

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 355**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2015** **PCT/EP2015/051856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015** **WO15114062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2015** **E 15707883 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 3099312**

54 Título: **Nuevas dianas para el tratamiento y prevención de la diabetes**

30 Prioridad:

29.01.2014 EP 14153017

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)
4, rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%) y
VAXINE PTY LTD (33.3%)

72 Inventor/es:

MARION, VINCENT y
PETROVSKY, NIKOLAI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 714 355 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

Nuevas dianas para el tratamiento y prevención de la diabetes

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina. Más concretamente se refiere a la diabetes.

5 Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus o diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas en las que una persona tiene alta concentración de azúcar en sangre, ya sea porque el páncreas no produce suficiente insulina o porque las células no responden a la insulina que se produce.

Hay tres tipos principales de diabetes:

- 10 - El tipo 1 se debe a la incapacidad del cuerpo para producir insulina, y actualmente requiere que la persona se inyecte insulina o use una bomba de insulina.
- El tipo 2 se debe a la resistencia a la insulina, una enfermedad en la cual las células no pueden utilizar la insulina adecuadamente.
- El tercero se denomina diabetes gravídica y ocurre en las mujeres embarazadas.

- 15 Los índices de diabetes tipo 2 han aumentado notablemente desde 1960 en paralelo con la obesidad: a partir de 2010 hay aproximadamente 285 millones de personas con la enfermedad en comparación con alrededor de 30 millones en 1985. Las complicaciones de larga duración por un alto nivel de azúcar en la sangre pueden incluir enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares, retinopatía diabética, insuficiencia renal crónica que puede requerir diálisis y mala circulación en las extremidades, lo que lleva a amputaciones. Puede producirse un coma hiperosmolar no cetósico.

- 20 Se ha publicado que la hiperglucemia participa en el deterioro inicial y progresivo de la diabetes mellitus, es decir, la teoría de la toxicidad de la glucosa. Es decir, la hiperglucemia crónica conduce a disminuir la secreción de insulina y además a disminuir la sensibilidad a la insulina, y como resultado, la concentración de glucosa en la sangre aumenta de modo que la diabetes mellitus empeora por sí sola. Por lo tanto, al tratar la hiperglucemia, el ciclo de autoempeoramiento mencionado anteriormente se interrumpe de modo que la profilaxis o el tratamiento de la diabetes mellitus es posible.

- 25 Desgraciadamente, los tratamientos existentes no logran restaurar la normoglucemia a largo plazo, ya que la función de las células beta disminuye con el tiempo. Además, actualmente no hay un solo fármaco capaz de revertir todos los aspectos de la enfermedad.

- 30 La naturaleza progresiva de la diabetes tipo 2 significa que muchos pacientes finalmente requerirán una medicación hipoglucémica oral, posiblemente junto con inyecciones de insulina y/o exenatida. Se han desarrollado agentes antidiabéticos para contrarrestar los principales mecanismos involucrados en la diabetes tipo 2: resistencia a la insulina (biguanidas y tiazolidinedionas) y secreción de insulina (sulfonilureas, glinidas, inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-4, agonistas del receptor del péptido 1 glucagonoide), agentes que retrasan la absorción de glucosa por el aparato digestivo o favorecen la pérdida de peso y nuevos agentes que favorecen la excreción renal de glucosa. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de estos medicamentos tienen efectos secundarios perjudiciales, como el aumento de peso, edema periférico o insuficiencia cardíaca congestiva y hay un problema importante con la pérdida de eficacia de estos agentes en el uso a largo plazo. Por lo tanto, a pesar del número creciente de opciones terapéuticas para el control glucémico hay necesidad de medicamentos alternativos y
- 40 mejorados para el tratamiento de la diabetes y afecciones relacionadas.

Compendio de la invención

- Los inventores identificaron una nueva diana para el tratamiento de la diabetes, en particular la diabetes tipo 2. Hicieron el novedoso descubrimiento de que ALMS1 (proteína 1 del síndrome de Alström) está involucrada en la regulación por la insulina de la absorción de glucosa por adipocitos maduros mediante sus interacciones de unión
- 45 con moléculas clave involucradas en la regulación de la glucosa. En resumen, cuando la insulina se une a su receptor, mostraba que se forma un complejo proteico alrededor de Alms1 (ALMSome) y se activa, lo que lleva a la activación de la bomba de H⁺, la translocación del receptor GLUT4 y la absorción de glucosa por los adipocitos. También mostraron que, en ausencia de Alms1 y, por lo tanto, prevención del ensamblaje del ALMSome, la glucosa no puede transportarse a las células debido a un fallo de la fusión de GLUT4 con la membrana celular. Por lo tanto, mostraban que la modulación de la formación del complejo LMS1 puede usarse para regular el
- 50 transporte de glucosa y por lo tanto puede usarse para engañar la resistencia a la insulina, y tratar la diabetes tipo 2.

Más particularmente, los inventores identificaron dos proteínas implicadas en la regulación del transporte de glucosa por ALMS1, a saber, TBC1D4 (miembro 4 de la familia del dominio TBC1) y αPKC (tipo PKCα o proteína Cinasa C

tipo alfa). Más especialmente, los puntos de unión de estas dos proteínas reguladoras de glucosa en ALMS1 están tan cerca que la unión simultánea de ambas proteínas no es posible debido al impedimento estérico. TBC1D4, a través de su interacción con proteínas (es decir, Rab10, Rab14, etc.) y ALMS1, regula la translocación de los receptores GLUT4 a la membrana celular. Por otra parte, α PKC, cuando se une a ALMS1, bloquea el punto de unión a TBC1D4 y, por lo tanto, regula a la baja la translocación de los receptores GLUT4 a la membrana celular, reduciendo la absorción de glucosa celular. Además, demostraron que apuntando a de la interacción de ALMS1 y α PKC es suficiente para desencadenar la absorción de glucosa en los adipocitos independientemente de la presencia de INS. Por consiguiente, una nueva estrategia terapéutica puesta de manifiesto en esta invención es mejorar la absorción de glucosa celular y reducir la hiperglucemia mediante el bloqueo de la unión de α PKC en ALMS1. Más preferiblemente, la unión de α PKC en ALMS1 se inhibe de tal manera que la unión de TBC1D4 en ALMS1 no se ve afectada o incluso mejoró.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una molécula capaz de evitar la unión de α PKC a ALMS1 para su uso en el tratamiento o retraso de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia. También se refiere al uso de dicha molécula para la preparación de un medicamento para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia. También se refiere a un método para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en un sujeto que lo necesite, en donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula capaz de evitar la unión de α PKC a ALMS1, aumentando así la absorción de glucosa inducida por la insulina. En una realización preferida, la molécula no interfiere con la unión de TBC1D4 a ALMS1. Preferiblemente, la molécula se selecciona del grupo que consiste en péptidos o polipéptidos o peptidomiméticos, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, aptámeros, Spiegelmers y compuestos químicos. Más preferiblemente, la molécula es un péptido de menos de 50 aminoácidos, preferiblemente de menos de 20 aminoácidos.

En una primera realización preferida, la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 (SEC ID. nº 1). Preferiblemente, la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 que incluye uno o varios de los restos que se prevén que median en la interacción con α PKC, en particular uno o varios de los restos seleccionados en la lista que consiste en E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 y E2884. En una realización muy particular, la molécula es un péptido que comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

- LDSDSHYGPQHLESIDD (SEC ID. nº 5);
- DSHQTEETL (SEC ID. nº 6);
- QQTLPESHLP (SEC ID. nº 7);
- QALLDSHLPE (SEC ID. nº 8);
- PADQMTDTP (SEC ID. nº 9);
- HIPEEAQKVS AV (SEC ID. nº 10);
- SCIFLEQ (SEC ID. nº 11), y
- un fragmento de la misma que comprende 6 aminoácidos contiguos.

En una segunda realización preferida, la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC (SEC ID. nº 4). Preferiblemente, la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC que incluye uno o varios de los restos que se prevé que median en la interacción con ALMS1, en concreto uno o varios de los restos seleccionados en la lista que consiste en F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 e I667.

La presente invención también se refiere a un método para identificar moléculas adecuadas para su uso para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en donde la capacidad de la molécula para evitar la unión de α PKC a ALMS1 se analiza y se seleccionan las moléculas capaces de evitar esta unión. El método puede comprender además una etapa en la que se prueba la capacidad de la molécula seleccionada para interferir con la unión de TBC1D4 a ALMS1 y en donde se seleccionan las moléculas que no interfieren. Preferiblemente, la unión se determina en un sistema celular que responde a la insulina. Opcionalmente, la unión se determina en presencia y/o ausencia de insulina.

Una estrategia terapéutica adicional dada a conocer en esta invención es mejorar la absorción de glucosa celular mediante la mejora de la unión de TBC1D4 en ALMS1. Una estrategia terapéutica adicional dada a conocer en esta invención es potenciar la absorción de glucosa celular al aumentar la expresión de ALMS1.

En consecuencia, la presente invención se refiere además a una molécula capaz de mejorar la unión de TBC1D4 en ALMS1 o aumentar la expresión de ALMS1 para su uso en el tratamiento o retraso de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en particular de la diabetes tipo 2. También se refiere al uso de dicha molécula para la preparación de un medicamento para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en particular la diabetes tipo 2. También se refiere a un método para tratar o retrasar la evolución o aparición de la diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en particular de la diabetes tipo 2, en un sujeto que lo necesite, en donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula capaz de mejorar la unión de TBC1D4 en ALMS1 o aumentar la expresión de ALMS1, lo que aumenta la absorción de glucosa inducida por la insulina. En una realización preferida, la molécula también inhibe la unión de α PKC en ALMS1.

La presente invención también se refiere a un método para identificar moléculas adecuadas para su uso en el tratamiento de la diabetes, en el que se ensaya la capacidad de la molécula para aumentar la expresión de ALMS1 y se seleccionan las moléculas capaces de regular aumentar ALMS1. Además, se refiere al método para identificar moléculas adecuadas para su uso en el tratamiento de la diabetes, en el que se ensaya la capacidad de la molécula para aumentar la unión de TBC1D4 a ALMS1 y se seleccionan las moléculas capaces de aumentar esta unión. Opcionalmente, el método comprende además determinar la capacidad de la molécula para evitar que la unión de α PKC a ALMS1 se ensaye y seleccionar las moléculas capaces de evitar esta unión.

Descripción detallada de la invención

Los inventores identificaron ALMS1 como la pieza clave que falta involucrada en la regulación de la absorción de glucosa mediada por insulina por las vesículas de clasificación GLUT4 en adipocitos.

Ahora se ha reconocido que, incluso si el tejido adiposo es responsable de aproximadamente el 20% de la absorción de glucosa, una disfunción en este tejido puede provocar la aparición de diabetes. Por lo tanto, cualquier medio capaz de regular la absorción de glucosa mediada por la insulina en los adipocitos debería poder retrasar, revertir o evitar la aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad, e hiperinsulinemia.

La actividad ALMS1 disminuye por la unión de α PKC mientras que se activa por la unión de TBC1D4. También se ha demostrado que los puntos de unión de estas dos proteínas en ALMS1 están tan cerca que no se permite la unión simultánea de ambas proteínas debido al impedimento estérico. Por lo tanto, este mecanismo de regulación es un nuevo objetivo para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia y los inventores proponen utilizar una molécula capaz de evitar la unión de α PKC a ALMS1 para estas indicaciones terapéuticas.

Definiciones

ALMS1, proteína 1 del síndrome de Alström, es una proteína codificada por el gen *ALMS1*. Se ha descubierto que las mutaciones en el gen *ALMS1* son causantes del síndrome de Alström. Se describe en varias bases de datos, a saber, UniProt ID. n° Q8TCU4; ID. gen n° 7840, HGNG ID. n° 428. Las secuencias de referencia se describen en Genbank bajo NM_015120.4 para ARNm y NP_055935.4 para proteína. La secuencia de proteínas de ALMS1 humano se describe en la SEC ID. n° 1.

Se supone que TBC1D4 (miembro 4 de la familia de dominios TBC1), también llamado actualmente As160, actúa como una proteína activadora de GTPasa para RAB2A, RAB8A, RAB10 y RAB14. Se describe en varias bases de datos, a saber, UniProt ID. n° 060343, Gen ID. n° 9882, HGNG ID. n° 19165. Las secuencias de referencia se describen en Genbank bajo NM_014832.3 para el ARNm y NP_055647.2 para la proteína (para la isoforma 1, elegida como secuencias canónicas). La isoforma 2, que difiere de la isoforma por la falta de los aminoácidos en las posiciones 678-740 y referenciada en UniProt con el n° 060343-2, favorece la translocación del transportador de glucosa SLC2A4/GLUT4 inducida por la insulina en la membrana plasmática, aumentando así la absorción de glucosa. La secuencia de proteínas de TBC1D4 humano (isoforma 1) se describe en la SEC ID. N° 2. La secuencia de proteínas de TBC1D4 humano (isoforma 2) se describe en la SEC ID. n° 3.

La proteína cinasa C tipo alfa, también llamada α PKC, PKC-A o PKC-alfa, pertenece a una familia de proteínas cinasas específicas de serina y treonina que pueden ser activadas por el calcio y el segundo mensajero diacilglicerol. Se describe en varias bases de datos, a saber, UniProt ID. n° P17252, gen ID. n° 9393, HGNG ID. n° 5578. Las secuencias de referencia se describen en Genbank bajo NM_02737.2 para ARNm y NP_002728.1 para proteínas. La secuencia proteica del α PKC humano se describe en la SEC ID. n° 4.

Métodos de detección

La presente invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para identificar, detectar o seleccionar una molécula capaz de evitar la unión de α PKC a ALMS1. El método comprende determinar el efecto de la(s) molécula(s) sobre la unión de α PKC a ALMS1, y seleccionar la(s) molécula(s) si la unión de α PKC a ALMS1 disminuye o se evita. Preferiblemente, el método comprende además determinar el efecto de la(s) molécula(s) sobre la unión de TBC1D4 a ALMS1, y eliminar la(s) molécula(s) si la unión de TBC1D4 a ALMS1 disminuye o se evita. Opcionalmente, el método puede comprender una etapa de selección de la(s) molécula(s) si la unión de TBC1D4 a ALMS1 aumenta o mejora.

La presente invención también se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para identificar, detectar o seleccionar una molécula capaz de mejorar o aumentar la unión de TBC1D4 a ALMS1. El método comprende determinar el efecto de la(s) molécula(s) sobre la unión de TBC1D4 a ALMS1, y seleccionar la molécula(s) si la unión de TBC1D4 a ALMS1 aumenta o mejora. Opcionalmente, el método comprende además determinar el efecto de la(s) molécula(s) sobre la unión de α PKC a ALMS1, y seleccionar la molécula(s) si la unión de α PKC a ALMS1 se reduce o evita.

Con el fin de determinar el efecto de una molécula en la unión de α PKC y/o TBC1D4 a ALMS1, se puede llevar a cabo cualquier tecnología conocida por los expertos en la técnica, en particular cualquier método adecuado para determinar interacciones de proteínas. Por ejemplo, ALMS1 o α PKC biotecnológicas o naturales purificadas se pueden unir a un chip de resonancia de plasmón de superficie y la otra molécula circular sobre el chip para evaluar la afinidad de unión, por ejemplo, en una máquina Biacore (General Electric, EE. UU.). La misma estrategia se puede utilizar para medir la afinidad de unión de ALMS1 y TBC1D4 o de ALMS1 y α PKC.

El efecto de la(s) molécula(s) en la unión de α PKC y/o TBC1D4 a ALMS1 es determinante midiendo la unión de α PKC y/o TBC1D4 a ALMS1 en ausencia y en presencia de la molécula analizada y comparando los enlaces de α PKC y/o TBC1D4 a ALMS1.

Además, el método de detección puede comprender una etapa preliminar para seleccionar la(s) molécula(s) capaces de unirse a ALMS1. De hecho, podría ser ventajoso que la molécula que evita la interacción entre ALMS1 y α PKC actúe directamente en el punto de unión a ALMS1 para α PKC. Alternativamente, el método de detección puede comprender una etapa preliminar para seleccionar la(s) molécula(s) capaz de unirse a α PKC. De hecho, también podría ser ventajoso que la molécula que evita la interacción entre ALMS1 y α PKC actúe directamente en el punto de unión a α PKC para ALMS1.

Además, el método de detección puede comprender una etapa preliminar para seleccionar la(s) molécula(s) capaces de unirse a TBC1D4.

En una realización preferida para identificar, detectar o seleccionar una molécula capaz de evitar la unión de α PKC a ALMS1, el método de detección de la presente invención comprende además determinar el efecto de la(s) molécula(s), en particular la(s) molécula(s) seleccionada(s), en la unión de TBC1D4 a ALMS1 y seleccionar la(s) molécula(s) si la(s) molécula(s) no disminuyen o evitan la unión de TBC1D4 a ALMS1. Aún más, el método puede comprender una etapa de selección de la molécula(s) si la(s) molécula(s) aumenta(n) o mejora(n) la unión de TBC1D4 a ALMS1.

En una realización preferida para identificar, detectar o seleccionar una molécula capaz de mejorar la unión de TBC1D4 a ALMS1, el método de selección de la presente invención comprende además determinar el efecto de la(s) molécula(s), en particular la(s) molécula(s) seleccionada(s) en la unión de α PKC a ALMS1 y seleccionar la(s) molécula(s) si la(s) molécula(s) disminuye(n) o evita(n) la unión de α PKC a ALMS1.

Debido al gran tamaño de los compañeros de unión, en particular ALMS1 y TBC1D4, los inventores prefieren usar sistemas celulares para los métodos de detección. Preferiblemente, el sistema celular es un sistema celular sensible a la insulina. Por ejemplo, el sistema celular podría seleccionarse entre una estirpe celular mesenquimatosa, una célula madre mesenquimatosa, una célula madre adiposa mesenquimatosa, un pre-adipocito y un adipocito. Preferiblemente, la célula es una célula humana.

Además, las determinaciones de unión pueden realizarse en ausencia o presencia de insulina, preferiblemente en presencia de insulina para la unión de α PKC a ALMS1 y en presencia de insulina para la unión de TBC1D4 a ALMS1.

En un primer aspecto, se puede realizar un ensayo de inmunoprecipitación utilizando ALMS1 como cebo, en particular como se detalla en el apartado experimental. Por ejemplo, el ensayo puede llevarse a cabo con células, en particular adipocitos, cultivadas en ausencia y/o presencia de insulina, preferiblemente en ausencia de insulina. Las moléculas a analizar se añaden en el medio de cultivo. A continuación, α PKC se inmunodetecta. Opcionalmente, TBC1D4 también puede inmunodetectarse. Este método se describe con detalle en el apartado Ejemplos.

En una realización preferida, la cantidad de α PKC unida a ALMS1 se determina y compara con la cantidad en ausencia de moléculas ensayadas, en particular en ausencia de insulina. Si la cantidad de α PKC unida a ALMS1 disminuye en presencia de la molécula probada, entonces se selecciona la molécula.

La cantidad de TBC1D4 unida a ALMS1 se determina y se compara con la cantidad en ausencia de moléculas probadas, en particular en presencia de insulina o ambas en presencia y ausencia de insulina. Si la cantidad de TBC1D4 unida a ALMS1 disminuye en presencia de la molécula probada, entonces la molécula se rechaza. Si la cantidad de TBC1D4 unida a ALMS1 aumenta en presencia de la molécula probada, entonces se selecciona la molécula.

En un segundo aspecto, la purificación por afinidad acoplada a la espectrometría de masas puede llevarse a cabo, en particular después de la reticulación química. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un medio desprovisto de metionina y leucina, pero que comprenden metionina y leucina fotoactivables. A continuación, las células se irradian con UV para estabilizar los complejos de proteínas y los complejos de proteínas se analizan por espectrometría de masas.

Otros métodos están disponibles para los expertos en la técnica, p. ej., complementación de fluorescencia bimolecular, purificación por afinidad en tándem y similares. En concreto, el documento WO2012/117245 describe un método para identificar moléculas capaces de evitar la interacción entre dos proteínas: WO2012/117245 (es decir, para identificar moléculas pequeñas). El documento WO2012/174489 también describe métodos para desarrollar moléculas adecuadas para evitar la interacción entre dos proteínas.

