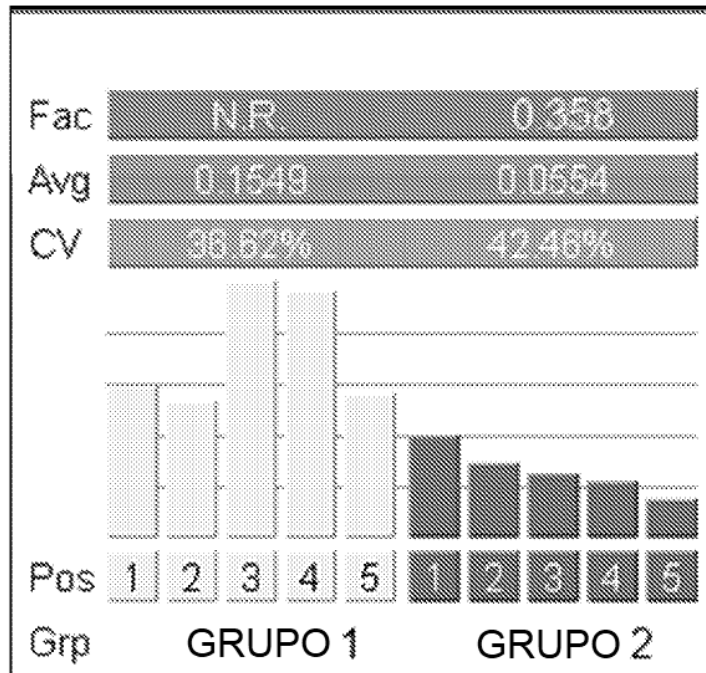


FIG. 1A

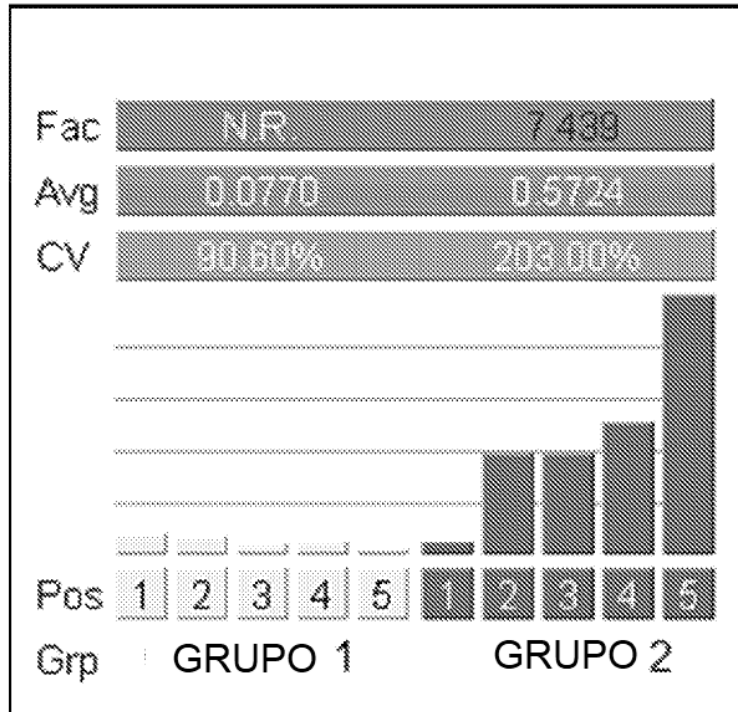


FIG. 1B

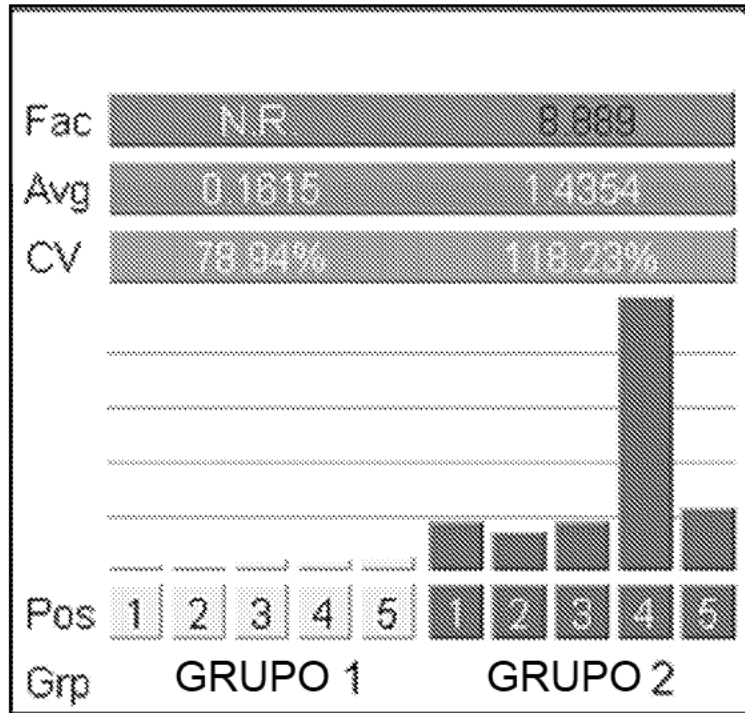


FIG. 1C