Además, también pueden diseñarse moléculas adecuadas por modelado molecular. Dichos métodos se detallan, por ejemplo, en el apartado Ejemplos.

En un aspecto concreto, la presente invención se refiere a un modelo de homología estructural de ALMS1 y a su uso en un método por simulación informática para identificar moléculas capaces de inhibir o estimular la función ALMSome, en particular para inhibir la interacción entre ALMS1 y α PKC y/o aumentar la interacción entre ALMS1 y TBC1D4.

También se refiere a un modelo de homología estructural de TBC1D4 y a su uso en un método por simulación informática para identificar moléculas capaces de inhibir o estimular la función ALMSome, en concreto para aumentar la interacción entre ALMS1 y TBC1D4.

La presente invención también se refiere a un método para identificar, detectar o seleccionar una molécula capaz de aumentar ALMS1 al nivel de genes y proteínas. El método comprende determinar el efecto de la(s) molécula(s) sobre la expresión de ALMS1 y seleccionar la(s) molécula(s) si la expresión de ALMS1 aumenta. Con el fin de determinar el efecto de una molécula en la expresión de ALMS1, puede llevarse a cabo cualquier tecnología conocida por el experto en la técnica. Se pueden usar diversas técnicas conocidas para detectar o cuantificar la expresión de ALMS1, incluida la secuenciación, hibridación, amplificación y/o unión a ligandos específicos (como los anticuerpos). Los métodos adecuados incluyen transferencia Southern (para los ADN), transferencia Northern (para los ARN), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), migración en gel, ELISA, radio-inmunoanálisis (RIA) y análisis inmunoenzimáticos (IEMA).

Por "aumentado", "aumento" o "mejorar" se refiere a una unión aumentada en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% en comparación con el enlace medido en ausencia de la molécula probada en las mismas condiciones. Por "disminuido" o "disminución" se pretende referirse a una unión disminuida en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% en comparación con la unión medida en ausencia de la molécula analizada en las mismas condiciones.

Además, los métodos de detección de la presente invención pueden comprender ensayos con modelos animales. Las moléculas a probar pueden administrarse a los modelos animales y se puede evaluar el efecto de las moléculas en la absorción de glucosa o la diabetes. Por ejemplo, los modelos animales podrían ser ratones o ratas con resistencia a la insulina, diabetes o hiperglucemia. El efecto de la molécula se puede evaluar midiendo la concentración de glucosa en la sangre.

Moléculas

Las moléculas capaces de evitar o bloquear la unión de α PKC a ALMS1 pueden ser cualquier ligando capaz de unirse a α PKC o ALMS1 y, de ese modo, evitar o bloquear la unión de α PKC a ALMS1.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula que evita o bloquea la unión de α PKC a ALMS1 interactuando con uno o más de los restos de ALMS1 seleccionados en la lista que consiste en E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 y E2884. En un aspecto alternativo, la presente invención se refiere a una molécula que evita o bloquea la unión de α PKC a ALMS1 al interactuar con uno o más de los restos de α PKC seleccionados en la lista que consiste en F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 y 1667.

Las moléculas capaces de mejorar o aumentar la unión de TBC1D4 a ALMS1 pueden ser cualquier ligando capaz de unirse a TBC1D4 o ALMS1 y, de este modo, mejorar o aumentar la unión de TBC1D4 a ALMS1.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula que mejora o aumenta la unión de TBC1D4 a ALMS1 interactuando con uno o más de los restos de ALMS1 seleccionados en la lista que consiste en H65, L66 y S2879. En un aspecto alternativo, presente invención se refiere a una molécula que mejora o aumenta la unión de TBC1D4 a ALMS1 interactuando con uno o más de los restos de TBC1D4 seleccionados en la lista que consiste en G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82 e I83.

La presente invención se refiere a dichas moléculas, a una composición farmacéutica que comprende dichas moléculas, y al uso de dichas moléculas como un fármaco o para la preparación de un fármaco.

Las moléculas pueden ser péptidos o polipéptidos o peptidomiméticos, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, aptámeros, Spiegelmers o compuestos químicos. Las moléculas pueden seleccionarse mediante los métodos de selección conocidos en la técnica o como se detalló anteriormente y pueden diseñarse por cualquier método conveniente de modelado por simulación informática.

En una realización preferida, la molécula es un péptido o polipéptido. Preferiblemente, el péptido puede tener entre 5 y 50 aminoácidos. Más preferiblemente, tiene entre 5 y 20 aminoácidos. Más preferiblemente, el péptido o polipéptido comprende menos de 50 aminoácidos, más preferiblemente menos de 40, 30, 20, 15 o 10 aminoácidos.

En un primer aspecto, la molécula es un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 (SEC ID. nº 1). En una realización preferida, la molécula es un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 que incluye uno o varios de los restos que se prevé que median la interacción con α PKC. En particular, estos restos se seleccionan en la lista que consiste en E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 y E2884. Más preferiblemente, estos restos se seleccionan en la lista que consiste en D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 y E2884. D58, S59, G62, H65 y L66 definen un primer segmento de interacción. T737 y E738 definen un segundo segmento de interacción. D828 y S829 definen un tercer segmento de interacción. T1088 y D1089 definen un cuarto segmento de interacción. A1169 y Q1170 definen un quinto segmento de interacción. F2882, L2883 y E2884 definen un sexto segmento de interacción.

En un aspecto muy particular, el péptido o polipéptido comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

- LDSDSHYGPQHLESIDD (SEC ID. nº 5), dirigida al primer segmento de interacción;
- DSHQTEETL (SEC ID. nº 6), dirigida al segundo segmento de interacción;
- QQTLPESHLP (SEC ID. nº 7);
- QALLDSHLPE (SEC ID. nº 8), dirigida al tercer segmento de interacción;
- PADQMTDTP (SEC ID. nº 9), dirigida al cuarto segmento de interacción;
- HIPEEAQKVS AV (SEC ID. nº 10), dirigida al quinto segmento de interacción;
- SCIFLEQ (SEC ID. nº 11), dirigida al sexto segmento de interacción, y
- un fragmento del mismo que comprende 6 aminoácidos contiguos.

En un segundo aspecto, la molécula es un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC (SEC ID. nº 4). En una realización preferida, la molécula es un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC que incluye uno o varios de los restos que se prevé que median la interacción con ALMS1. En concreto, estos restos se seleccionan en la lista que consiste en F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 e I667. F114, D116, C118 y L121 pueden definir un primer segmento de interacción. N138, Q142, I145 y P148 pueden definir un segundo segmento de interacción. E545, S562 y S566 pueden definir un tercer segmento de interacción. F597, D601, W602, K604 y E606 definen un cuarto segmento de interacción. V664 e I667 pueden definir un quinto segmento de interacción.

Opcionalmente, el péptido o polipéptido puede comprender una sustitución de uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, es decir, la SEC ID. nº 1 para péptidos procedentes de ALMS1, la SEC ID. nº 4 para péptidos procedentes de α PKC, y la SEC ID. nº 2 o 3 para péptidos procedentes de TBC1D4.

El péptido o polipéptido puede comprender además un resto que facilita su absorción celular o entrada, en particular un DTP (dominio de transducción de proteínas). El DTP generalmente comprende una determinada secuencia de aminoácidos de 10 a 20 aminoácidos (Matsushita y Matsui, (2005), *J. Mol. Med.* 83, 324-328; Vivès *et al.*, *Biochimic et Biophysica Acta*, 2008, 1786, 126-138). El DTP se compone principalmente de aminoácidos básicos como la arginina o la lisina, y los ejemplos representativos del DTP incluyen péptidos ricos en arginina como el poli R₈ (RRRRRRRR) o (RRPRRRRRPRRR), antenapedia o péptidos penetrantes tales como (RQIKIWFQNRRMKWKK) o HIV-Tat (YGRKKRRQRRR).

En un aspecto concreto, la molécula es un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo.

El péptido o polipéptido puede estar hecho de aminoácidos naturales y/o aminoácidos no naturales. Por "aminoácidos no naturales" se entiende un análogo o derivado de un aminoácido natural (es decir, Ala, Val, Gly, Leu, Ile, Lys, Arg, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Tyr, Phe, Trp, Ser, Pro, Thr, Cys, Met). Presentan una cadena lateral modificada, p. ej., más corta, más larga o con diferentes grupos funcionales. Se contemplan los isómeros D y L, en particular porque los isómeros D no son sensibles a las proteasas. Además, también se contemplan modificaciones en algunos o en todos los enlaces peptídicos para aumentar la resistencia a la proteólisis, en particular por (-CO-NH-) por (-CH₂-NH-), (-NH-CO-), (-CH₂-O-), (-CH₂-S-), (-CH₂-CH₂-), (-CO-CH₂-), (-CHOH-CH₂-), (-N=N-) y/o (-CH=CH-). El péptido puede presentar un extremo terminal C carboxílico (-COO⁻) y uno de amida (-CONH₂). El péptido también puede ser una secuencia D retro-inversa de un péptido como se describe en la presente memoria. El terminal N puede modificarse, especialmente con un radical acetilo. Opcionalmente, el péptido o polipéptido puede PEGilarse para aumentar la estabilidad. Alternativamente, el péptido puede modificarse para convertirse en un péptido grapado. La expresión "péptido grapado" como se emplea en la presente memoria se refiere a un péptido modificado artificialmente en el que la estructura se estabiliza con uno o más puentes moleculares artificiales (enlaces cruzados) que conectan espiras adyacentes de hélices α en el péptido. Las modalidades para preparar péptidos grapados se han estudiado ampliamente, por ejemplo, en Verdine & Hilinski (2012, *Methods Enzymol.*, 503, 3-33), documentos WO10033617 y WO10011313.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un péptido como se ha definido anteriormente y un vehículo/excipientes farmacéuticamente aceptable. También se refiere a un péptido como se ha definido anteriormente para su uso como fármaco o para el uso de un péptido como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento.

En una realización alternativa, la molécula es un anticuerpo, un fragmento del mismo o un derivado del mismo. Como se emplea en la presente memoria, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usan indistintamente en la presente invención. El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un punto de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno. Los anticuerpos incluyen cualquier tipo de anticuerpos, preferiblemente monoclonales. Pueden ser, por ejemplo, IgG (inmunoglobulina G) o VHH (anticuerpo de dominio variable de cadena pesada de camélidos). Los fragmentos de anticuerpos o sus derivados incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos, fragmentos o derivados pueden bloquear la interacción entre ALMS1 y α PKC. Preferiblemente, no tienen efecto en la interacción entre ALMS1 y TBC1D4 o tienen un efecto de mejora en la interacción.

En una primera realización, el anticuerpo es específico para ALMS1. En concreto, el epítipo del anticuerpo comprende uno o varios de los restos de ALMS1 involucrados en la interacción con α PKC, en concreto uno o varios restos seleccionados en la lista que consta de E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883, y E2884.

Alternativamente, el anticuerpo es específico para α PKC. En particular, el epítipo del anticuerpo comprende uno o varios de los restos de α PKC involucrados en la interacción con ALMS1, en particular uno o varios restos seleccionados en la lista que consiste en F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 e I667.

Dichos anticuerpos pueden producirse inmunizando mamíferos no humanos con péptidos o proteínas inmunogénicas que comprenden uno o varios restos identificados como implicados en la interacción entre ALMS1 y α PKC. Alternativamente, se puede proporcionar y explorar una biblioteca de anticuerpos. Los anticuerpos, fragmentos o derivados producidos se identifican por su capacidad para unirse a uno de los compañeros que interactúan y/o su capacidad para evitar, inhibir o bloquear la interacción entre ALMS1 y α PKC. Además, como se especificó anteriormente, los anticuerpos, fragmentos o derivados pueden identificarse aún más por su capacidad para modular la interacción entre TBC1D4 y ALMS1, y seleccionarse si aumentan o mejoran la interacción.

Los anticuerpos, fragmentos o derivados pueden mejorar la interacción entre ALMS1 y TBC1D4. Preferiblemente, tienen un efecto de bloqueo en la interacción entre ALMS1 y α PKC.

En una primera realización, el anticuerpo es específico para ALMS1. En concreto, el epítipo del anticuerpo comprende uno o varios de los restos de ALMS1 involucrados en la interacción con TBC1D4, en concreto uno o varios restos seleccionados en la lista que consiste en H65, L66 y S2879.

Alternativamente, el anticuerpo es específico para TBC1D4. En particular, el epítipo del anticuerpo comprende uno o varios de los restos de TBC1D4 involucrados en la interacción con ALMS1, en particular uno o varios restos seleccionados en la lista que consiste en G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82 e I83.

Dichos anticuerpos pueden producirse inmunizando mamíferos no humanos con péptidos o proteínas inmunógenos que comprenden uno o varios restos identificados como implicados en la interacción entre ALMS1 y TBC1D4. Alternativamente, se puede proporcionar y explorar una biblioteca de anticuerpos. Los anticuerpos, fragmentos o derivados producidos se identifican por su capacidad para unirse a uno de los compañeros que interactúan y/o su capacidad para mejorar o aumentar la interacción entre ALMS1 y TBC1D4. Además, como se especificó anteriormente, los anticuerpos, fragmentos o derivados pueden identificarse aún más para determinar su capacidad para modular la interacción entre α PKC y ALMS1, y seleccionarse si disminuyen o bloquean la interacción.

La preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales es bien conocida en la técnica, y se puede usar cualquiera de las numerosas técnicas disponibles (véase, p. ej., Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, págs. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales (patente de Estados Unidos nº 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos contra los polipéptidos deseados. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos, como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados, híbridos o modificados de manera similar. Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heterómeros que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, p. ej., McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)).

Para aptámeros y Spiegelmers, se pueden utilizar métodos similares para seleccionar aptámeros y Spiegelmers. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea aquí, el término "aptámero" significa una molécula de ácido nucleico o un péptido capaz de unirse a ALMS1, α PKC o TBC1D4. Se refiere a una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son oligonucleótidos u secuencias de oligopéptidos con capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con gran afinidad y especificidad.

Dichos ligandos pueden aislarse por evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., *Science*, 1990, 249 (4968): 505-10. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener por síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S. D., *Clin. Chem.*, 1999, 45 (9):1628-50. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo restringida por configuración mostrada por una proteína de plataforma, como la tiorredoxina A de *E. coli* que se selecciona de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas *et al.*, *Nature*, 1996, 380, 548-50).

Se han descrito spiegelmers, por ejemplo, en el documento WO 98/08856. Son moléculas similares a los aptámeros. Sin embargo, los spiegelmers consisten completamente o en su mayoría en L-nucleótidos en lugar de D-nucleótidos a diferencia de los aptámeros. De otra manera, concretamente con respecto a las posibles longitudes de los spiegelmers, se aplica lo mismo a los spiegelmers como se describe en relación con los aptámeros.

Compuestos químicos se refiere a una molécula de menos de aproximadamente 1.500 Dalton, 1.000 Dalton, 800 Dalton, o incluso menos de aproximadamente 500 Dalton, en concreto compuestos orgánicos o inorgánicos. El diseño estructural en química debería ayudar a encontrar dicha molécula. La molécula puede haber sido identificada por un método de detección descrito en la presente invención.

Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles en el mercado en varias compañías, entre ellas Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N. J.), Brandon Associates (Merrimack, N. H.) y Microsource (New Milford, Conn.). Las bibliotecas combinatorias están disponibles o pueden prepararse según técnicas sintéticas conocidas. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles, p. ej., en Pan Laboratories (Bothell, Wash.) Y MycoSearch (NC), o se pueden producir fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica.

Además, las bibliotecas y los compuestos producidos de forma natural y sintética pueden modificarse aún más a través de técnicas químicas y bioquímicas convencionales.

La molécula puede estar unida, por enlaces covalentes o no, a un resto que se dirige a tejidos apropiados, preferiblemente el tejido adiposo o a un resto que facilita la entrada de la molécula en las células.

Indicaciones terapéuticas

Los inventores proponen usar las moléculas como se describe en la presente memoria para aumentar la absorción de glucosa, en concreto por los adipocitos, regulando o controlando así la concentración de glucosa en sangre. Entonces, las moléculas son adecuadas para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.

La diabetes mellitus se caracteriza por hiperglucemia. Más particularmente, la diabetes tipo 2 se caracteriza por hiperglucemia y resistencia a la insulina. Se cree que la obesidad es la causa principal de la diabetes tipo 2 en personas genéticamente predispuestas a la enfermedad. La retinopatía diabética, la neuropatía diabética, la nefropatía diabética son trastornos bien conocidos relacionados con la diabetes y la resistencia a la insulina.

- 5 Además, disminuir la glucemia al aumentar la absorción de glucosa podría tratar o retrasar la evolución o la aparición de estas enfermedades.

La presente invención también se refiere a las moléculas según la invención para su uso para reducir la dosis de insulina o detener el tratamiento con insulina cuando se usa para tratar la diabetes en un sujeto, al uso de las moléculas según la invención para la preparación de un medicamento destinado a reducir la dosis de insulina o interrumpir el tratamiento con insulina cuando se usa para tratar la diabetes en un sujeto, o para un método para 10 tratar la diabetes en un sujeto, en donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula según la invención a un sujeto con una dosis disminuida de insulina o en ausencia de tratamiento con insulina. Más generalmente, se puede usar para disminuir las dosis de medicamentos antidiabéticos.

Por "tratar" o "tratamiento" se entiende que la enfermedad se cura, alivia o retarda. Incluye el tratamiento preventivo o curativo. El término tratamiento designa en particular la corrección, el retraso o la reducción de una homeostasis alterada de la glucosa. El término "tratamiento" también designa una mejora en la absorción de glucosa (p. ej., la 15 captura de glucosa por los adipocitos). En el contexto de la invención, las expresiones "controlar la concentración de glucosa en sangre" o "el control de la concentración de glucosa en sangre" se refieren a la normalización o la regulación de la concentración de glucosa en sangre o plasma en un mamífero con concentraciones anormales (es decir, concentraciones que están por debajo o por encima de un valor de referencia, medio o promedio conocido para un mamífero correspondiente con una homeostasis de glucosa normal).

La presente invención se refiere al uso farmacéutico o veterinario de la molécula. Por consiguiente, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano, tal como un adulto o un niño. En una realización concreta, el sujeto sufre de obesidad. Opcionalmente, el sujeto no tiene anticuerpos anti-isletos detectables, y la ecografía no 25 puso de manifiesto anomalías pancreáticas. En el contexto de una aplicación veterinaria, el sujeto puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, en particular un animal doméstico tal como un perro, un gato o un caballo.

Las moléculas según la invención pueden usarse en combinación con uno o más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos, en particular para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, 30 obesidad e hiperinsulinemia.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula según la presente invención y uno o más fármacos activos adicionales, preferiblemente un fármaco antidiabético.

Además, se refiere a un producto o botiquín que contiene una molécula según la invención y uno o más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos, como un preparado combinado para uso simultáneo, independiente o secuencial, o un preparado combinado que comprende una molécula según la invención y uno o 35 más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos, para uso simultáneo, independiente o secuencial, en particular para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.

Se refiere a una molécula según la invención para el uso o tratamiento de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, 40 obesidad e hiperinsulinemia en combinación con una o más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos.

También se refiere al uso de una molécula según la invención y a uno o más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos, para la preparación de un medicamento, en concreto al tratamiento o retraso de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía 45 diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.

Por último, se refiere a un método para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula según la invención se administra en combinación 50 con una cantidad terapéutica o subterapéutica eficaz de uno o más fármacos activos adicionales, preferiblemente fármacos antidiabéticos. Por "sub-terapéutica" se entiende que se refiere a una cantidad que puede ser, por ejemplo, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10% de la dosis terapéutica convencional (en concreto para la misma indicación y la misma vía de administración).

En concreto, el fármaco activo adicional es un fármaco utilizado para tratar o retrasar la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, 55 hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia. Por ejemplo, el medicamento adicional puede ser un medicamento antidiabético como un agente hipoglucemiante o un agente antihiperglucémico. Puede seleccionarse en la lista no

exhaustiva que comprende insulina, metformina, sulfonilureas, como tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida, gliburida (también llamada glibenclamida), glimepirida, glipizida, glicazida, glicopiramida y gliquidona, inhibidores de alfa-glucosidasa como acarbosa, miglitol y voglibosa, tiazolidindionas como pioglitazona y rosiglitazona, una meglitinida como repaglinida y nateglinida, miméticos de incretina, análogos y antagonistas peptídicos glucagonoides tales como exenotida, taspoglutida y liraglutida, inhibidores de dipeptidil-peptidasa-4 tales como vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina y septagliptina, análogos de amilina tal como pamlintida, glicocúricos tales como canaglifozina y dapaglifozina o cualquiera de sus combinaciones.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas o terapéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, bucal, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

La molécula utilizada en la composición farmacéutica de la invención está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente solicitud se refiere a una cantidad de agente terapéutico, administrada a un paciente que es suficiente para constituir un tratamiento de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia como se definió anteriormente.

La composición farmacéutica que comprende la molécula se formula según la práctica farmacéutica habitual (Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York) conocida por un experto en la técnica.

Para la administración oral, la composición puede formularse en formas galénicas orales convencionales tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos y preparados líquidos tales como jarabes, elixires y gotas concentradas. Se pueden usar vehículos o diluyentes sólidos atóxicos que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato y similares. Para comprimidos, también son necesarios los aglutinantes, que son agentes que dan cualidades cohesivas a los materiales en polvo. Por ejemplo, se pueden usar como aglutinantes almidón, gelatina, azúcares como lactosa o dextrosa, y gomas naturales o sintéticas. Los disgregadores también son necesarios en los disgregadores para facilitar la ruptura del comprimido. Los disgregadores incluyen almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas y polímeros reticulados. Además, también se incluyen lubricantes y fluidificantes en los comprimidos para evitar la adhesión al material del comprimido a las superficies en el proceso de preparación y para mejorar las características de fluidez del material en polvo durante la preparación. El dióxido de silicio coloidal se usa más frecuentemente como fluidificante y los compuestos como el talco o los ácidos esteáricos se usan más frecuentemente como lubricantes.

Para la administración transdérmica, la composición puede formularse en forma de pomada, crema o gel y pueden usarse penetrantes o detergentes apropiados para facilitar la penetración, como dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y dimetilformamida.

Para la administración a través de las mucosas, se pueden usar aerosoles nasales, supositorios rectales o vaginales. El compuesto activo puede incorporarse en cualquiera de las bases de supositorio conocidas mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichas bases incluyen manteca de cacao, polietilenglicoles (carboceras), monoestearato de polietileno sorbitán y mezclas de estos con otros materiales compatibles para modificar el punto de fusión o la velocidad de disolución.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse para liberar el fármaco activo sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier momento predeterminado o período de tiempo después de la administración.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden comprender una o más moléculas de la presente invención asociadas con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Estos excipientes y/o vehículos se eligen según la forma de administración descrita anteriormente.

En una realización concreta, la composición farmacéutica según la invención comprende 0,001 mg a 10 g de la molécula de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica según la invención comprende 0,01 mg a 1 g de la molécula de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización metabólica de los ratones *Alms^{foz/foz}*.

(A) Peso corporal medio de ratones macho WT y *Alms^{foz/foz}* (n = 6-8 ratones por genotipo). (B) Fotografía de tejido adiposo visceral de WT y *Alms^{foz/foz}*. Barra de escala: 25 μ M. (C) Prueba de tolerancia a la insulina (P.T.I.) realizada en ratones WT y *Alms^{foz/foz}* y el histograma correspondiente que muestra el área bajo la curva (A.B.C.) para cada

genotipo (n = 6-8 ratones por grupo, p <0,001). (D) Peso corporal medio de ratones macho WT y *Alms^{foz/foz}* (n = 6-8 ratones por genotipo). (E) Fotografía del tejido adiposo visceral de los correspondientes WT y *Alms^{foz/foz}*. Barra de escala: 25 μ M. (F) Prueba de tolerancia a la insulina realizada en ratones WT y *Alms^{foz/foz}* y el histograma correspondiente que muestra el A.B.C. para cada genotipo (n = 6-8 ratones por grupo). *** representa el valor p <0,001. (G) Inmunotransferencias para las proteínas indicadas en tejidos sensibles a la insulina de ratones WT y *Alms^{foz/foz}* no obesos. (H) Resultados de recuentos radiactivos en diferentes tejidos diana después de la inyección de desoxiglucosa radiactiva en ratones WT y *Alms^{foz/foz}* (n = 5 ratones por genotipo). * representa el valor p = 0,05.

Figura 2. Efecto asintomático de ALMS1 en adipocitos maduros humanos

(A) Fotografías que muestran la falta de absorción de 2-NBDG (verde) en adipocitos de referencia (shCTRL shARN) o privados de ALMS1 (*ALMS1* shARN) adipocitos maduros asintomáticos en ausencia de INS. (B) Fotografías que representan la falta de absorción de 2-NBDG en shARN *ALMS1* en comparación con CTRLshARN. Los núcleos se tiñeron por contraste con DAPI, DIC: Imágenes de contraste por interferencia diferencial. (C) Imágenes 3D de adipocitos maduros con CTRLshARN o *ALMS1*shARN teñidos para triglicéridos intracelulares (TG), membrana plasmática (MP) en rojo y núcleos en azul (DAPI). (D) Mediciones de los niveles de fluorescencia que se correlacionan con las cantidades de triglicéridos TG intracelulares en adipocitos maduros (n = 16 pocillos por condición medida) * valor p = 0,05. (E-F) Inmunodetección de AKT y pS473-AKT en adipocitos maduros tratados con CTRLshARN y *ALMS1* shARN en presencia y ausencia de INS. (G) Imágenes en 3D de adipocitos maduros con CTRLshARN y *ALMS1*shARN que muestran la localización celular del receptor de insulina (RI en rojo) y GLUT4 (en verde) en ausencia de Ins. Imágenes con vista en corte que muestran la dinámica de la localización GLUT4 en ausencia de Ins. (H), después de 30 min. de estimulación de INS. (I) y con 30 min de estimulación de INS. seguida de 2 horas de ausencia de INS. (J) en adipocitos maduros con CTRLshARN y *ALMS1*shARN. Barras de escala: 25 μ m en A, B, C y 5 μ m en G-J.

Figura 3. Puntos de interacción previstos en la proteína ALMS1 y modelado de su compañera TBC1D4. (A) Estructura 3D prevista de la proteína ALMS1 con hélices y bucles. (B) Estructura 3D prevista de la proteína ALMS1 con los puntos interactivos potenciales representados por puntos rojos. (C) Secuencia primaria de la proteína TBC1D4 con la localización indicada de los puntos de unión o dominios que interactúan. (D) Estructura 3D predicha de la proteína TBC1D4.

Figura 4. Se requiere ALMS1 para el tráfico celular de TBC1D4

(A) Estructura 3D prevista por simulación informática que muestra la interacción espacial entre ALMS1 y TBC1D4 con una vista ampliada del punto de interacción que resalta los restos de aminoácidos interactivos predichos (L66, Y61 y S2879) de la proteína ALMS1. (B) Imagen 3D de adipocitos maduros inmunoteñidos que representan la colocalización de TBC1D4 (verde) y ALMS1 (rojo). Los núcleos se tiñeron por contraste con DAPI (azul). (C-D) Inmunotransferencias para las proteínas indicadas en los lisados celulares (50 μ g de proteína cargada por carril) para los adipocitos maduros con CTRLshARN y *ALMS1*shARN tratados con o sin insulina. Imágenes 3D de experimentos de inmunofluorescencia realizados en adipocitos maduros con CTRLshARN o *ALMS1*shARN o TBC1D4shARN que representan la localización celular de GLUT4 en ausencia de insulina (-INS) (E) o en presencia de INS. (F). MP: membrana plasmática y núcleos contrastados con DAPI. Imágenes 3D de experimentos de inmunofluorescencia realizados en adipocitos con CTRLshARN o *ALMS1*shARN que muestran la localización celular de GLUT4 (verde) y TBC1D4 en ausencia de INS (G) o cuando se tratan 30 min. con el INS. (H). Barras de escala: 10 μ m.

Figura 5. TBC1D4 no es el único compañero de ALMS1 que interactúa que desempeña un papel en la biología de los adipocitos

(A-C) Fotografías que muestran la absorción de 2-NBDG en adipocitos privados de CTRLshARN o *ALMS1*shARN o TBC1D4shARN después de 30 min estimulación con Ins. (D-F) Imágenes en 3D obtenidas utilizando adipocitos maduros fijados no permeabilizados estimulados con INS. después de la inmunodetección de GLUT4 unida a la membrana (verde). La membrana plasmática (MP) se tiñó con Image-iT (rojo) y los núcleos se tiñeron por contraste con DAPI. (G) Inmunotransferencias de 2 subunidades de bombas de protones (ATP6V0D1 y ATP6V1A) identificadas por espectrometría de masas en los experimentos de IP que utilizan ALMS1 como cebo (Fig. S4), α PKC, GLUT4 y β -Tubulina en extractos celulares de tejido adiposo blanco (TAB) y riñón. 50 μ g de proteína completa cargada por carril. (H) Fotografía de la señal positiva de Duolink detectada en adipocitos utilizando anticuerpos contra ALMS1 y ATP6. (I) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran localizaciones celulares de ATP6V0D1 y ALMS1 y se fusionadas en adipocitos maduros tras la estimulación con INS. (J) La simulación informática predijo los puntos de unión de TBC1D4 (rojo) y PKC (amarillo) que están a solo 20 Angstroms de distancia entre sí en la estructura 3D de ALMS1. (K-L) Inmunodetecciones de α PKC, TBC1D4 y α -actinina en inmunoprecipitados utilizando ALMS1 como cebo en adipocitos cultivados en ausencia o presencia de INS.

Figura 6. La restauración de la acidificación en los adipocitos privados de ALMS1 restablece la absorción de glucosa

(A-B) Se realizaron imágenes de transcurso de tiempo en adipocitos teñidos con acridina naranja de referencia o privados de ALMS1 estimulados con INS. (C-D) Las imágenes de transcurso de tiempo se realizaron en adipocitos

teñidos con acridina naranja de referencia o privados de ALMS1 estimulados con un ionóforo de intercambio K^+/H^+ electroneutro, nigericina (NIG.). (E) De arriba a abajo: Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de adipocitos de referencia estimulados sin Ins. o con INS. o con NIG. Las flechas blancas muestran vesículas hinchadas. (F) Imágenes de microscopía electrónica transmitida (TEM) correspondientes mostradas en (E) que muestran la fusión de vesículas con la membrana plasmática en presencia de INS. y NIG. (G) De arriba a abajo: Imágenes de SEM de adipocitos privados de ALMS1 estimulados sin INS o con INS. o con NIG. (H) Las imágenes de TEM correspondientes se muestran en (G) que muestran la fusión de las vesículas con la membrana plasmática solo en presencia de NIG. (I) Fotografías que muestran el contenido intracelular de 2-NBDG (verde) en los adipocitos maduros de referencia, en ausencia de INS. (recuadro superior) o después de 30 minutos de estimulación con INS. (recuadro del medio) o después de 30 min. de estimulación con NIG. (recuadro inferior). (J) Fotografías que muestran el contenido intracelular de 2-NBDG (verde) en adipocitos maduros privados de ALMS1, en ausencia de INS. (recuadro superior) o después de 30 minutos de estimulación con INS. (recuadro del medio) o después de 30 min. de estimulación con NIG. (recuadro inferior). Barras de escala: 20 μm excepto para F y H: 500 nm.

Figura 7. El tráfico de GLUT4 requiere un complejo de proteínas *ALMSome*

(A) Imágenes 3D obtenidas utilizando adipocitos maduros fijados no permeabilizados estimulados con NIG. después de inmunodetección de GLUT4 unida a la membrana (verde). La membrana plasmática (MP) se tiñó con Image-iT (rojo) y los núcleos se tiñeron por contraste con DAPI. (B) Fotografías que muestran contenido de TG intracelular 24 hr. después de tratamiento con NIG. (C) Representación esquemática de la localización celular de ALMS1 y la proteína asociada en ausencia de estimulación con INS. en adipocitos maduros. (D) Representación esquemática de la dinámica de ALMS1 y las proteínas asociadas después de la estimulación con INS. en adipocitos maduros.

Figura 8. La absorción de glucosa se activa en ausencia de INS por interferencia específica del punto de unión a αPKC en el *ALMSome*

(A) Fotografías que muestran la absorción de 2-NBDG en presencia o ausencia de INS en adipocitos infectados con partículas lentivíricas CTRL o dominios αPKC que llevan partículas lentivíricas. (B) Cuantificación del análogo 2-NB de glucosa intracelular en presencia o ausencia de INS en adipocitos infectados con partículas lentivíricas CTRL o dominios αPKC que llevan partículas lentivíricas. (n = 8 por grupo).

Figura 9. Caracterización del montaje min- αPKC -FLAG en adipocitos

Recuadro superior: Inmunodetección de min- αPKC -FLAG utilizando un anticuerpo anti-FLAG en adipocitos maduros 48 horas después de la infección lentivírica. 2º y 3º recuadros: Imagen en 3D del adipocito que muestra la localización perinuclear de min- αPKC -FLAG. Último recuadro: Representación esquemática de los enfoques métodos utilizados para evaluar el efecto de min- αPKC -FLAG en la absorción de glucosa.

Ejemplos

El síndrome de Alström (ALMS) es un raro trastorno autosómico recesivo caracterizado por varias características clínicas que incluyen obesidad y diabetes de aparición precoz. Se origina debido a mutaciones en el gen *ALMS1* que codifica una proteína de 460 kDa.

La función del gen *ALMS1* y cómo causa el fenotipo del síndrome de Alström ha sido desconocida hasta ahora, y los estudios sobre su función se ven obstaculizados por el tamaño extremadamente grande de la proteína codificada y sus bajos niveles de expresión.

El síndrome de Alström (ALMS) es un síndrome de obesidad infantil monogénica poco común para el cual existe un solo gen causante mutado identificado hasta la fecha, el gen *ALMS1*. ALMS está clasificado como un miembro de los trastornos de la ciliopatía que incluye el síndrome de Bardet Biedl, un grupo de trastornos sindrómicos que se originan a partir de mutaciones en la gran cantidad de proteínas diferentes que juntas juegan un papel crítico en la función ciliar primaria. *Alms1* codifica la proteína *ALMS1* de 461 kDa que originalmente se describió por llevar una localización puramente centriolar, aunque datos más recientes también han sugerido una localización citoplásmica de *ALMS1*.

ALMS se identifica clínicamente por un fenotipo multisistémico colectivo que se piensa que refleja la expresión ubicua del tejido de *ALMS1*, imitando aproximadamente muchas de las características fenotípicas de BBS. Las características clínicas comunes de ALMS incluyen la degeneración de la retina, la pérdida de audición, la obesidad infantil, la diabetes mellitus tipo 2 de inicio precoz (T2DM), la miocardiopatía dilatada, la disfunción renal y hepática, el hipotiroidismo, la baja estatura, la hiperlipidemia y la fibrosis de órganos. Los niños con ALMS desarrollan obesidad en la primera infancia que se asocia con el inicio precoz de T2DM alrededor de los 16 años de edad, con una prevalencia general mucho mayor de T2DM de inicio precoz en ALMS que la vista con otros síndromes de obesidad infantil que dan como resultado un índice de masa corporal similar (IMC) incluido BBS. La razón para esta predilección por T2DM en niños con ALMS que es desproporcionada para su grado de obesidad sigue siendo inalcanzable.

Los inventores investigaron el papel de la proteína ALMS1 durante el proceso de diferenciación adipogénica y encontraron que los niveles de expresión de la proteína ALMS1 aumentaron durante la adipogénica. La supresión de ALMS1, en células madre mesenquimatosas diferenciadoras adipógenas, inhibió las cascadas antiadipógenas, pero sorprendentemente no favoreció la adipogénica.

- 5 Además, los inventores demostraron que el complejo proteico ALMS1 también se requiere en adipocitos maduros para una retención eficiente de GLUT4 en su compartimento sensible a la insulina y su capacidad para fusionarse con la membrana plasmática en respuesta a la estimulación con insulina. La inactivación de ALMS1 disminuyó la cantidad de glucosa capaz de ser absorbida por los adipocitos maduros tras la estimulación de la insulina, contribuyendo así a la hiperglucemia y al inicio de la diabetes.
- 10 Estudios previos en el mutante espontáneo *Alms^{foz/foz}* y los modelos de ALMS murinos transgénicos genéticamente atrapados de *Alms1* confirmaron que estos ratones, al igual que los niños humanos afectados, desarrollan obesidad en la adolescencia temprana debido a la hiperfagia, y también presentan tolerancia a la glucosa alterada, hiperinsulinemia e hipertrofia de islotes, coherente con una resistencia grave a la insulina, aunque el origen del tejido o el mecanismo para esta resistencia a la insulina no ha sido previamente caracterizado. Estudios previamente
- 15 publicados de estudios *in vitro* en la estirpe celular de fibroblastos 3T3-L1 murinos demostraron que la inhibición de la expresión del gen ALMS1 dio como resultado un deterioro leve de la adipogénica, pero se señaló que no tenía ningún efecto sobre la vía de señalización de la insulina en los adipocitos maduros resultantes, medida por la fosforilación de AKT mediada por la insulina. Estos datos llevan directamente lejos de la invención presentada en la presente memoria que *Alms1* de hecho desempeña un papel crítico no reconocido hasta ahora en la ruta de
- 20 señalización de insulina y en el transporte de glucosa mediado por GLUT4.

- De hecho, a pesar de los datos contrarios publicados anteriormente, los inventores, al estudiar cuidadosamente el fenotipo del modelo ALMS murino de Fat Aussie (*Alms1^{foz/foz}*), identificaron que la resistencia a la insulina en este modelo precedió más que siguió el desarrollo de la obesidad. Además, identificaron el tejido adiposo como la zona específica que impulsa la resistencia a la insulina y el posterior desarrollo de intolerancia a la glucosa y T2DM en
- 25 ALMS. Confirmaron que la señalización de insulina en adipocitos *Alms1^{foz/foz}* estuvo intacta a lo largo de la bajada a la fosforilación de TBC1D4, el último miembro conocido de la vía de absorción de glucosa mediada por insulina, pero luego, mediante una serie de investigaciones posteriores, identificaron un complejo de proteínas denominado *Almsome*, compuesto de varias proteínas clave que se asocian con ALMS1 y que juntos son necesarios para el anclaje y la fusión de las vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática de adipocitos (MP) en respuesta a la
- 30 señalización de la insulina. Por lo tanto, *Almsome* representa el último paso hasta ahora no identificado en la absorción de glucosa mediada por la insulina en los adipocitos, con resistencia a la insulina en ALMS debido a la interrupción de la función de *Almsome* que conduce al fracaso de la fusión de la membrana de GLUT4 y, por lo tanto, a un bloqueo para el transporte de glucosa de los adipocitos.

Ejemplo 1

- 35 Los ratones *Alms1^{foz/foz}* presentan una resistencia severa específica a la insulina en el tejido adiposo incluso en ausencia de obesidad

Cría de animales

- Los ratones *Alms1^{foz/foz}* y las crías de la misma camada *Alms1^{+/+}* (WT) se mantuvieron en un ambiente C57BL/6J en la instalación animal en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones tuvieron acceso libre y a discreción al
- 40 agua y una comida normal que contenía un 5,4% de grasa, un contenido energético de 12 MJ/kg (gránulos de mantenimiento de ratas y ratones de Gordon, piensos de la especialidad de Gordon, Australia) o una dieta alta en grasas (HFD) con un 23% de grasa, alta en carbohidratos simples, 0,19% de colesterol, contenido energético 20 MJ/kg (SF03-020, Speciality feeds, Australia). Se utilizaron cebadores que flanquean la mutación *foz* para genotipado por PCR: directo ACA ACT TTT CAT GGC TCC AGT (SEC ID. n° 13); inverso TTG GCT CAG AGA CAG
- 45 TTG AAA (SEC ID. N° 14).