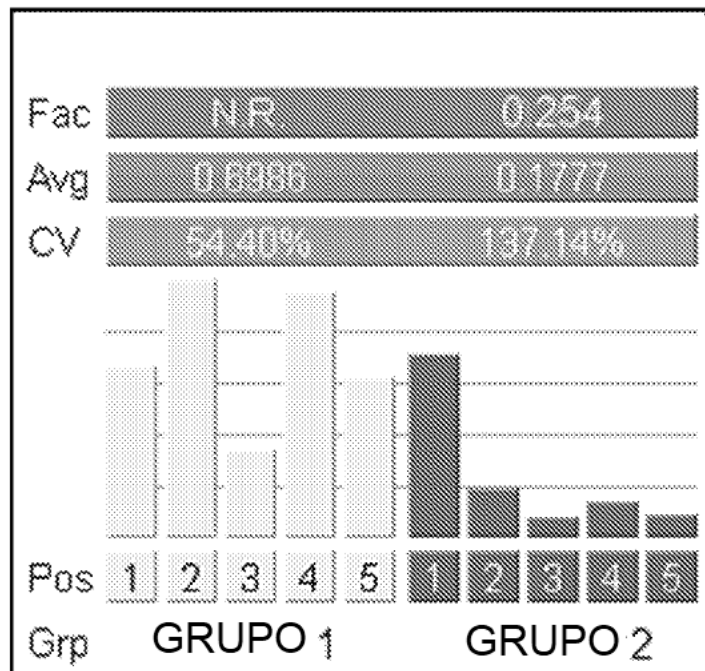


FIG. 1D

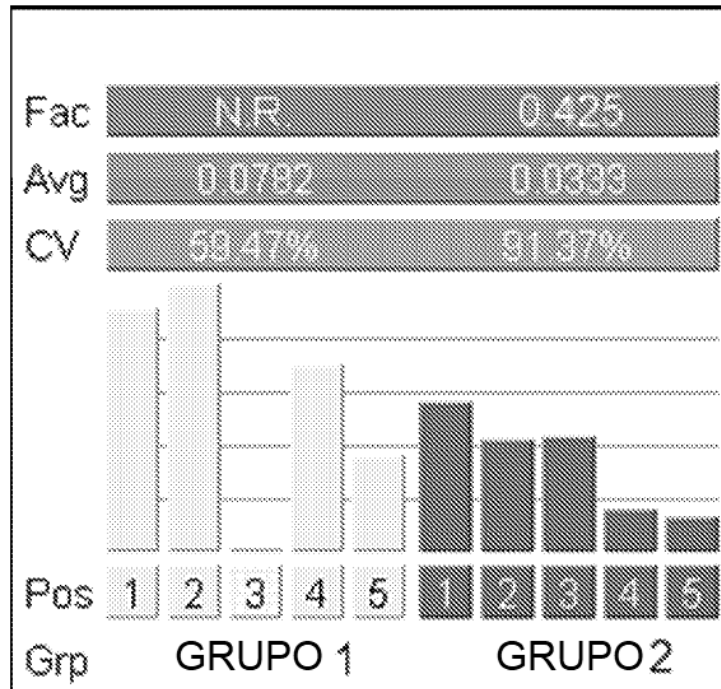


FIG. 1E

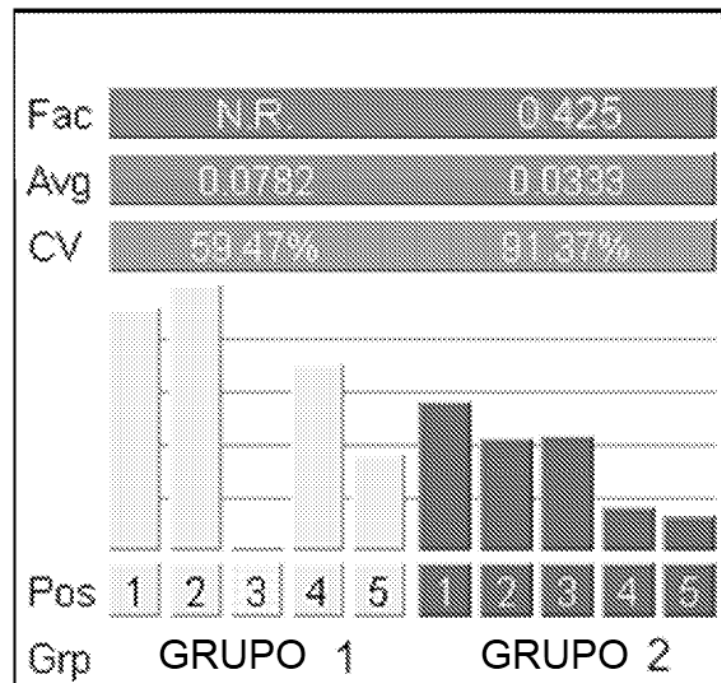


FIG. 1F