- Se usaron ratones *Alms1^{foz/foz}* obesos de seis meses de edad y jóvenes (<60 días de edad) no obesos y ratones de la misma camada salvajes (WT) para investigar qué deterioro metabólico primario hace que los ratones *Alms1^{foz/foz}* desarrollen T2DM. Los ratones *Alms1^{foz/foz}* de seis meses de edad eran obesos con un peso corporal medio de 45,5 g ± 1,7 g en comparación con 26,4 g ± 1,3 g para los ratones de la misma camada WT (Fig. 1A) y, como se mostró anteriormente, tenían hiperglucemia en ayunas y tolerancia a la glucosa alterada con puntuaciones HOMA elevadas. Una prueba de tolerancia a la insulina (PTI) demostró que, a diferencia de los WT (Fig. 1B) y los ratones de la misma camada heterocigotos, la glucemia en ratones *Alms1^{foz/foz}* obesos no responde a la administración de insulina (Fig. 1B), incluso cuando se administraron dosis de insulina tan altas como 20 U/kg. (Fig. 1C). Obesidad de los ratones *Alms1^{foz/foz}* debida a hipertrofia grave de los adipocitos (Fig. 1B) en lugar de a la
- 50 hiperplasia de los adipocitos normalmente más observada en los ratones obesos con BBS. Para determinar lo que el defecto primario era que estaba causando la intolerancia a la glucosa en ratones *ALMS1^{foz/foz}*, se estudiaron ratones *ALMS1^{foz/foz}* jóvenes delgados para eliminar el efecto de confusión de la obesidad en el grado de respuesta a la insulina. A los 2 meses de edad, los machos WT y *Alms1^{foz/foz}* tenían un peso corporal promedio similar de ~ 24 g (Fig. 1D). La PTI en estos ratones demostró que, sin embargo, los machos *Alms1^{foz/foz}* jóvenes no obesos ya
- 55

mostraban una respuesta a la insulina significativamente reducida (Fig. 1E), coherente con la resistencia a la insulina que precede a la obesidad en este modelo. La inmunodetección de IRAP, Akt, p-AKT, GLUT4, C/EBP- α y GAPDH realizada en tejidos sensibles a la insulina, a saber, el corazón, el hígado, músculos esqueléticos y tejido adiposo blanco (TAB) de ratones *Alms1^{foz/foz}* de 6 meses de edad no ayunados y WT no mostraron diferencias importantes en las concentraciones de proteína excepto por un aumento constante en la relación p-AKT a AKT total en TAB, coherente con un aumento paradójico en lugar de una reducción en la activación de los miembros anteriores de la ruta de señalización de la insulina en ratones *Alms1^{foz/foz}* intolerantes a la glucosa (Fig. 1G). Para identificar qué tejidos solos o juntos pueden ser la fuente principal de la resistencia a la insulina observada en ratones *Alms1^{foz/foz}*, se comparó la distribución tisular de la absorción de desoxiglucosa (DOG) mediada por insulina en ratones WT y *Alms1^{foz/foz}*. Esto confirmó que la absorción de DOG gravemente dañada se limitaba al TAB de ratones *Alms1^{foz/foz}* con un aumento compensatorio en la absorción de DOG en los músculos gemelos y sóleo sensibles a la insulina en comparación con los ratones WT.

Estos estudios demuestran que aunque los ratones *Alms1^{foz/foz}* se vuelven obesos y desarrollan T2DM progresiva con la edad, el principal defecto inicial que contribuye a la resistencia a la insulina y la hiperglucemia es un fallo en la ausencia si ALMS1 funcional de la absorción de glucosa en el tejido adiposo en respuesta a la señalización de la insulina, precediendo este defecto al desarrollo de la obesidad.

Ejemplo 2

La ausencia de síntomas de *Alms1* en adipocitos humanos bloquea la absorción de glucosa mediante la clasificación celular de GLUT4 alterada

Materiales. De Molecular Probes, Invitrogen: Naranja de acridina, Image-iT® LIVE Plasma Membrane y equipo de marcaje de tinción nuclear, 2-NBDG (2-(N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-il) amino) -2-desoxiglucosa), Hoechst 33258 y Cell Light™ Early Endosomes-RFP* BacMam 2.0*; n° en catálogo: A3568, I34406, N13195, H3569 y C10587. De Lonza: reactivo analítico AdipoRed™ (número en catálogo: PT-7009). Partículas lentivíricas de Santa Cruz Biotechnology, INC.: ALMS1 shRNA (h) Partículas lentivíricas, TBC1D4 shRNA (h) Partículas lentivíricas y Partículas lentivíricas-A shRNA de referencia; n° en catálogo: sc-72345-V, sc-61654-V y sc-108080 respectivamente. De Tocris Biosciences: sal sódica de Nigericina (n° en catálogo: 4312).

Pruebas bioquímicas. Se examinó la resistencia a la insulina en ratones mediante la prueba de tolerancia a la insulina (PTI) y la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIP). Para la PTI, los ratones se mantuvieron 4 horas en ayunas sin acceso a los alimentos, pero libre acceso al agua. Se pesaron los ratones y se inyectó ip insulina (Humulin R, Eli Lilly, EE. UU.) a razón de 0,75 U/kg de peso corporal en solución salina al 0,9% para inyección (Pfizer, EE. UU.). Se extrajo sangre de la cola y se determinó la glucosa en el plasma para cada ratón con un glucómetro (Optium Xceed, Abbott, EE. UU.) y tiras reactivas de glucosa en sangre (punto de atención de Optium, Abbott, EE. UU.) a los 0, 15, 30 y 60 min después de la inyección de insulina. Para la PTGIP, los ratones se mantuvieron 18 horas en ayunas y se les inyectaron a razón de 2 mg/g de peso corporal de D-glucosa (Analar, VWR, EE. UU.) en solución salina al 0,9% para inyectables. Se determinó la glucosa plasmática para cada ratón usando un glucómetro con muestreo por la vena de la cola a 0, 15, 30, 60 y 120 min después de la inyección de glucosa. Para la medición de la insulina en el plasma, se extrajo sangre en animales conscientes mediante sangrado de las mejillas. Después de la extracción, las muestras de sangre se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a 17.000 g, 10 min a 4°C. Se analizaron las concentraciones de insulina utilizando un equipo ELISA ultrasensible comercial para insulina de ratón (Crystal Chem Inc., EE. UU.). La evaluación del modelo de homeostasis de índice de resistencia a la insulina (HOMA-RI) se calculó utilizando la insulina en ayunas de cada ratón y las concentraciones de glucosa en ayunas. Se utilizó la fórmula siguiente: $HOMA - RI = [glucosa \text{ en ayunas (mg/dl)} \times insulina \text{ en ayunas (\mu U/ml)}] / 405$.

Cultivo celular. Se adquirieron preadipocitos viscerales blancos humanos (n° en catálogo: C-12732; PromoCell) y células madre mesenquimatosas humanas (n° en catálogo: C-12974; PromoCell) procedentes de médula ósea sana. Los preadipocitos se sembraron según el protocolo del fabricante y se cultivaron en medio de crecimiento de preadipocitos (n° en catálogo: C-27410; PromoCell) hasta confluencia. Un día antes de inducir adipogénesis terminal, las células se infectaron con partículas lentivíricas específicas que consisten en un conjunto de 3 montajes específicos para las dianas shARNs adquiridos en Santa Cruz Biotechnology y al día siguiente, se indujo diferenciación adipogénica cambiando el medio por el medio de diferenciación de preadipocitos. (n° en catálogo: C-27436; PromoCell) durante 2 días. Después de la fase de diferenciación, el medio finalmente se cambió por el medio Adipocyte Nutrition (n° en catálogo: C-27438; PromoCell). Para el cultivo sin insulina, Adipocyte Basal Medium (n° en catálogo: C-2431; PromoCell) sin insulina se enriqueció con 5 g/l de desoxiglucosa, 8 μ g/ml de d-Biotina, 400 ng/ml de Dexametasona. Para las hMSC, se cultivaron en medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (n° en catálogo: C-28010; PromoCell) hasta confluencia. Las hMSC se transfectaron con ARNs específicos como se describió anteriormente y al día siguiente se indujo la diferenciación adipogénica cambiando el medio por el Medio de diferenciación adipogénico MSC (n° en catálogo: C28011; Promocell).

Extracción de ARN, síntesis de ADNc, q-PCR y Taqman. Se preparó ARN total a partir de diferentes tejidos y células utilizando un equipo RiboPure™ (n° en catálogo: AM1924; Ambion), seguido de un tratamiento con ADNasa con TURBO DNA-Free™ (n° en catálogo: AM1907; Ambion). La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel y

la concentración de ARN por Eppendorf Biophotometer Plus con la Hellma® Tray Cell (nº en catálogo: 105.810-uvs; Hellma). La transcripción inversa de 1 µg de ARN completo a cDNA se realizó con el kit de síntesis de cDNA BioRad iScript™ (nº en catálogo: 170-8891; BioRad). La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real se realizó en un sistema en tiempo real CFX96™ de BioRad utilizando el iQ™ SYBR® Green Supermix (nº en catálogo: 170-8886; BioRad) y conjuntos de cebadores optimizados para dianas probadas para PCR en tiempo real basada en SYBR® Green para la PCR en tiempo real. El análisis Taqman se llevó a cabo con el ensayo genético específico con la Fast Advanced Master Mix de Taqman® (nº en catálogo: 4444557; Applied Biosystems). La expresión de pliegues normalizada del gen diana se calculó utilizando el método del umbral del ciclo (C_t) comparativo al normalizar C_t del ARNm diana para los de GAPDH que utilizan el CFX Manager Software versión 1.5 y se verificó con el programa Lin-Reg.

Inmunotransferencias Western y microscopia de inmunofluorescencia. Se anestesiaron ratones *Alms1^{foz/foz}* y ratones de la misma camada WT. Se recogieron los siguientes tejidos sensibles a la insulina: hígado, corazón, músculo y tejido adiposo y se colocaron directamente en amortiguador RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, Triton-X100 al 1%) enriquecido con mezcla Completa inhibidora de mini proteasa y mezcla PhosSTOP inhibidora de fosfatasa (Roche, Suiza). Las muestras se sometieron a ultrasonidos y se centrifugaron durante 30 minutos a 17.000 g, a 4°C durante 30 minutos. Concentración de proteínas analizada con análisis BCA (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las proteínas celulares de las células se obtuvieron por precipitación con ácido tricloroacético y se realizaron análisis de inmunotransferencia utilizando 30-50 µg de proteína completa. La unión específica de anticuerpos se visualizó utilizando el Sustrato de Sensibilidad Máxima West Femto de SuperSignal® (nº en catálogo: Lf145954, Pierce) en un Versadoc™ Imaging System de BioRad o un generador de imágenes ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Reino Unido). Como controles de carga se utilizaron proteínas no específicas teñidas con Ponceau S para normalizar la señal obtenida después de la inmunodetección específica de la proteína de interés utilizando el programa Bio-Rad Quantity One. Para experimentos de inmunofluorescencia, las células se sembraron en permanox de 8 pocillos Lab-Tek II Chamber Slide (nº en catálogo: 177445; NUNC). Las células se trataron como se indica. Luego se procesaron tanto las células como las criosecciones de tejidos para la detección de proteínas después de la fijación con metanol y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1%. Se montaron portaobjetos de microscopia para detección con medio de montaje Vectashield (nº en catálogo: H-1200; Vector Laboratories). Para ver las proteínas asociadas a la membrana, las células se fijaron con formalina durante 15 minutos y se bloquearon directamente. seguido de inmunotinción y adquisición utilizando un microscopio vertical AxioImager Z2 de Zeiss. El análisis de diagnóstico por la imagen, los experimentos de reconstitución en 3D y de transcurso de tiempo y los experimentos de seguimiento de endosomas se realizaron utilizando el programa AxioVision de Zeiss con los módulos 3D y Tracking Zeiss correspondientes o la plataforma de diagnóstico por la imagen Zeiss Zen 2012.

Medición de fluorescencia. Los preadipocitos se cultivaron en una placa de 96 pocillos y 12 pocillos infectados con partículas lentivíricas de shARN ALMS1 o partículas lentivíricas de shARN CTRL y se diferenciaron al día siguiente en adipocitos maduros. Tres semanas después, los triglicéridos intracelulares se tiñeron con tinción AdipoRed siguiendo el procedimiento del fabricante y se midió la fluorescencia en un monocromador Tecan Infinite 200 quad4 (Tecan, Lyon, Francia) a una longitud de onda de 520 nm. Los datos generados se analizaron a continuación utilizando el programa informático de análisis de datos Magellan de Tecan utilizando como blanco adipocitos sin teñir.

Experimentos de coimmunoprecipitación. Para los experimentos de coimmunoprecipitación, los inventores utilizaron el kit de Acoplamiento de Anticuerpos Dynabeads® (nº en catálogo: 143.11D, Invitrogen) en combinación con el kit de co-inmunoprecipitación Dynabeads® (nº en catálogo: 143.21D, Invitrogen). Los hMSC se cultivaron hasta confluencia y se desencadenó la diferenciación adipogénica por cambio de medio. 7 días después se inició la diferenciación adipogénica por cambio de medio, los adipocitos, cultivados con nuestro sin Ins. 24 horas antes de la lisis, se lisaron en condiciones naturales y se usaron según el kit. Después de la inmunoprecipitación y la liberación de las perlas, las muestras se cargaron en un gel NuPage TrisAcetate al 3-8% (nº en catálogo: EA0375BOX, Invitrogen) con un patrón de proteínas HMW teñido previamente Hi Mark™ (nº en catálogo: LC5699, Invitrogen).

Preparación e identificación de proteínas por espectrometría de masas. En la digestión en gel: El procedimiento de digestión en gel se llevó a cabo según lo descrito por Rabilloud *et al.* (ref.). La preparación de las piezas de gel antes de la digestión con tripsina se realizó con un robot de manipulador de líquidos (QuadZ215, Gilson International, Francia). Resumiendo, las bandas de gel se lavaron alternativamente con 100 µl de NH_4HCO_3 25 mM y a continuación 100 µl de acetonitrilo (ACN) al 50% (3 min de lavado con agitación y el líquido se desechó antes de la adición del siguiente disolvente). Este ciclo de hidratación/deshidratación se repitió dos veces y se secaron las piezas de gel durante 20 min antes de la reducción (DTT 10 mM/amortiguador NH_4HCO_3 25 mM a 56°C durante 45 min) y alquilación (yodoacetamida 25 mM /amortiguador NH_4HCO_3 25 mM durante 45 min, temperatura ambiente). Después, los puntos de gel se lavaron de nuevo con 3 ciclos de NH_4HCO_3 25 mM/ACN alternativamente. Después de la etapa de secado de 20 min, las piezas de gel se rehidrataron con tres volúmenes de tripsina (Promega, V5111), 12,5 ng/µl en amortiguador NH_4HCO_3 25 mM (recién diluido) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Los péptidos tripticos se extrajeron del gel con agitación vigorosa durante 30 minutos en un volumen adaptado de 35% de H_2O /60% de ACN/5% de HCOOH y una etapa de exposición a ultrasonidos de 15 minutos.

Espectrometría de masas MALDI-TOF (/ TOF) y búsqueda en bases de datos. La medición de masas MALDI se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización asistida por matriz Autoflex III Smartbeam (MALDI-TOF TOF) (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) utilizado en el modo positivo de reflector. Se usó un objetivo de anclaje predefinido (sistema PAC de Bruker Daltonik, nota técnica TN011) con matriz de HCCA para analizar los productos tripticos de la digestión. Los datos resultantes de la huella digital de la masa de péptidos (PMF) y los datos de la huella del fragmento de péptido (PFF) se combinaron mediante el programa informático Biotoools 3.2 (Bruker Daltonik) y se transfirieron a una versión de intranet del buscador MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Se tuvieron en cuenta las modificaciones variables (acetilación de la proteína en el terminal N, oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteína) y una escisión triptica perdida y el error en la masa del péptido se limitó a 50 ppm. Las proteínas se identificaron buscando datos en una base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI y luego se enviaron a la base de datos restringida a seres humanos. En todos los resultados, las puntuaciones de probabilidad fueron mayores que la puntuación fijada como significativa con un valor de p de 0,05. *Espectrometría de masas NanoLC-MSMS y búsqueda en la base de datos:* Para el análisis nanoLC-MS/MS, los péptidos se transfirieron en inserciones de vidrio, compatibles con el sistema automuestreador automático LC (nanoLC-U3000, Dionex, EE. UU.). El sistema LC se acopló a un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF (MicroTOFQ-II, Bruker, Alemania). El método consistió en una fase de 60 minutos a un caudal de 300 nl/min utilizando un gradiente de dos disolventes: A (99,9% de agua: 0,1% de ácido fórmico) y B (99,92% de acetonitrilo: 0,08% de ácido fórmico). El sistema incluye: un PepMap C18 de 300 µm x 5 mm utilizado para la concentración previa de péptidos y una columna C18 de 75 µm x 150 mm utilizada para la elución de péptidos. El analizador TOF se calibró cada día: los datos se consiguieron y procesaron automáticamente utilizando los programas informáticos Hystar 2.8 y DataAnalysis 2.6. Se realizaron búsquedas consecutivas contra la base de datos NCBI en primer lugar y luego contra la sub-base de datos humana para cada muestra utilizando versiones locales de Mascot 2.2 (MatrixScience, Reino Unido) y Proteinscape 2.0 (Bruker, Alemania). Se estimó la tasa de falsos positivos (TFP) para la identificación de proteínas utilizando una base de datos de señuelo inverso: la validación de proteínas se realizó utilizando un TFP inferior al 1%. Además, las proteínas identificadas por solo 1 péptido se verificaron manualmente: los espectros de MS/MS se inspeccionaron según las reglas de fragmentación convencionales.

Prueba de ligadura de proximidad in situ (PLP). El equipo de PLP *in situ* Duolink con la sonda PLUS anti-ratón y la sonda MINUS anti-conejo (números de catálogo: 90701 y 90602; OLINK Bioscience) se usaron en combinación con los anticuerpos primarios apropiados según el procedimiento del fabricante. Los preadipocitos primarios humanos y los adipocitos maduros se cultivaron en un portaobjetos con cámara Lab-Tek II de 8 pocillos (Nunc) y se trataron como para microscopía de inmunofluorescencia hasta la etapa primaria de incubación de anticuerpos. Después del lavado, las células se decoraron con sondas PLP PLUS y MINUS (dilución 1:20) durante 2 horas a 37°C. La hibridación y la ligadura de las sondas, la amplificación y el lavado final con SSC se realizaron según el procedimiento del fabricante. La transferencia de fluorescencia basada en la interacción proteína-proteína se visualizó utilizando el equipo 613 de detección Duolink (OLINK Bioscience) y se obtuvieron imágenes.

Estadística. se realizaron análisis estadísticos con el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EE. UU.). Los resultados se muestran como medias $\pm$ desviación típica. La significación de los resultados se determinó mediante pruebas de la t para datos emparejados o la prueba de U no paramétrica de Mann-Whitney se utilizó para la comparación estadística de los datos de IMC y ABC. Se consideró que un valor de P <0,05 indica significación estadística y se marcó con un asterisco.

Usando preadipocitos humanos primarios como modelo *in vitro*, los inventores localizaron ALMS1 principalmente en un citoplásmico en lugar de la agrupación centrosómica descrita previamente. ALMS1 fue asintomático durante la adipogénia y aunque se observó una disminución significativa en el factor antiadipógeno Pref-1, no se pudieron detectar diferencias importantes en los niveles de expresión de los factores de transcripción pro-adipógenos como los cEBP y PPAR γ .

Tras la carencia de síntomas de ALMS1 en adipocitos maduros de 2 semanas, se evaluó la capacidad de absorción de glucosa utilizando un análogo de glucosa marcado (2-NBDG). En ausencia de estimulación con insulina, no se pudo detectar la absorción de 2-NBDG en adipocitos maduros de referencia con ALMS1 (Fig. 2A). Por otra parte, la estimulación con insulina produjo una mayor absorción de 2-NBDG en los adipocitos maduros humanos de referencia (Fig. 2B, recuadro superior) pero no en células carentes de síntomas con ALMS1 (Fig. 2B, recuadro inferior). Además de la absorción de glucosa reducida en adipocitos carentes de síntomas de ALMS1, los inventores observaron una reducción en los triglicéridos (TG) intracelulares en estas células una semana después (Fig. 2C-D). A destacar que esta reducción en la absorción de glucosa en adipocitos carentes en ALMS1 no estaba relacionada con una disminución de la fosforilación de AKT, la diana de señalización de la insulina aguas arriba, ya que las concentraciones de pS473-AKT después de 30 minutos de incubación con insulina eran similares tanto en adipocitos humanos de referencia como carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 2E-F), lo que es coherente con los niveles normales a aumentados de fosforilación de AKT previamente observados en adipocitos murinos con *Alms1^{foz/foz}* (Fig. 1G).