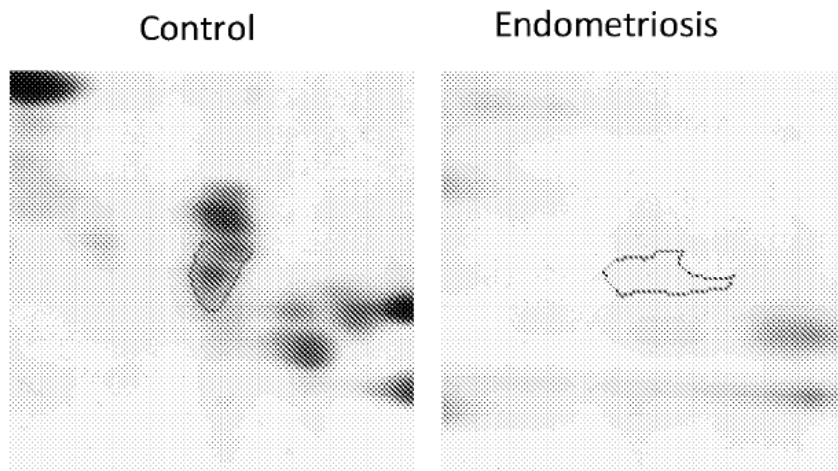


FIG. 2A

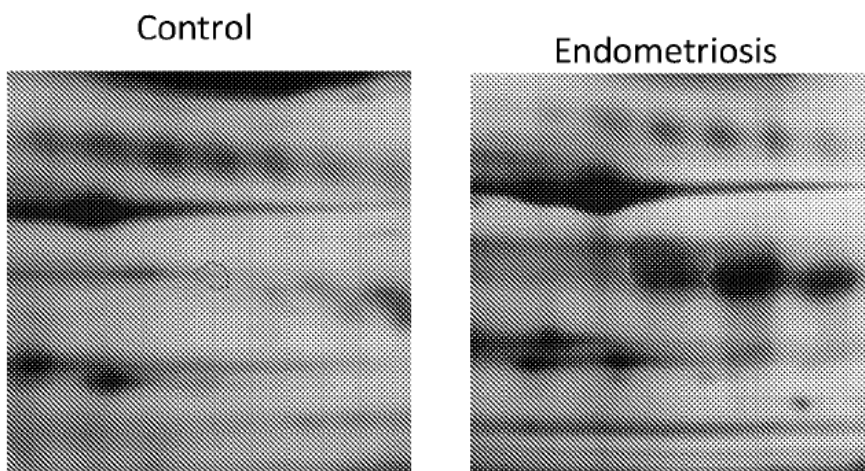


FIG. 2B

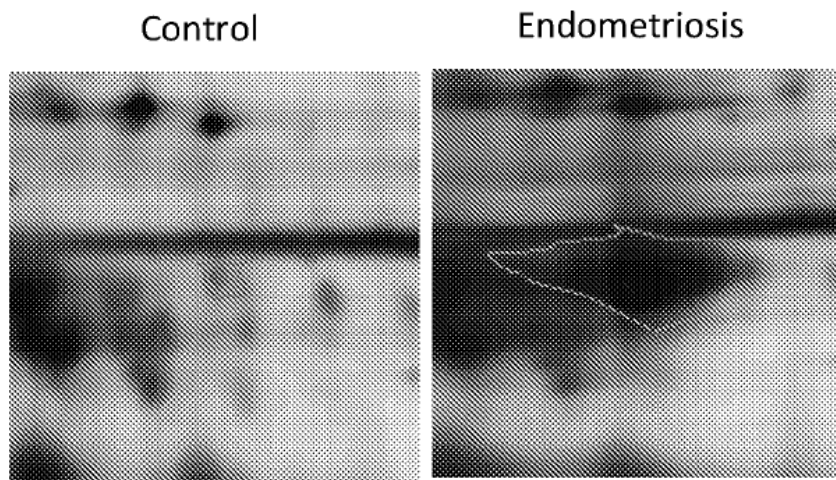


FIG. 2C