Los inventores investigaron a continuación la dinámica de GLUT4 en adipocitos humanos en ausencia de ALMS1. La localización celular del receptor de insulina (RI) en la membrana plasmática no se vio afectada una vez se detectó la carencia de síntomas por ALMS1 cerca de la membrana plasmática (MP) en ausencia de

insulina. (FIG. 2G, recuadro superior). Por el contrario, en los adipocitos carentes de ALMS1, en ausencia de insulina, GLUT4 perdió su localización perinuclear y se detectó dispersada en todo el citoplasma celular en lugar de asumir su localización perinuclear habitual. (Fig. 2G, recuadros medio e inferior y 2H). Tras la estimulación con insulina, se observó que GLUT4 se movía a la MP dentro de la malla de actina (Fig. 2I) tanto en los adipocitos de referencia como en los carentes de síntomas por ALMS1. Dos horas después de la estimulación con insulina en ausencia de insulina, todavía se detectó GLUT4 dispersada en todo el citoplasma de los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1, mientras que los adipocitos de referencia tenían su GLUT4 reubicado adecuadamente en la región perinuclear (Fig. 2J). Como existe un equilibrio entre la exocitosis y la endocitosis de las vesículas de GLUT4 hacia y desde la MP, los inventores comprobaron que el deterioro de la clasificación de GLUT4 en adipocitos carentes de síntomas por Alms1 no se debía a una endocitosis defectuosa de GLUT4. El examen de dinamina, una molécula clave en la endocitosis, no demostró diferencias en las concentraciones de proteínas ni en la localización celular tras la carencia de síntomas por ALMS1 en los adipocitos. Además, las velocidades medias de los endosomas marcados fueron similares entre los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 y de referencia, argumentando que un defecto en la endocitosis es la causa de la presencia reducida de GLUT4 en la MP en respuesta a la señalización de la insulina.

Ejemplo 3

Se requiere ALMS1 para dirigir TBC1D4 a la MP en respuesta a la señalización de insulina

Para comprender el mecanismo molecular que subyace al efecto de la inactivación de ALMS1 en la localización de GLUT4, los inventores identificaron compañeros interactivos de ALMS1 en adipocitos humanos. La inmunoprecipitación (IP) utilizando ALMS1 como cebo se realizó con adipocitos humanos maduros jóvenes (4 días después del desencadenante de diferenciación) seguido de la identificación de los compañeros que interactúan con ALMS1 por espectrometría de masas. Entre las proteínas que se inmunoprecipitaron con ALMS1, estaba TBC1D4, una conocida GTPasa sustrato de AKT requerida para la retención adecuada de GLUT4 en las vesículas de clasificación de GLUT4 (GSV) y para la translocación de GLUT4 a la membrana celular para la absorción intracelular de glucosa.

Ejemplo 4

Desarrollo de modelos de homología estructural de ALMS1, TBC1D4 y α PKC.

Como la estructura cristalina de Alms1 aún no se ha resuelto, se utilizó un modelo de homología estructural por simulación informática para predecir la estructura en 3D de ALMS1 e identificar motivos estructurales que podrían unirse a ligandos de posible interacción (Fig. 3A-C).

Modelo estructural de ALMS1. El modelo de ALMS1 se construyó utilizando el método de modelado de fragmentos con el programa de modelado de homología, Modeller. La secuencia de aminoácidos para cada exón de ALMS1 se sometió a un algoritmo de subprocesamiento basado en el perfil disponible en el servidor PISRED y se identificaron las plantillas adecuadas. Luego, las proteínas de la plantilla identificadas se alinearon con las respectivas secuencias de exones y cada exón se modeló por separado utilizando Modeller. La optimización de la energía y la selección de los modelos se realizaron en base a una puntuación de energía de las proteínas optimizada y discreta. Por último, los modelos se ensamblaron para construir la estructura de ALMS1 completa y la proteína completa se relajó y minimizó utilizando el programa de simulación de dinámica molecular NAMD.

Modelo estructural del dominio de unión PTP de TBC1D4. El dominio de unión PTP de TBC1D4 se encuentra dentro de los primeros 160 restos. No se identificó ninguna estructura homóloga fiable para modelar la estructura entre el dominio de unión PTP y el dominio de unión Rab. La estructura cristalina del dominio PTP de Disabled-1 murino (Dab-1), 1NU2 (valor E = $5,2e-17$), que se identificó mediante la búsqueda de plantillas basada en HMM en el modelo Swiss, se usó como plantilla para construir el dominio de unión PTP de TBC1D4.

El dominio PTP de TBC1D4 que interactúa con ALMS-1. El acoplamiento macromolecular se realizó utilizando el algoritmo ClusPro 2.0. Los restos ubicados en la superficie de interacción con superposición $\geq 0,4$ angstrom se consideraron como restos interactuantes. Interproscan puso de manifiesto que ALMS-1 contenía un dominio similar a WD40 dentro de los primeros 3.871 restos. Las proteínas que contienen el dominio WD40 son una familia de proteínas que funcionan como estructuras para las interacciones macromoleculares.

El dominio de unión a PTP de TBC1D4 que interactúa con ALMS1. Al principio, el dominio de unión a PTP y el dominio de unión a RabGTP de TBC1D4 se acoplaron al modelo ALMS1 utilizando el servidor Cluspro 2 para determinar el punto más probable de interacción. Luego, ambos dominios se acoplaron a sus respectivos puntos de interacción en ALMS1 utilizando Autodock 4.2 y se calcularon sus afinidades de enlace. Basándose en las afinidades, el dominio de unión a PTP de TBC1D4 se une a ALMS1 con una afinidad de aproximadamente 100 veces mayor en comparación con el dominio de unión a RabGTP. Por lo tanto, los inventores prevén que el dominio de unión a PTP puede tener una mayor probabilidad de interactuar con la molécula ALMS1 en comparación con el dominio de unión a RabGTP.

Modelando el dominio a PTP de TBC1D4. El dominio de unión a fosfo-tirosina de TBC1D4 se modeló después de identificar una plantilla adecuada del algoritmo de identificación de la plantilla del modelo Swiss.

Acoplar el dominio a PTP de TBC1D4 y el dominio de unión a RabGTP a ALMS1. Al principio, el dominio de unión a PTP y el dominio de unión a RabGTP de TBC1D4 se acoplaron a ALMS1 utilizando el servidor Cluspro 2 y se identificó el punto de interacción. Luego, ambos dominios se acoplaron a sus respectivos puntos interactuantes utilizando Autodock 4.2 y se calcularon sus afinidades de unión.

5

Números de restos de ALMS1 previsto, con el potencial para interactuar con otro ligando	65,66,69,72,73,74,75,76,77,78,80,87,2875,2876,2877,2878,2879,2880,2881,2882,2883,2884,2885,2887,2888,2889,2890,2892,2893,2894,2895,2897,2909,2910,2912,2929,2931,2932,2933,2934,2935,3557,3558,4131,144,145,146,147,148,149,150,151,193,194,195,198,199,200,201,205,208,211,214,226,227,229,233,234,235,236,239,242,243,246,248,249,250,251,252,314,319,321,986,1341,1344,2269,113,114,115,116,123,126,127,128,1340,1438,1439,1440,1441,1442,1443,1444,1446,1447,1448,1449,1450,1451,1452,1453,1454,1457,1458,1459,1478,1915,1918,1919,1920,1922,1923,1930,2041,2042,2043,2257,2267,2483,2484,3866,218,219,220,221,222,223,224,277,278,279,282,285,286,287,288,686,688,689,690,691,699,1856,1858,1859,1861,1862,1863,1864,1865,1866,1867,1868,1869,1870,1871,1872,1949,1968,1969,1971,1974,1979,1980,1981,1982,1983,1984,2104,2107,2111,2870,2872,2874,2915,3285,3286,3287,793,795,796,797,1285,1314,1408,1409,1422,1423,1425,1426,1427,1430,1431,1671,1672,1794,1797,2538,2539,2540,2555,2556,2557,2563,2564,2565,2567,2568,2588,2591,2599,2603,2699,2701,2702,3108
Restos previstos de ALMS1 que median la interacción con α PKC	E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883, E2884
Restos previstos de α PKC que median la interacción con ALMS1	F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664, I667
Restos previstos de TBC1D4 que median la interacción con ALMS1	G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82, I83
Restos predichos de ALMS1 que median la interacción con TBC1D4	H65, L66, S2879

El modelo de homología puso de manifiesto que Alms1 adopta una estructura de tipo corazón de manzana con un gran número en puntos de unión de posibles ligandos centrados alrededor del núcleo. La estructura cristalina de TBC1D4 tampoco se resolvió y, por lo tanto, los inventores utilizaron un método de modelado de homología para predecir la estructura del dominio de unión a PTP de TBC1D4 (Fig. 3C-D). Posteriormente, se realizaron estudios de acoplamiento por simulación informática que predijeron una unión de gran afinidad de TBC1D4 con ALMS1 mediante enlaces de hidrógeno de restos de TBC1D4, G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82, I83 con restos interactivos H65, L66, S2879 en Alms1 (FIG. 4A). La localización conjunta de ALMS1 y TBC1D4 se confirmó a continuación en adipocitos humanos mediante estudios de inmunofluorescencia (Fig. 4B). Los niveles de expresión de GLUT4, TBC1D4, y RAP se probaron a continuación en adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 con o sin estimulación con insulina, pero no se encontraron diferencias significativas (Fig. 4C). Tras la fosforilación por AKT activado, el TBC1D4 fosforilado (p-TBC1D4) en adipocitos se dirige a proteínas RAB como RAB14 y RAB10 antes de que los GSV se dirijan a la MP. Sin embargo, tras la estimulación con insulina de adipocitos carentes de síntomas por Alms1, no se pudo detectar ninguna diferencia en los niveles de TBC1D4, p-TBC1D4, RAB14 y RAB10 (Fig. 4D). Los inventores luego se centraron en la localización celular de GLUT4. En ausencia de estimulación con insulina, la carencia de síntomas de TBC1D4 reprodujo el efecto de carencia de síntomas por ALMS1 observado en adipocitos maduros, es decir, una mala localización de GLUT4 en todo el citoplasma (Fig. 4E). En respuesta a la estimulación de la insulina, GLUT4 se liberó de la región perinuclear en los adipocitos de referencia que se extienden por todo el citoplasma del adipocito (FIG. 4F), reproduciendo así el patrón de distribución de GLUT4 que se observa en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 y TBC1D4 en ausencia (FIG. 4E) y presencia (FIG. 4F), de insulina. Los inventores investigaron posteriormente el efecto de la carencia de síntomas por ALMS1 en la dinámica celular de TBC1D4 en respuesta a la insulina. En ausencia de insulina, el TBC1D4 se localizó en la región perinuclear tanto en la referencia como en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 4G) pero, en particular, en respuesta a la insulina, el TBC1D4 solo se transportó a la MP en la referencia pero no en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (Figura 4H).

Ejemplo 5

ALMS1 forma un complejo dinámico de proteínas, el ALMSome, necesario para el transporte de glucosa estimulada por insulina en adipocitos maduros humanos

Aunque los inventores demostraron que la carencia de síntomas por ALMS1 impidió que el TBC1D4 se dirigiera a la MP, quedaba por ver si esta alteración explicaba por sí misma la mayor reducción en la absorción de glucosa observada en los adipocitos carentes de ALMS1. Por lo tanto, los inventores compararon la absorción celular de 2-NBDG tras la estimulación con insulina en ALMS1 o adipocitos carentes de síntomas por TBC1D4 o de referencia y no encontraron casi 2-NBDG absorbido en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 en comparación con los adipocitos de referencia (Fig. 5A-B), mientras que aunque reducido en comparación con las referencias, una cantidad sustancial de 2-NBDG aún era absorbida por adipocitos carentes de síntomas con TBC1D4 (Fig. 5C). Ensayos posteriores de unión de GLUT4-anticuerpo en ALMS1 o adipocitos carentes de síntomas por TBC1D4 o de referencia después de 30 minutos de estimulación con insulina mostraron una alta proporción de GLUT4 en la MP en adipocitos de referencia y carentes de síntomas por TBC1D4 pero no en células carentes de síntomas por ALMS1 (FIG. 5D-F), lo que indica que el defecto secundario en TBC1D4 dirigido a la MP en células carentes de síntomas por Alms1 no explica, por sí mismo, el defecto muy grave en el transporte de glucosa y la expresión de GLUT4 MP en células carentes en ALMS1. Un examen posterior de los datos IP de Alms1 puso de manifiesto varias subunidades de bombas de protones (H^+) ATPasa tipo V (A, B, D1 y G2) que los inventores luego demostraron que se expresa en adipocitos maduros (Fig. 5G) junto con α PKC, la cinasa activadora de las bombas de H bajo control de insulina. Los inventores confirmaron que ALMS1 estaba muy cerca de las bombas de H^+ V-ATPasa en adipocitos maduros en presencia de insulina, tanto por un método PLP Duolink *in situ* que apunta a ALMS1 como a las subunidades A1 y D1 de las bombas de protones (Fig. 5H) y también por inmunotinción conjunta de ALMS1, VATPasa A1 y D1 y α PKC (Fig. 5H, I). ALMS1 co-localizado con la subunidad V0D1 de la bomba de protones (FIG. 5I) que está integrada en la membrana de GSV, lo que indica que ALMS1 se transporta en el adipocito junto con las bombas de protones localizadas dentro de los GSV. Usando su modelo estructural basado en simulación por ordenador de compañeros que interactúan con ALMS1, los inventores identificaron un motivo de unión para PKC en Alms1. Los puntos de unión para TBC1D4 y α PKC en Alms1 estaban tan cerca que el modelo demostró que el acoplamiento simultáneo de ambas proteínas a Alms1 no era posible debido al impedimento estérico (Fig. 5J). Los inventores así plantearon la hipótesis. Para probar su hipótesis de que la unión de ALMS1 a α PKC o alternativamente TBC1D4 estaba bajo el control recíproco de la señalización de insulina en los adipocitos, los inventores realizaron nuevamente IPs utilizando ALMS1 como cebo, pero esta vez utilizando adipocitos maduros humanos cultivados en presencia o ausencia de insulina estando los IP inmunotransferidos tanto para α PKC como TBC1D4. Los resultados pusieron de manifiesto que α PKC solo podía ser destruido por Alms1 y detectado por inmunotransferencia en extractos de adipocitos incubados en ausencia de insulina (Fig. 5K), mientras que TBC1D4 solo fue destruido por ALMS1 y detectado en extractos de adipocitos incubados en presencia de insulina, lo que es coherente con el modelo de inventores de la unión recíproca de Alms1 regulada por insulina (FIG. 5L).

Ejemplo 6

El ALMSome se necesita para la acidificación de GSV antes de la entrega de GLUT4 a la membrana plasmática

Si bien se sabe que la fosforilación por AKT de TBC1D4 conduce de alguna manera al tráfico de GLUT4, la etapa final de la fusión GSV-MP es un evento independiente de AKT regulado por la insulina que requiere la inflamación osmótica de los GSV bajo la acción de la bomba de H^+ vATPasa. Sin embargo, faltaba el conocimiento de la señal real y el mecanismo para la activación de la bomba de H^+ por insulina. Los inventores probaron si la inactivación de ALMS1 podría evitar la acidificación de los GSV y, por lo tanto, la liberación mediada por quimio-osmóticos de GLUT4 a la MP utilizando el colorante acidotrófico, naranja de acridina, que emite una fluorescencia verde a baja concentración y una fluorescencia roja anaranjada a altas concentraciones en los lisosomas en los que el naranja de acridina está protonado y secuestrado. En ausencia de insulina, no se detectó fluorescencia roja anaranjada en los adipocitos. Por el contrario, la insulina produjo una rápida aparición de color rojo en los adipocitos maduros humanos de referencia (Fig. 6A) pero no en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 6B), lo que indica una pérdida de la acidificación mediada por insulina de los lisosomas en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1.

Los inventores probaron a continuación si se acidificando los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 usando Nigericina (NIG.), un ionóforo electroneutro de intercambio K^+/H^+ que se sabe causa inflamación osmótica de los GSV evitaría el defecto asociado a Alms1 en la fusión de GLUT4 y la absorción de glucosa. El tratamiento con NIG dio lugar a una rápida acidificación tanto de los adipocitos de referencia como de los carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 6C-D), activando así la inflamación y la fusión de las vesículas intracelulares. En paralelo, el análisis por microscopía electrónica mostró vesículas que estaban situadas junto a la MP sin fusión en ausencia de insulina tanto en los adipocitos de referencia como en los carentes de síntomas por ALMS1 (FIG. 6E-F, recuadros superiores). El tratamiento con insulina produjo una hinchazón de las vesículas (Fig. 6E, recuadros intermedios) asociada a la fusión de las vesículas con la MP para la absorción de glucosa solo en los adipocitos de referencia (FIG. 6E, recuadros intermedios) pero no en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (FIG. 6F, recuadros centrales). Sin embargo, NIG. Produjo hinchamiento vesicular y fusión con la MP tanto en la referencia como en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 6E-F, recuadros inferiores). El tratamiento con NIG restauró la absorción de glucosa en adipocitos carentes de síntomas por ALMS1. Mientras que la insulina tuvo poco efecto en provocar la absorción de 2-NBDG en adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 (Fig. 6G-H, recuadros superior y medio), NIG no solo restauró la fusión de vesículas, sino que también pudo demostrarse que restaura la absorción

de 2-NBDG en los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 a niveles observados en células de referencia (Fig. 6G-H, recuadros inferiores). Este transporte restaurado de glucosa en adipocitos carentes de síntomas con ALMS1 tratados con NIG se correlacionó con la fusión restaurada de GLUT4 con la MP (FIG. 7A) pero no con TBC1D4 dirigido a la MP (Fig. 7B); y condujo a la restauración del llenado por TG de los adipocitos carentes de síntomas por ALMS1 24 horas después del tratamiento con NIG.

Ejemplo 7

Identificación de inhibidores de péptidos de la unión de PKC a Alms1

Una vez que se conoce el punto de interacción de la unión entre dos proteínas, como se conoce en la técnica, es posible usar el conocimiento de la configuración y los aminoácidos de cada proteína involucrada en la mediación de la interacción, usar modelos informáticos para diseñar péptidos o fármacos de moléculas pequeñas que, por la unión en la región del punto de interacción son capaces de impedir estéricamente o de otro modo la interacción de unión. Los inventores, por lo tanto, buscaron identificar los péptidos que inhibirían la interacción de ALMS1 y α PKC o TBC1D4 utilizando sus modelos estructurales ALMS1, TBC1D4 y α PKC descritos en el ejemplo 4. Los péptidos predichos que usan este método para bloquear la interacción entre α PKC y ALMS1 incluyeron las secuencias LDSDSHYGPQHLESIDD (SEC ID. n° 5), DSHQTEETL (SEC ID. n° 6), QQTLPEHL (SEC ID. n° 7), QALLDSHLPE (SEC ID. n° 8), PADQMTDTP (SEC ID. n° 9), HIPEEAQKVS AV (SEC ID. n° 10) o SCIFLEQ (SEC ID. n° 11). Un péptido identificado mediante este método para bloquear la interacción entre TBC1D4 y ALMS1 fue la secuencia GCGAPAAREVILVL (SEC ID. n° 12).

Ejemplo 8

La expresión del dominio interactivo α PKC que interactúa con ALMS1 en adipocitos maduros desencadena la absorción de glucosa en ausencia de insulina

A continuación, los inventores verificaron la hipótesis de que la insulina media la liberación de α PKC del complejo ALMSome para provocar la absorción de glucosa. Para ello, clonaron el dominio de interacción de α PKC (SEC ID. n° 14 y n° 15) en un vector lentivírico junto con una etiqueta Flag. La secuencia seleccionada fue la secuencia mínima de α PKC (min- α PKC-FLAG) lo que evita el impedimento estérico con el punto de interacción TBC1D4 en ALMS1. El min- α PKC-FLAG expresado en los adipocitos compite con el α PKC endógeno para evitar que se una a Almsome y, por lo tanto, favorece la unión de TBC1D4 mediada por insulina a Almsome. Los adipocitos maduros se infectaron luego con partículas lentivíricas de referencia o min- α PKC para evaluar el impacto de min- α PKC-FLAG en la absorción de glucosa. 48 horas después de la infección, se realizó una inmunodetección de min- α PKC-FLAG utilizando un anticuerpo contra la etiqueta FLAG (Fig. 9). Para la prueba de concepto *in vitro*, los inventores trataron adipocitos maduros como se describe (Fig. 9) y a continuación incubaron los adipocitos maduros tratados con 2-NBDG para evaluar el efecto de min- α PKC-FLAG sobre la absorción de glucosa. De interés, el 2-NBDG se absorbió en los adipocitos tratados con min- α PKC-FLAG en ausencia de INS (Fig. 8A, columna izquierda) que correspondía a un aumento de 3,5 veces en comparación con la referencia (Fig. 8B). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en presencia de INS (Fig. 8A, columna derecha y 8B). Estos datos demuestran que dirigir la interacción de ALMS1 y α PKC es suficiente para desencadenar la absorción de glucosa en los adipocitos independientemente de la presencia de INS.

Producción de vector lentivírico que lleva el dominio α PKC

El dominio que interactúa con ALMS1 de PKC α humano se amplificó a partir del ADNc de células HEK293 humanas con etiqueta FLAG en el terminal N usando cebadores directo 5'-gtacGAATTCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGCTCAGGACTTCAATTTCTC-3' (SEC. ID. n° 16) e inverso 5'-tagcGGATCCTCATACTGCACTCTGTAAGATGGG-3' (SEC. ID. n° 17) y se clonó en el vector lentivírico pCDH-EF1-MCS-IRES-puro (System Biosciences). Para la producción de virus, los vectores lentivíricos PKC α se transfectaron en células 293TN (System Biosciences) junto con los plásmidos de encapsulación psPAX2 y pMD2.G (Addgene) con una relación en peso de 3:2:1, respectivamente, utilizando Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, el sobrenadante del cultivo se recogió por centrifugación a 500 xg durante 10 min, seguido de filtración a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m con membrana de PES (Sartorius). La solución de virus se concentró a continuación agregando 1/2 volumen de PEG6000 al 30% frío (p/vol) disuelto en NaCl 0,5 M y se incubó durante la noche a 4°C con mezclado ocasional. La mezcla se centrifugó a continuación a 3.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Luego, el sedimento que contenía partículas lentivíricas se volvió a poner en suspensión en 1 ml de medio DMEM y se almacenó a -80°C antes de la infección de las células diana.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Université de Strasbourg et al.

5 <120> Nuevas dianas para el tratamiento y prevención de la diabetes

<130> B1768PC

<160> 17

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4169

15 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Glu Pro Glu Asp Leu Pro Trp Pro Gly Glu Leu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Asn Val Asp Asp Val Val Val Val Glu Glu Val Glu
35 40 45

Glu Glu Ala Gly Arg Glu Leu Asp Ser Asp Ser His Tyr Gly Pro Gln
50 55 60

His Leu Glu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ala Lys Ala Trp
65 70 75 80

Leu Gln Ala His Pro Gly Arg Ile Leu Pro Pro Leu Ser Pro Pro Gln
85 90 95

His Arg Tyr Ser Glu Gly Glu Arg Thr Ser Leu Glu Lys Ile Val Pro
100 105 110

Leu Thr Cys His Val Trp Gln Gln Ile Val Tyr Gln Gly Asn Ser Arg
115 120 125

Thr Gln Ile Ser Asp Thr Asn Val Val Cys Leu Glu Thr Thr Ala Gln
130 135 140

Arg Gly Ser Gly Asp Asp Gln Lys Thr Glu Ser Trp His Cys Leu Pro
145 150 155 160

Gln Glu Met Asp Ser Ser Gln Thr Leu Asp Thr Ser Gln Thr Arg Phe
165 170 175

20

ES 2 714 355 T3

Asn	Val	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Ser	Leu	Glu	180	185	190	
Glu	Gly	Ile	Leu	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Gln	Val	Lys	Glu	Pro	Asn	Arg	195	200	205	
Asp	Leu	Phe	Cys	Ser	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Gln	Asp	Ser	Phe	Ala	Ser	210	215	220	
Pro	Asp	Leu	Pro	Leu	Leu	Thr	Cys	Leu	Thr	Gln	Asp	Gln	Glu	Phe	Ala	225	230	235	240
Pro	Asp	Ser	Leu	Phe	His	Gln	Ser	Glu	Leu	Ser	Phe	Ala	Pro	Leu	Arg	245	250	255	
Gly	Ile	Pro	Asp	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Glu	Trp	Ser	Ser	Arg	Pro	Ser	260	265	270	
Glu	Val	Ser	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala	Thr	Ala	Glu	Val	Ala	Ser	Asp	275	280	285	
Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Val	Ser	Gln	His	Pro	Leu	Ile	Gly	Ser	290	295	300	
Thr	Ala	Val	Gly	Ser	Gln	Cys	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Glu	Gln	Gly	Asn	305	310	315	320
Asn	Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Ile	Pro	Lys	Asp	325	330	335	
Cys	Asp	Arg	Tyr	Asp	Asp	Leu	Cys	Ser	Tyr	Met	Ser	Trp	Lys	Thr	Arg	340	345	350	
Lys	Asp	Thr	Gln	Trp	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Gln	Val	355	360	365	
Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Phe	Asp	Ile	Thr	Asp	Glu	Asn	Ile	Ala	Thr	Lys	370	375	380	
Arg	Ser	Asp	His	Phe	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Trp	Thr	385	390	395	400
Gln	Glu	Asp	Ser	Ser	Lys	Gln	Ala	Glu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Lys	Gly	Leu	405	410	415	
Gln	Gly	Lys	Val	Glu	Ser	Asp	Val	Ile	Thr	Leu	Asp	Gly	Leu	Asn	Glu	420	425	430	

ES 2 714 355 T3

Asn	Ala	Val	Val	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Pro	435	440	445
Thr	Arg	Glu	Ser	Glu	Tyr	His	Ser	Ser	Asp	Leu	Arg	Met	Leu	Arg	Met	450	455	460
Ser	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Lys	Ala	Pro	Lys	His	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	465	470	475
Thr	Ser	Lys	Gly	Gly	Ile	Ala	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Asn	Leu	Lys	Ser	485	490	495
Gly	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Asp	Ile	Gly	Ser	His	Leu	Ser	500	505	510
Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Ala	Val	Ser	Ser	Pro	Leu	Glu	515	520	525
Thr	Thr	Thr	Gly	Gln	His	Thr	Asp	Thr	Leu	Asn	Gln	Lys	Thr	Leu	Ala	530	535	540
Asp	Thr	His	Leu	Thr	Glu	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Pro	Glu	545	550	555
Pro	Ala	Asp	Gln	Lys	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ser	His	565	570	575
Ser	His	Arg	Gly	Lys	Pro	Ser	Ile	Phe	Tyr	Gln	Gln	Gly	Leu	Pro	Asp	580	585	590
Ser	His	Leu	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Leu	595	600	605
Ala	Asp	Gln	Thr	Thr	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser	610	615	620
His	Arg	Glu	Lys	Pro	Gly	Thr	Phe	Tyr	Gln	Gln	Glu	Leu	Pro	Glu	Ser	625	630	635
Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	645	650	655
Glu	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Pro	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	His	Ser	His	660	665	670
Val	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Phe	Tyr	Arg	Gln	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	His	675	680	685

ES 2 714 355 T3

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

ES 2 714 355 T3

930	935	940
Lys Thr Gly Thr Pro Thr Val Ser Ser Asn Ser His Ser His Ser Glu 945 950 955 960		
Lys Ser Ser Val Phe Tyr Gln Gln Glu Leu Pro Asp Ser Asp Leu Pro 965 970 975		
Arg Glu Ser Leu Lys Met Ser Ala Ile Pro Gly Leu Thr Asp Gln Lys 980 985 990		
Thr Val Pro Thr Pro Thr Val Pro Ser Gly Ser Phe Ser His Arg Glu 995 1000 1005		
Lys Pro Ser Ile Phe Tyr Gln Gln Glu Trp Pro Asp Ser Tyr Ala 1010 1015 1020		
Thr Glu Lys Ala Leu Lys Val Ser Thr Gly Pro Gly Pro Ala Asp 1025 1030 1035		
Gln Lys Thr Glu Ile Pro Ala Val Gln Ser Ser Ser Tyr Pro Gln 1040 1045 1050		
Arg Glu Lys Pro Ser Val Leu Tyr Pro Gln Val Leu Ser Asp Ser 1055 1060 1065		
His Leu Pro Glu Glu Ser Leu Lys Val Ser Ala Phe Pro Gly Pro 1070 1075 1080		
Ala Asp Gln Met Thr Asp Thr Pro Ala Val Pro Ser Thr Phe Tyr 1085 1090 1095		
Ser Gln Arg Glu Lys Pro Gly Ile Phe Tyr Gln Gln Thr Leu Pro 1100 1105 1110		
Glu Ser His Leu Pro Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ser Val Ala Pro 1115 1120 1125		
Gly Leu Ala Asp Gln Lys Thr Gly Thr Pro Thr Val Thr Ser Thr 1130 1135 1140		
Ser Tyr Ser Gln His Arg Glu Lys Pro Ser Ile Phe His Gln Gln 1145 1150 1155		
Ala Leu Pro Gly Thr His Ile Pro Glu Glu Ala Gln Lys Val Ser 1160 1165 1170		

ES 2 714 355 T3

Ala Val	Thr Gly Pro Gly	Asn	Gln Lys Thr Trp	Ile	Pro Arg Val
1175		1180		1185	
Leu Ser	Thr Phe Tyr Ser	Gln	Arg Glu Lys Pro	Gly	Ile Phe Tyr
1190		1195		1200	
Gln Gln	Thr Leu Pro Gly	Ser	His Ile Pro Glu	Glu	Ala Gln Lys
1205		1210		1215	
Val Ser	Pro Val Leu Gly	Pro	Ala Asp Gln Lys	Thr	Gly Thr Pro
1220		1225		1230	
Thr Pro	Thr Ser Ala Ser	Tyr	Ser His Thr Glu	Lys	Pro Gly Ile
1235		1240		1245	
Phe Tyr	Gln Gln Val Leu	Pro	Asp Asn His Pro	Thr	Glu Glu Ala
1250		1255		1260	
Leu Lys	Ile Ser Val Ala	Ser	Glu Pro Val Asp	Gln	Thr Thr Gly
1265		1270		1275	
Thr Pro	Ala Val Thr Ser	Thr	Ser Tyr Ser Gln	Tyr	Arg Glu Lys
1280		1285		1290	
Pro Ser	Ile Phe Tyr Gln	Gln	Ser Leu Pro Ser	Ser	His Leu Thr
1295		1300		1305	
Glu Glu	Ala Lys Asn Val	Ser	Ala Val Pro Gly	Pro	Ala Asp Gln
1310		1315		1320	
Lys Thr	Val Ile Pro Ile	Leu	Pro Ser Thr Phe	Tyr	Ser His Thr
1325		1330		1335	
Glu Lys	Pro Gly Val Phe	Tyr	Gln Gln Val Leu	Pro	His Ser His
1340		1345		1350	
Pro Thr	Glu Glu Ala Leu	Lys	Ile Ser Val Ala	Ser	Glu Pro Val
1355		1360		1365	
Asp Gln	Thr Thr Gly Thr	Pro	Thr Val Thr Ser	Thr	Ser Tyr Ser
1370		1375		1380	
Gln His	Thr Glu Lys Pro	Ser	Ile Phe Tyr Gln	Gln	Ser Leu Pro
1385		1390		1395	
Gly Ser	His Leu Thr Glu	Glu	Ala Lys Asn Val	Ser	Ala Val Pro
1400		1405		1410	

ES 2 714 355 T3

Gly	Pro	Gly	Asp	Arg	Lys	Thr	Gly	Ile	Pro	Thr	Leu	Pro	Ser	Thr
1415						1420					1425			
Phe	Tyr	Ser	His	Thr	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Val
1430						1435					1440			
Leu	Pro	His	Ser	His	Leu	Pro	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Val	Ser	Val
1445						1450					1455			
Ala	Pro	Gly	Pro	Val	Asp	Gln	Thr	Ile	Gly	Thr	Pro	Thr	Val	Thr
1460						1465					1470			
Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Phe	Gly	Glu	Lys	Pro	Ile	Val	Ile	Tyr	Lys
1475						1480					1485			
Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	His	Leu	Pro	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Val
1490						1495					1500			
Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Gln	Thr	Thr	Gly	Ala	Pro	Thr
1505						1510					1515			
Ile	Thr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Gln	His	Arg	Ala	Lys	Ser	Gly	Ser
1520						1525					1530			
Phe	Tyr	Gln	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Pro	Glu	Glu	Ala
1535						1540					1545			
Leu	Arg	Val	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Asp	Gln	Thr	Thr	Gly
1550						1555					1560			
Ile	Pro	Thr	Ile	Thr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser	Phe	Gly	Glu	Lys	Pro
1565						1570					1575			
Ile	Val	Asn	Tyr	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Asp	Gly	His	Leu	Pro	Glu
1580						1585					1590			
Glu	Ala	Leu	Lys	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Gly	Pro	Thr	Glu	Lys	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Asp	Ile	Pro	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Leu	Gly	Glu
1610						1615					1620			
Lys	Pro	Ile	Thr	Phe	Tyr	Arg	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	Pro	Leu
1625						1630					1635			
Asn	Lys	Glu	Val	Val	Lys	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Asp
1640						1645					1650			

ES 2 714 355 T3

Gln Lys Thr Glu Thr Leu Pro Val His Ser Thr Ser Tyr Ser Asn	1655	1660	1665
Arg Gly Lys Pro Val Ile Phe Tyr Gln Gln Thr Leu Ser Asp Ser	1670	1675	1680
His Leu Pro Glu Glu Ala Leu Lys Val Pro Pro Val Pro Gly Pro	1685	1690	1695
Asp Ala Gln Lys Thr Glu Thr Pro Ser Val Ser Ser Ser Leu Tyr	1700	1705	1710
Ser Tyr Arg Glu Lys Pro Ile Val Phe Tyr Gln Gln Ala Leu Pro	1715	1720	1725
Asp Ser Glu Leu Thr Gln Glu Ala Leu Lys Val Ser Ala Val Pro	1730	1735	1740
Gln Pro Ala Asp Gln Lys Thr Gly Leu Ser Thr Val Thr Ser Ser	1745	1750	1755
Phe Tyr Ser His Thr Glu Lys Pro Asn Ile Ser Tyr Gln Gln Glu	1760	1765	1770
Leu Pro Asp Ser His Leu Thr Glu Glu Ala Leu Lys Val Ser Asn	1775	1780	1785
Val Pro Gly Pro Ala Asp Gln Lys Thr Gly Val Ser Thr Val Thr	1790	1795	1800
Ser Thr Ser Tyr Ser His Arg Glu Lys Pro Ile Val Ser Tyr Gln	1805	1810	1815
Arg Glu Leu Pro His Phe Thr Glu Ala Gly Leu Lys Ile Leu Arg	1820	1825	1830
Val Pro Gly Pro Ala Asp Gln Lys Thr Gly Ile Asn Ile Leu Pro	1835	1840	1845
Ser Asn Ser Tyr Pro Gln Arg Glu His Ser Val Ile Ser Tyr Glu	1850	1855	1860
Gln Glu Leu Pro Asp Leu Thr Glu Val Thr Leu Lys Ala Ile Gly	1865	1870	1875
Val Pro Gly Pro Ala Asp Gln Lys Thr Gly Ile Gln Ile Ala Ser			

ES 2 714 355 T3

1880		1885		1890
Ser Ser 1895	Ser Tyr Ser Asn Arg 1900	Glu Lys Ala Ser Ile 1905	Phe His Gln	
Gln Glu 1910	Leu Pro Asp Val Thr 1915	Glu Glu Ala Leu Asn 1920	Val Phe Val	
Val Pro 1925	Gly Gln Gly Asp Arg 1930	Lys Thr Glu Ile Pro 1935	Thr Val Pro	
Leu Ser 1940	Tyr Tyr Ser Arg Arg 1945	Glu Lys Pro Ser Val 1950	Ile Ser Gln	
Gln Glu 1955	Leu Pro Asp Ser His 1960	Leu Thr Glu Glu Ala 1965	Leu Lys Val	
Ser Pro 1970	Val Ser Ile Pro Ala 1975	Glu Gln Lys Thr Gly 1980	Ile Pro Ile	
Gly Leu 1985	Ser Ser Ser Tyr Ser 1990	His Ser His Lys Glu 1995	Lys Leu Lys	
Ile Ser 2000	Thr Val His Ile Pro 2005	Asp Asp Gln Lys Thr 2010	Glu Phe Pro	
Ala Ala 2015	Thr Leu Ser Ser Tyr 2020	Ser Gln Ile Glu Lys 2025	Pro Lys Ile	
Ser Thr 2030	Val Ile Gly Pro Asn 2035	Asp Gln Lys Thr Pro 2040	Ser Gln Thr	
Ala Phe 2045	His Ser Ser Tyr Ser 2050	Gln Thr Val Lys Pro 2055	Asn Ile Leu	
Phe Gln 2060	Gln Gln Leu Pro Asp 2065	Arg Asp Gln Ser Lys 2070	Gly Ile Leu	
Lys Ile 2075	Ser Ala Val Pro Glu 2080	Leu Thr Asp Val Asn 2085	Thr Gly Lys	
Pro Val 2090	Ser Leu Ser Ser Ser 2095	Tyr Phe His Arg Glu 2100	Lys Ser Asn	
Ile Phe 2105	Ser Pro Gln Glu Leu 2110	Pro Gly Ser His Val 2115	Thr Glu Asp	

ES 2 714 355 T3

Val	Leu	Lys	Val	Ser	Thr	Ile	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Lys	Thr
2120						2125					2130			
Val	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Phe	Ser	His	Arg	Glu	Lys
2135						2140					2145			
Pro	Asp	Ile	Phe	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Pro	Asp	Arg	His	Leu	Thr
2150						2155					2160			
Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Asp	Gln
2165						2170					2175			
Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Thr	Val	Pro	Ser	Gly	Thr	Tyr	Ser	His	Gly
2180						2185					2190			
Glu	Asn	His	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	His	Val	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp
2195						2200					2205			
Asn	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Leu
2210						2215					2220			
Leu	Asn	Ser	Gln	Ala	Asp	Asp	Arg	Val	Val	Ile	Asn	Lys	Pro	Glu
2225						2230					2235			
Ser	Ala	Gly	Phe	Arg	Asp	Val	Gly	Ser	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Ala
2240						2245					2250			
Glu	Asn	Ser	Ala	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Ile	Arg	Thr	Leu	Leu	Met
2255						2260					2265			
Glu	Ala	Glu	Asn	Met	Ala	Leu	Lys	Arg	Cys	Asn	Phe	Pro	Ala	Pro
2270						2275					2280			
Leu	Ala	Arg	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Asp	Ile	Ser	Phe	Ile	Gln	Ser
2285						2290					2295			
Lys	Lys	Val	Val	Cys	Phe	Lys	Glu	Pro	Ser	Ser	Thr	Gly	Val	Ser
2300						2305					2310			
Asn	Gly	Asp	Leu	Leu	His	Arg	Gln	Pro	Phe	Thr	Glu	Glu	Ser	Pro
2315						2320					2325			
Ser	Ser	Arg	Cys	Ile	Gln	Lys	Asp	Ile	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Leu
2330						2335					2340			
Lys	Cys	Arg	Arg	Gly	Ile	Glu	Asn	Trp	Glu	Phe	Ile	Ser	Ser	Thr
2345						2350					2355			