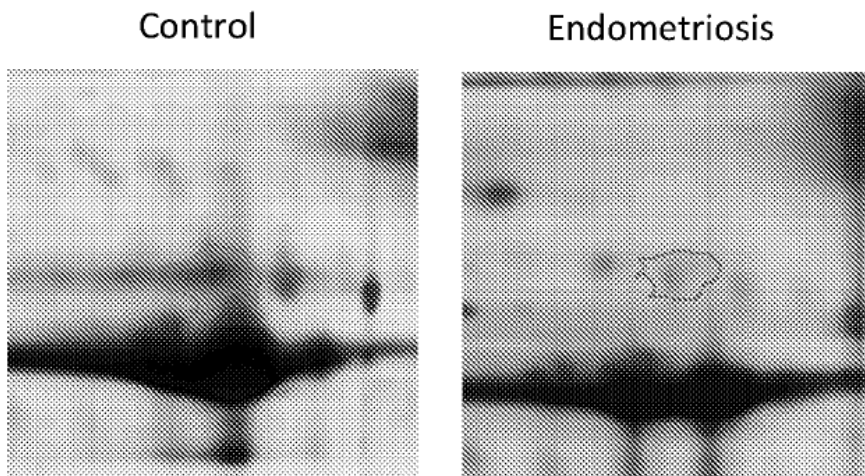


FIG. 2D

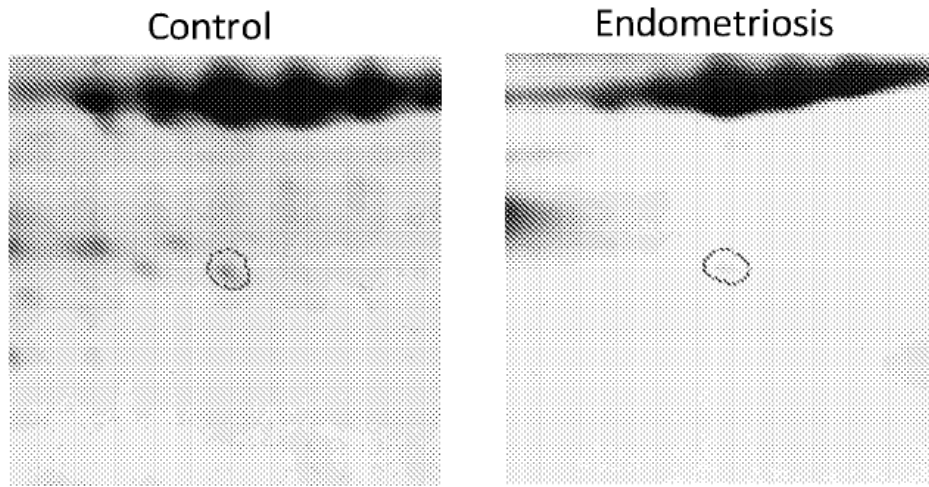


FIG. 2E

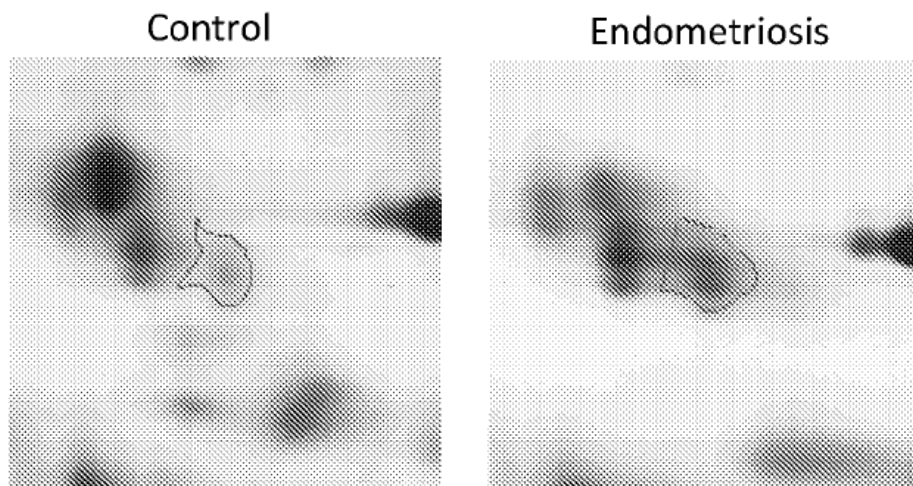


FIG. 2F