ES 2 714 355 T3

Thr Val	Arg Ser Pro Leu	Gln	Glu Ala Glu Ser	Lys	Val Ser Met
2360		2365		2370	
Ala Leu	Glu Glu Thr Leu	Arg	Gln Tyr Gln Ala	Ala	Lys Ser Val
2375		2380		2385	
Met Arg	Ser Glu Pro Glu	Gly	Cys Ser Gly Thr	Ile	Gly Asn Lys
2390		2395		2400	
Ile Ile	Ile Pro Met Met	Thr	Val Ile Lys Ser	Asp	Ser Ser Ser
2405		2410		2415	
Asp Ala	Ser Asp Gly Asn	Gly	Ser Cys Ser Trp	Asp	Ser Asn Leu
2420		2425		2430	
Pro Glu	Ser Leu Glu Ser	Val	Ser Asp Val Leu	Leu	Asn Phe Phe
2435		2440		2445	
Pro Tyr	Val Ser Pro Lys	Thr	Ser Ile Thr Asp	Ser	Arg Glu Glu
2450		2455		2460	
Glu Gly	Val Ser Glu Ser	Glu	Asp Gly Gly Gly	Ser	Ser Val Asp
2465		2470		2475	
Ser Leu	Ala Ala His Val	Lys	Asn Leu Leu Gln	Cys	Glu Ser Ser
2480		2485		2490	
Leu Asn	His Ala Lys Glu	Ile	Leu Arg Asn Ala	Glu	Glu Glu Glu
2495		2500		2505	
Ser Arg	Val Arg Ala His	Ala	Trp Asn Met Lys	Phe	Asn Leu Ala
2510		2515		2520	
His Asp	Cys Gly Tyr Ser	Ile	Ser Glu Leu Asn	Glu	Asp Asp Arg
2525		2530		2535	
Arg Lys	Val Glu Glu Ile	Lys	Ala Glu Leu Phe	Gly	His Gly Arg
2540		2545		2550	
Thr Thr	Asp Leu Ser Lys	Gly	Leu Gln Ser Pro	Arg	Gly Met Gly
2555		2560		2565	
Cys Lys	Pro Glu Ala Val	Cys	Ser His Ile Ile	Ile	Glu Ser His
2570		2575		2580	
Glu Lys	Gly Cys Phe Arg	Thr	Leu Thr Ser Glu	His	Pro Gln Leu
2585		2590		2595	

ES 2 714 355 T3

Asp	Arg	His	Pro	Cys	Ala	Phe	Arg	Ser	Ala	Gly	Pro	Ser	Glu	Met
2600						2605					2610			
Thr	Arg	Gly	Arg	Gln	Asn	Pro	Ser	Ser	Cys	Arg	Ala	Lys	His	Val
2615						2620					2625			
Asn	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Asp	Gln	Asn	Asn	Ser	His	Phe	Lys	Val
2630						2635					2640			
Trp	Asn	Ser	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	His	Ser	Pro	Phe	Gln	Asn	Phe
2645						2650					2655			
Ile	Pro	Asp	Glu	Phe	Lys	Ile	Ser	Lys	Gly	Leu	Arg	Met	Pro	Phe
2660						2665					2670			
Asp	Glu	Lys	Met	Asp	Pro	Trp	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Ala
2675						2680					2685			
Phe	Val	Pro	Pro	Lys	Glu	Val	Asp	Phe	His	Ser	Ser	Ser	Gln	Met
2690						2695					2700			
Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Met	Lys	Lys	Phe	Thr	Thr	Ser	Ile	Thr	Phe
2705						2710					2715			
Ser	Ser	His	Arg	His	Ser	Lys	Cys	Ile	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Val
2720						2725					2730			
Lys	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Gly	Ser	Gln	Cys	Thr	Gly	Ala	Ser	Val
2735						2740					2745			
Gly	Val	Phe	Asn	Ser	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Gln	Asn	Pro	Pro	Arg
2750						2755					2760			
Asp	Leu	Lys	Gln	Lys	Thr	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Phe	Lys	Met	His
2765						2770					2775			
Ser	Asn	Ser	Gln	Asp	Lys	Glu	Val	Thr	Ile	Leu	Ala	Glu	Gly	Arg
2780						2785					2790			
Arg	Gln	Ser	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Asp	Phe	Glu	Arg	Ser	Phe	Gln
2795						2800					2805			
Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Glu	Arg	Ser	Asp	Phe	Thr	Gly	Ser	His	Ser
2810						2815					2820			
Glu	Pro	Ser	Thr	Arg	Ala	Asn	Cys	Ser	Asn	Phe	Lys	Glu	Ile	Gln

ES 2 714 355 T3

2825						2830						2835			
Ile Ser Asp Asn His Thr Leu	Ile Ser Met Gly Arg Pro Ser Ser														
2840						2845				2850					
Thr Leu Gly Val Asn Arg Ser	Ser Ser Arg Leu Gly Val Lys Glu														
2855						2860				2865					
Lys Asn Val Thr Ile Thr Pro	Asp Leu Pro Ser Cys Ile Phe Leu														
2870						2875				2880					
Glu Gln Arg Glu Leu Phe Glu	Gln Ser Lys Ala Pro Arg Ala Asp														
2885						2890				2895					
Asp His Val Arg Lys His His	Ser Pro Ser Pro Gln His Gln Asp														
2900						2905				2910					
Tyr Val Ala Pro Asp Leu Pro	Ser Cys Ile Phe Leu Glu Gln Arg														
2915						2920				2925					
Glu Leu Phe Glu Gln Cys Lys	Ala Pro Tyr Val Asp His Gln Met														
2930						2935				2940					
Arg Glu Asn His Ser Pro Leu	Pro Gln Gly Gln Asp Ser Ile Ala														
2945						2950				2955					
Ser Asp Leu Pro Ser Pro Ile	Ser Leu Glu Gln Cys Gln Ser Lys														
2960						2965				2970					
Ala Pro Gly Val Asp Asp Gln	Met Asn Lys His His Phe Pro Leu														
2975						2980				2985					
Pro Gln Gly Gln Asp Cys Val	Val Glu Lys Asn Asn Gln His Lys														
2990						2995				3000					
Pro Lys Ser His Ile Ser Asn	Ile Asn Val Glu Ala Lys Phe Asn														
3005						3010				3015					
Thr Val Val Ser Gln Ser Ala	Pro Asn His Cys Thr Leu Ala Ala														
3020						3025				3030					
Ser Ala Ser Thr Pro Pro Ser	Asn Arg Lys Ala Leu Ser Cys Val														
3035						3040				3045					
His Ile Thr Leu Cys Pro Lys	Thr Ser Ser Lys Leu Asp Ser Gly														
3050						3055				3060					

ES 2 714 355 T3

Thr	Leu	Asp	Glu	Arg	Phe	His	Ser	Leu	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	Ala
3065						3070					3075			
Arg	Met	Asn	Ser	Glu	Phe	Asn	Phe	Asp	Leu	His	Thr	Val	Ser	Ser
3080						3085					3090			
Arg	Ser	Leu	Glu	Pro	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Ser	Lys	Pro	Val
3095						3100					3105			
Ala	Gln	Asp	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys	Ser	Ser
3110						3115					3120			
Leu	Asp	Phe	Gln	Val	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	Asp	Ser	Asn	Thr
3125						3130					3135			
Ile	Thr	Gln	Asp	Leu	Lys	Thr	Ile	Pro	Ser	Gln	Asn	Ser	Gln	Ile
3140						3145					3150			
Val	Thr	Ser	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Asn	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Gly
3155						3160					3165			
His	Ser	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Val	Phe	Ala	Asp	Arg	Leu	Pro
3170						3175					3180			
Glu	Lys	Met	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Glu	Lys	Leu	Ser
3185						3190					3195			
Ser	Asp	Ala	Val	Thr	Gln	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr
3200						3205					3210			
Leu	Phe	Ser	Ser	Glu	Ile	Phe	Ile	Asn	Ala	Glu	Asp	Arg	Gly	His
3215						3220					3225			
Glu	Ile	Ile	Glu	Pro	Gly	Asn	Gln	Lys	Leu	Arg	Lys	Ala	Pro	Val
3230						3235					3240			
Lys	Phe	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Gln	Gln	Val	Thr	Phe	Ser	Arg
3245						3250					3255			
Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Tyr	Lys	Pro	Ser	Gly
3260						3265					3270			
Ser	Thr	Lys	Met	Tyr	Tyr	Val	Pro	Gln	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Pro
3275						3280					3285			
Ser	Pro	Asp	Ser	Lys	Ser	Asp	Thr	Thr	Val	Glu	Ser	Ser	His	Ser
3290						3295					3300			

ES 2 714 355 T3

Gly	Ser	Asn	Asp	Ala	Ile	Ala	Pro	Asp	Phe	Pro	Ala	Gln	Val	Leu
3305						3310					3315			
Gly	Thr	Arg	Asp	Asp	Asp	Leu	Ser	Ala	Thr	Val	Asn	Ile	Lys	His
3320						3325					3330			
Lys	Glu	Gly	Ile	Tyr	Ser	Lys	Arg	Val	Val	Thr	Lys	Ala	Ser	Leu
3335						3340					3345			
Pro	Val	Gly	Glu	Lys	Pro	Leu	Gln	Asn	Glu	Asn	Ala	Asp	Ala	Ser
3350						3355					3360			
Val	Gln	Val	Leu	Ile	Thr	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ser	Asp	Lys	Lys
3365						3370					3375			
Gln	Gln	Glu	Ile	His	Ser	Thr	Arg	Ala	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Gln
3380						3385					3390			
Ala	Lys	Glu	Lys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Asp	Thr	Ala	Asp	Ser	Ser
3395						3400					3405			
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	His	Ser	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	Pro	Glu
3410						3415					3420			
Met	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Lys	Glu	Glu
3425						3430					3435			
Ile	His	Arg	Lys	Lys	Thr	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Trp	Pro	Asn	Asn
3440						3445					3450			
Lys	Glu	Ser	Leu	Gln	Ile	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	Glu	Cys	His	Ser
3455						3460					3465			
Glu	Phe	Glu	Asn	Thr	Thr	Arg	Ser	Val	Phe	Arg	Ser	Ala	Lys	Phe
3470						3475					3480			
Tyr	Ile	His	His	Pro	Val	His	Leu	Pro	Ser	Asp	Gln	Asp	Ile	Cys
3485						3490					3495			
His	Glu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ser	Val	Phe	Met	Arg	His	Ser	Trp	Lys
3500						3505					3510			
Asp	Phe	Phe	Gln	His	His	Pro	Asp	Lys	His	Arg	Glu	His	Met	Cys
3515						3520					3525			
Leu	Pro	Leu	Pro	Tyr	Gln	Asn	Met	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Tyr
3530						3535					3540			

ES 2 714 355 T3

Thr Arg 3545	Ile Lys Ser Leu Ser 3550	Ile Asn Val Asn Leu 3555	Gly Asn Lys
Glu Val 3560	Met Asp Thr Thr Lys 3565	Ser Gln Val Arg Asp 3570	Tyr Pro Lys
His Asn 3575	Gly Gln Ile Ser Asp 3580	Pro Gln Arg Asp Gln 3585	Lys Val Thr
Pro Glu 3590	Gln Thr Thr Gln His 3595	Thr Val Ser Leu Asn 3600	Glu Leu Trp
Asn Lys 3605	Tyr Arg Glu Arg Gln 3610	Arg Gln Gln Arg Gln 3615	Pro Glu Leu
Gly Asp 3620	Arg Lys Glu Leu Ser 3625	Leu Val Asp Arg Leu 3630	Asp Arg Leu
Ala Lys 3635	Ile Leu Gln Asn Pro 3640	Ile Thr His Ser Leu 3645	Gln Val Ser
Glu Ser 3650	Thr His Asp Asp Ser 3655	Arg Gly Glu Arg Ser 3660	Val Lys Glu
Trp Ser 3665	Gly Arg Gln Gln Gln 3670	Arg Asn Lys Leu Gln 3675	Lys Lys Lys
Arg Phe 3680	Lys Ser Leu Glu Lys 3685	Ser His Lys Asn Thr 3690	Gly Glu Leu
Lys Lys 3695	Ser Lys Val Leu Ser 3700	His His Arg Ala Gly 3705	Arg Ser Asn
Gln Ile 3710	Lys Ile Glu Gln Ile 3715	Lys Phe Asp Lys Tyr 3720	Ile Leu Ser
Lys Gln 3725	Pro Gly Phe Asn Tyr 3730	Ile Ser Asn Thr Ser 3735	Ser Asp Cys
Arg Pro 3740	Ser Glu Glu Ser Glu 3745	Leu Leu Thr Asp Thr 3750	Thr Thr Asn
Ile Leu 3755	Ser Gly Thr Thr Ser 3760	Thr Val Glu Ser Asp 3765	Ile Leu Thr
Gln Thr	Asp Arg Glu Val Ala	Leu His Glu Arg Ser	Ser Ser Val

ES 2 714 355 T3

3770		3775		3780
Ser Thr Ile Asp Thr Ala Arg	Leu Ile Gln Ala Phe	Gly His Glu		
3785	3790	3795		
Arg Val Cys Leu Ser Pro Arg	Arg Ile Lys Leu Tyr	Ser Ser Ile		
3800	3805	3810		
Thr Asn Gln Gln Arg Arg Tyr	Leu Glu Lys Arg Ser	Lys His Ser		
3815	3820	3825		
Lys Lys Val Leu Asn Thr Gly	His Pro Leu Val Thr	Ser Glu His		
3830	3835	3840		
Thr Arg Arg Arg His Ile Gln	Val Ala Asn His Val	Ile Ser Ser		
3845	3850	3855		
Asp Ser Ile Ser Ser Ser Ala	Ser Ser Phe Leu Ser	Ser Asn Ser		
3860	3865	3870		
Thr Phe Cys Asn Lys Gln Asn	Val His Met Leu Asn	Lys Gly Ile		
3875	3880	3885		
Gln Ala Gly Asn Leu Glu Ile	Val Asn Gly Ala Lys	Lys His Thr		
3890	3895	3900		
Arg Asp Val Gly Ile Thr Phe	Pro Thr Pro Ser Ser	Ser Glu Ala		
3905	3910	3915		
Lys Leu Glu Glu Asn Ser Asp	Val Thr Ser Trp Ser	Glu Glu Lys		
3920	3925	3930		
Arg Glu Glu Lys Met Leu Phe	Thr Gly Tyr Pro Glu	Asp Arg Lys		
3935	3940	3945		
Leu Lys Lys Asn Lys Lys Asn	Ser His Glu Gly Val	Ser Trp Phe		
3950	3955	3960		
Val Pro Val Glu Asn Val Glu	Ser Arg Ser Lys Lys	Glu Asn Val		
3965	3970	3975		
Pro Asn Thr Cys Gly Pro Gly	Ile Ser Trp Phe Glu	Pro Ile Thr		
3980	3985	3990		
Lys Thr Arg Pro Trp Arg Glu	Pro Leu Arg Glu Gln	Asn Cys Gln		
3995	4000	4005		

ES 2 714 355 T3

Gly Gln His Leu Asp Gly Arg Gly Tyr Leu Ala Gly Pro Gly Arg
4010 4015 4020

Glu Ala Gly Arg Asp Leu Leu Arg Pro Phe Val Arg Ala Thr Leu
4025 4030 4035

Gln Glu Ser Leu Gln Phe His Arg Pro Asp Phe Ile Ser Arg Ser
4040 4045 4050

Gly Glu Arg Ile Lys Arg Leu Lys Leu Ile Val Gln Glu Arg Lys
4055 4060 4065

Leu Gln Ser Met Leu Gln Thr Glu Arg Asp Ala Leu Phe Asn Ile
4070 4075 4080

Asp Arg Glu Arg Gln Gly His Gln Asn Arg Met Cys Pro Leu Pro
4085 4090 4095

Lys Arg Val Phe Leu Ala Ile Gln Lys Asn Lys Pro Ile Ser Lys
4100 4105 4110

Lys Glu Met Ile Gln Arg Ser Lys Arg Ile Tyr Glu Gln Leu Pro
4115 4120 4125

Glu Val Gln Lys Lys Arg Glu Glu Glu Lys Arg Lys Ser Glu Tyr
4130 4135 4140

Lys Ser Tyr Arg Leu Arg Ala Gln Leu Tyr Lys Lys Arg Val Thr
4145 4150 4155

Asn Gln Leu Leu Gly Arg Lys Val Pro Trp Asp
4160 4165

<210> 2

<211> 1298

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Glu Pro Pro Ser Cys Ile Gln Asp Glu Pro Phe Pro His Pro Leu
1 5 10 15

Glu Pro Glu Pro Gly Val Ser Ala Gln Pro Gly Pro Gly Lys Pro Ser
20 25 30

Asp Lys Arg Phe Arg Leu Trp Tyr Val Gly Gly Ser Cys Leu Asp His
35 40 45

10

ES 2 714 355 T3

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

ES 2 714 355 T3

Gly	Phe	Asp	Glu	Gln	Gln	Glu	Phe	Arg	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Val	Thr		305	310	315	320
Gly	Val	Gln	Arg	Arg	Val	His	Glu	Gly	Ser	Gln	Lys	Ser	Gln	Pro	Arg			325	330	335
Arg	Arg	His	Ala	Ser	Ala	Pro	Ser	His	Val	Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu			340	345	350
Lys	Asn	Arg	Thr	Met	Leu	Phe	Gln	Val	Gly	Arg	Phe	Glu	Ile	Asn	Leu		355	360	365	
Ile	Ser	Pro	Asp	Thr	Lys	Ser	Val	Val	Leu	Glu	Lys	Asn	Phe	Lys	Asp		370	375	380	
Ile	Ser	Ser	Cys	Ser	Gln	Gly	Ile	Lys	His	Val	Asp	His	Phe	Gly	Phe		385	390	395	400
Ile	Cys	Arg	Glu	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Leu	Ser	Gln	Tyr	Ile	Cys	Tyr			405	410	415
Val	Phe	Gln	Cys	Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Val	Asp	Glu	Val	Met	Leu	Thr			420	425	430
Leu	Lys	Gln	Ala	Phe	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Gln	Ser	Ala	Lys	Thr		435	440	445	
Gln	Ile	Lys	Leu	Cys	Glu	Ala	Cys	Pro	Met	His	Ser	Leu	His	Lys	Leu		450	455	460	
Cys	Glu	Arg	Ile	Glu	Gly	Leu	Tyr	Pro	Pro	Arg	Ala	Lys	Leu	Val	Ile		465	470	475	480
Gln	Arg	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Asp	Asn	Glu	Gln	Ala	Asp	Ile	Phe			485	490	495
Glu	Arg	Val	Gln	Lys	Met	Lys	Pro	Val	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Asn	Glu			500	505	510
Leu	Val	Ile	Leu	His	Leu	Arg	Gln	Leu	Cys	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Thr		515	520	525	
His	Val	His	Ile	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile		530	535	540	
Pro	Glu	Asn	Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Arg	Phe	Lys	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys		545	550	555	560

ES 2 714 355 T3

Asn Lys Ala Lys Arg Ser Leu Thr Ser Ser Leu Glu Asn Ile Phe Ser
 565 570 575

Arg Gly Ala Asn Arg Met Arg Gly Arg Leu Gly Ser Val Asp Ser Phe
 580 585 590

Glu Arg Ser Asn Ser Leu Ala Ser Glu Lys Asp Tyr Ser Pro Gly Asp
 595 600 605

Ser Pro Pro Gly Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gln
 610 615 620

Thr Phe Pro Glu Glu Asp Ser Asp Ser Pro Gln Phe Arg Arg Arg Ala
 625 630 635 640

His Thr Phe Ser His Pro Pro Ser Ser Thr Lys Arg Lys Leu Asn Leu
 645 650 655

Gln Asp Gly Arg Ala Gln Gly Val Arg Ser Pro Leu Leu Arg Gln Ser
 660 665 670

Ser Ser Glu Gln Cys Ser Asn Leu Ser Ser Val Arg Arg Met Tyr Lys
 675 680 685

Glu Ser Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Ser Leu His Thr Ser Phe Ser
 690 695 700

Ala Pro Ser Phe Thr Ala Pro Ser Phe Leu Lys Ser Phe Tyr Gln Asn
 705 710 715 720

Ser Gly Arg Leu Ser Pro Gln Tyr Glu Asn Glu Ile Arg Gln Asp Thr
 725 730 735

Ala Ser Glu Ser Ser Asp Gly Glu Gly Arg Lys Arg Thr Ser Ser Thr
 740 745 750

Cys Ser Asn Glu Ser Leu Ser Val Gly Gly Thr Ser Val Thr Pro Arg
 755 760 765

Arg Ile Ser Trp Arg Gln Arg Ile Phe Leu Arg Val Ala Ser Pro Met
 770 775 780

Asn Lys Ser Pro Ser Ala Met Gln Gln Gln Asp Gly Leu Asp Arg Asn
 785 790 795 800

Glu Leu Leu Pro Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Met Glu Glu Glu Pro

ES 2 714 355 T3

805										810					815				
Leu	Val	Val	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Pro	Glu	Lys	Ile	Glu	Glu				
			820					825					830						
Arg	Lys	Lys	Ser	Lys	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Trp	Arg	Lys	Ala	Ile	His				
		835					840					845							
Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Arg	Met	Glu	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Leu	Glu				
	850					855					860								
Ala	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	Tyr	Glu				
865					870					875					880				
Glu	Val	Gly	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Leu	Ile	Thr	Trp	Asp	Lys	Lys				
				885					890					895					
Leu	Leu	Asn	Cys	Arg	Ala	Lys	Ile	Arg	Cys	Asp	Met	Glu	Asp	Ile	His				
			900					905					910						
Thr	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Arg	Arg	Gly	Glu	Ile	Trp				
		915					920					925							
Gln	Phe	Leu	Ala	Leu	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Asn	Lys				
	930					935					940								
Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Ile	Ser	Tyr	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Thr				
945					950					955					960				
Ala	Gln	Gln	His	Ala	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro	Thr				
				965					970					975					
His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Val	Gln	Leu	Gly	Pro	Gly	Gln	Leu	Ser	Leu	Phe				
			980					985					990						
Asn	Leu	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Gly	Tyr	Cys				
		995					1000					1005							
Gln	Gly	Ile	Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	His	Met	Ser					
	1010					1015					1020								
Glu	Glu	Gln	Ala	Phe	Glu	Met	Leu	Lys	Phe	Leu	Met	Tyr	Asp	Leu					
	1025					1030					1035								
Gly	Phe	Arg	Lys	Gln	Tyr	Arg	Pro	Asp	Met	Met	Ser	Leu	Gln	Ile					
	1040					1045					1050								

ES 2 714 355 T3

Gln Met Tyr Gln Leu Ser Arg Leu Leu His Asp Tyr His Arg Asp
 1055 1060 1065
 Leu Tyr Asn His Leu Glu Glu Asn Glu Ile Ser Pro Ser Leu Tyr
 1070 1075 1080
 Ala Ala Pro Trp Phe Leu Thr Leu Phe Ala Ser Gln Phe Ser Leu
 1085 1090 1095
 Gly Phe Val Ala Arg Val Phe Asp Ile Ile Phe Leu Gln Gly Thr
 1100 1105 1110
 Glu Val Ile Phe Lys Val Ala Leu Ser Leu Leu Ser Ser Gln Glu
 1115 1120 1125
 Thr Leu Ile Met Glu Cys Glu Ser Phe Glu Asn Ile Val Glu Phe
 1130 1135 1140
 Leu Lys Asn Thr Leu Pro Asp Met Asn Thr Ser Glu Met Glu Lys
 1145 1150 1155
 Ile Ile Thr Gln Val Phe Glu Met Asp Ile Ser Lys Gln Leu His
 1160 1165 1170
 Ala Tyr Glu Val Glu Tyr His Val Leu Gln Asp Glu Leu Gln Glu
 1175 1180 1185
 Ser Ser Tyr Ser Cys Glu Asp Ser Glu Thr Leu Glu Lys Leu Glu
 1190 1195 1200
 Arg Ala Asn Ser Gln Leu Lys Arg Gln Asn Met Asp Leu Leu Glu
 1205 1210 1215
 Lys Leu Gln Val Ala His Thr Lys Ile Gln Ala Leu Glu Ser Asn
 1220 1225 1230
 Leu Glu Asn Leu Leu Thr Arg Glu Thr Lys Met Lys Ser Leu Ile
 1235 1240 1245
 Arg Thr Leu Glu Gln Glu Lys Met Ala Tyr Gln Lys Thr Val Glu
 1250 1255 1260
 Gln Leu Arg Lys Leu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Val Asn Cys Asp
 1265 1270 1275
 Leu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Cys Asn Pro Asn Asn Lys Ala Lys
 1280 1285 1290
 Ile Gly Asn Lys Pro
 1295

5 <210> 3
 <211> 1235
 <212> PRT

ES 2 714 355 T3

<213> homo sapiens

<400> 3

```

Met Glu Pro Pro Ser Cys Ile Gln Asp Glu Pro Phe Pro His Pro Leu
1          5          10          15

Glu Pro Glu Pro Gly Val Ser Ala Gln Pro Gly Pro Gly Lys Pro Ser
          20          25          30

Asp Lys Arg Phe Arg Leu Trp Tyr Val Gly Gly Ser Cys Leu Asp His
          35          40          45

Arg Thr Thr Leu Pro Met Leu Pro Trp Leu Met Ala Glu Ile Arg Arg
          50          55          60

Arg Ser Gln Lys Pro Glu Ala Gly Gly Cys Gly Ala Pro Ala Ala Arg
65          70          75          80

Glu Val Ile Leu Val Leu Ser Ala Pro Phe Leu Arg Cys Val Pro Ala
          85          90          95

Pro Gly Ala Gly Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Ser Ala Thr Gln Pro
          100          105          110

Asn Pro Ala Val Phe Ile Phe Glu His Lys Ala Gln His Ile Ser Arg
          115          120          125

Phe Ile His Asn Ser His Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ile Lys
          130          135          140

Ala Gln Pro Asp Asp Pro Glu Ser Gln Met Ala Cys His Val Phe Arg
          145          150          155          160

Ala Thr Asp Pro Ser Gln Val Pro Asp Val Ile Ser Ser Ile Arg Gln
          165          170          175

Leu Ser Lys Ala Ala Met Lys Glu Asp Ala Lys Pro Ser Lys Asp Asn
          180          185          190

Glu Asp Ala Phe Tyr Asn Ser Gln Lys Phe Glu Val Leu Tyr Cys Gly
          195          200          205

```

ES 2 714 355 T3

Lys Val Thr Val Thr His Lys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 210 215 220
 Cys Met Glu Lys Phe Ser Leu His Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ile Gln
 225 230 235 240
 Gly Glu Gln Arg Gly Pro Asp Pro Gly Glu Asp Leu Ala Asp Leu Glu
 245 250 255
 Val Val Val Pro Gly Ser Pro Gly Asp Cys Leu Pro Glu Glu Ala Asp
 260 265 270
 Gly Thr Asp Thr His Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Gln Pro Ala
 275 280 285
 Leu Thr Ser Ser Arg Val Cys Phe Pro Glu Arg Ile Leu Glu Asp Ser
 290 295 300
 Gly Phe Asp Glu Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg Cys Ser Ser Val Thr
 305 310 315 320
 Gly Val Gln Arg Arg Val His Glu Gly Ser Gln Lys Ser Gln Pro Arg
 325 330 335
 Arg Arg His Ala Ser Ala Pro Ser His Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu
 340 345 350
 Lys Asn Arg Thr Met Leu Phe Gln Val Gly Arg Phe Glu Ile Asn Leu
 355 360 365
 Ile Ser Pro Asp Thr Lys Ser Val Val Leu Glu Lys Asn Phe Lys Asp
 370 375 380
 Ile Ser Ser Cys Ser Gln Gly Ile Lys His Val Asp His Phe Gly Phe
 385 390 395 400
 Ile Cys Arg Glu Ser Pro Glu Pro Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Cys Tyr
 405 410 415
 Val Phe Gln Cys Ala Ser Glu Ser Leu Val Asp Glu Val Met Leu Thr
 420 425 430
 Leu Lys Gln Ala Phe Ser Thr Ala Ala Ala Leu Gln Ser Ala Lys Thr
 435 440 445
 Gln Ile Lys Leu Cys Glu Ala Cys Pro Met His Ser Leu His Lys Leu
 450 455 460

ES 2 714 355 T3

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

ES 2 714 355 T3

705		710		715		720									
Met	Asn	Lys	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Gln	Gln	Gln	Asp	Gly	Leu	Asp	Arg
				725					730					735	
Asn	Glu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Pro	Thr	Met	Glu	Glu	Glu
				740				745					750		
Pro	Leu	Val	Val	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Pro	Glu	Lys	Ile	Glu
				755			760					765			
Glu	Arg	Lys	Lys	Ser	Lys	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Trp	Arg	Lys	Ala	Ile
	770					775					780				
His	Gln	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Arg	Met	Glu	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Leu
785					790					795					800
Glu	Ala	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	Tyr
				805					810					815	
Glu	Glu	Val	Gly	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Leu	Ile	Thr	Trp	Asp	Lys
			820					825					830		
Lys	Leu	Leu	Asn	Cys	Arg	Ala	Lys	Ile	Arg	Cys	Asp	Met	Glu	Asp	Ile
			835				840					845			
His	Thr	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Arg	Arg	Gly	Glu	Ile
	850					855					860				
Trp	Gln	Phe	Leu	Ala	Leu	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	His	Arg	Leu	Pro	Asn
865					870					875					880
Lys	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Ile	Ser	Tyr	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu
				885					890					895	
Thr	Ala	Gln	Gln	His	Ala	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro
			900					905					910		
Thr	His	Pro	Tyr	Phe	Ser	Val	Gln	Leu	Gly	Pro	Gly	Gln	Leu	Ser	Leu
		915					920					925			
Phe	Asn	Leu	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Gly	Tyr
	930					935					940				
Cys	Gln	Gly	Ile	Ser	Phe	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	His	Met	Ser
945					950					955					960

ES 2 714 355 T3

Glu	Glu	Gln	Ala	Phe	Glu	Met	Leu	Lys	Phe	Leu	Met	Tyr	Asp	Leu	Gly	965	970	975
Phe	Arg	Lys	Gln	Tyr	Arg	Pro	Asp	Met	Met	Ser	Leu	Gln	Ile	Gln	Met	980	985	990
Tyr	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Asp	Tyr	His	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asn	995	1000	1005
His	Leu	Glu	Glu	Asn	Glu	Ile	Ser	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro		1010	1015	1020
Trp	Phe	Leu	Thr	Leu	Phe	Ala	Ser	Gln	Phe	Ser	Leu	Gly	Phe	Val		1025	1030	1035
Ala	Arg	Val	Phe	Asp	Ile	Ile	Phe	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Val	Ile		1040	1045	1050
Phe	Lys	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Gln	Glu	Thr	Leu	Ile		1055	1060	1065
Met	Glu	Cys	Glu	Ser	Phe	Glu	Asn	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn		1070	1075	1080
Thr	Leu	Pro	Asp	Met	Asn	Thr	Ser	Glu	Met	Glu	Lys	Ile	Ile	Thr		1085	1090	1095
Gln	Val	Phe	Glu	Met	Asp	Ile	Ser	Lys	Gln	Leu	His	Ala	Tyr	Glu		1100	1105	1110
Val	Glu	Tyr	His	Val	Leu	Gln	Asp	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Ser	Tyr		1115	1120	1125
Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Arg	Ala	Asn		1130	1135	1140
Ser	Gln	Leu	Lys	Arg	Gln	Asn	Met	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln		1145	1150	1155
Val	Ala	His	Thr	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Glu	Ser	Asn	Leu	Glu	Asn		1160	1165	1170
Leu	Leu	Thr	Arg	Glu	Thr	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu		1175	1180	1185
Glu	Gln	Glu	Lys	Met	Ala	Tyr	Gln	Lys	Thr	Val	Glu	Gln	Leu	Arg		1190	1195	1200

ES 2 714 355 T3

Lys Leu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Val Asn Cys Asp Leu Leu Leu
1205 1210 1215

Arg Asp Leu Asn Cys Asn Pro Asn Asn Lys Ala Lys Ile Gly Asn
1220 1225 1230

Lys Pro
1235

5 <210> 4
<211> 672
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4
Met Ala Asp Val Phe Pro Gly Asn Asp Ser Thr Ala Ser Gln Asp Val
1 5 10 15

Ala Asn Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His
20 25 30

Glu Val Lys Asp His Lys Phe Ile Ala Arg Phe Phe Lys Gln Pro Thr
35 40 45

Phe Cys Ser His Cys Thr Asp Phe Ile Trp Gly Phe Gly Lys Gln Gly
50 55 60

Phe Gln Cys Gln Val Cys Cys Phe Val Val His Lys Arg Cys His Glu
65 70 75 80

Phe Val Thr Phe Ser Cys Pro Gly Ala Asp Lys Gly Pro Asp Thr Asp
85 90 95

Asp Pro Arg Ser Lys His Lys Phe Lys Ile His Thr Tyr Gly Ser Pro
100 105 110

Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser Leu Leu Tyr Gly Leu Ile His Gln
115 120 125

Gly Met Lys Cys Asp Thr Cys Asp Met Asn Val His Lys Gln Cys Val
130 135 140

Ile Asn Val Pro Ser Leu Cys Gly Met Asp His Thr Glu Lys Arg Gly
145 150 155 160

10 Arg Ile Tyr Leu Lys Ala Glu Val Ala Asp Glu Lys Leu His Val Thr
165 170 175

ES 2 714 355 T3

Val	Arg	Asp	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Pro	Met	Asp	Pro	Asn	Gly	Leu	Ser		
			180					185					190				
Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Pro	Asp	Pro	Lys	Asn	Glu	Ser		
		195					200					205					
Lys	Gln	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Asn	Pro	Gln	Trp	Asn		
	210					215					220						
Glu	Ser	Phe	Thr	Phe	Lys	Leu	Lys	Pro	Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Arg	Leu		
225					230					235					240		
Ser	Val	Glu	Ile	Trp	Asp	Trp	Asp	Arg	Thr	Thr	Arg	Asn	Asp	Phe	Met		
				245					250					255			
Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Gly	Val	Ser	Glu	Leu	Met	Lys	Met	Pro	Ala	Ser		
			260					265					270				
Gly	Trp	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Gln	Glu	Glu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Asn	Val		
		275					280					285					
Pro	Ile	Pro	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Gly	Asn	Met	Glu	Leu	Arg	Gln	Lys		
	290					295					300						
Phe	Glu	Lys	Ala	Lys	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Asn	Lys	Val	Ile	Ser	Pro		
305					310					315					320		
Ser	Glu	Asp	Arg	Lys	Gln	Pro	Ser	Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Val	Lys	Leu		
				325					330					335			
Thr	Asp	Phe	Asn	Phe	Leu	Met	Val	Leu	Gly	Lys	Gly	Ser	Phe	Gly	Lys		
			340					345					350				
Val	Met	Leu	Ala	Asp	Arg	Lys	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Tyr	Ala	Ile	Lys		
		355					360					365					
Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Cys	Thr		
	370					375					380						
Met	Val	Glu	Lys	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Lys	Pro	Pro	Phe	Leu		
385					390					395					400		
Thr	Gln	Leu	His	Ser	Cys	Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Arg	Leu	Tyr	Phe	Val		
				405					410					415			
Met	Glu	Tyr	Val	Asn	Gly	Gly	Asp	Leu	Met	Tyr	His	Ile	Gln	Gln	Val		
			420					425					430				

ES 2 714 355 T3

Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ser
435 440 445

Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu
450 455 460

Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala
465 470 475 480

Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg
485 490 495

Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala Tyr
500 505 510

Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu Leu
515 520 525

Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu Asp
530 535 540

Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ser Tyr Pro Lys Ser
545 550 555 560

Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His
565 570 575

Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val Arg
580 585 590

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

Glu Ile Gln Pro Pro Phe Lys Pro Lys Val Cys Gly Lys Gly Ala Glu
610 615 620

Asn Phe Asp Lys Phe Phe Thr Arg Gly Gln Pro Val Leu Thr Pro Pro
625 630 635 640

Asp Gln Leu Val Ile Ala Asn Ile Asp Gln Ser Asp Phe Glu Gly Phe
645 650 655

Ser Tyr Val Asn Pro Gln Phe Val His Pro Ile Leu Gln Ser Ala Val
660 665 670

<210> 5
<211> 17
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> Péptido 1

<400> 5

Leu Asp Ser Asp Ser His Tyr Gly Pro Gln His Leu Glu Ser Ile Asp
1 5 10 15

Asp

<210> 6

<211> 9

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 2

10

<400> 6

Asp Ser His Gln Thr Glu Glu Thr Leu

1

5

<210> 7

15 <211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido 3

<400> 7

Gln Gln Thr Leu Pro Glu Ser His Leu Pro

1

5

10

25 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido 4

<400> 8

Gln Ala Leu Leu Asp Ser His Leu Pro Glu

1

5

10

35

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40

<220>

<223> Péptido 5

<400> 9

Pro Ala Asp Gln Met Thr Asp Thr Pro

45 1

5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

50 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 6

55

<400> 10

His Ile Pro Glu Glu Ala Gln Lys Val Ser Ala Val

1

5

10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido 7
 <400> 11
 Ser Cys Ile Phe Leu Glu Gln
 10 1 5
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 12
 acaacttttc atggctccag t 21
 <210> 13
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 13
 ttggctcaga gacagttgaa a 21
 <210> 14
 35 <211> 337
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Dominio PKC-alfa
 <400> 14

ES 2 714 355 T3

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

ES 2 714 355 T3

Ser Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys
225 230 235 240

His Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val
245 250 255

Arg Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn
260 265 270

Arg Glu Ile Gln Pro Pro Phe Lys Pro Lys Val Cys Gly Lys Gly Ala
275 280 285

Glu Asn Phe Asp Lys Phe Phe Thr Arg Gly Gln Pro Val Leu Thr Pro
290 295 300

Pro Asp Gln Leu Val Ile Ala Asn Ile Asp Gln Ser Asp Phe Glu Gly
305 310 315 320

Phe Ser Tyr Val Asn Pro Gln Phe Val His Pro Ile Leu Gln Ser Ala
325 330 335

Val

<210> 15

<211> 1014

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Dominio PCKalfa

10

<400> 15

ctcacggact tcaatttcct catggtgttg ggaaagggga gttttggaaa ggtgatgctt	60
gccgacagga agggcacaga agaactgtat gcaatcaaaa tcctgaagaa ggatgtggtg	120
attcaggatg atgacgtgga gtgcaccatg gtagaaaagc gagtcttggc cctgcttgac	180
aaacccccgt tcttgacgca gctgcactcc tgcttcaga cagtggatcg gctgtacttc	240
gtcatggaat atgtcaacgg tggggacctc atgtaccaca ttcagcaagt aggaaaattt	300
aaggaaccac aagcagtatt ctatgcggca gagatttcca tcggattgtt ctttcttcat	360
aaaagaggaa tcatttatag ggatctgaag ttagataacg tcatgttgga ttcagaagga	420
catatcaaaa ttgctgactt tgggatgtgc aaggaacaca tgatggatgg agtcacgacc	480
aggaccttct gtgggactcc agattatatc gcccagaga taatcgctta tcagccgtat	540
ggaaaatctg tggactggtg ggcctatggc gtcctgttgt atgaaatgct tgccgggcag	600

ES 2 714 355 T3

	cctccatttg atggtgaaga tgaagacgag ctatttcagt ctatcatgga gcacaacgtt	660
	tcctatccaa aatccttgtc caaggaggct gtttctatct gcaaaggact gatgaccaa	720
	cacccagcca agcggctggg ctgtgggcct gagggggaga gggacgtgag agagcatgcc	780
	ttcttccgga ggatcgactg ggaaaaactg gagaacaggg agatccagcc accattcaag	840
	cccaaagtgt gtggcaaagg agcagagaac ttgacaagt tcttcacacg aggacagccc	900
	gtcttaacac cacctgatca gctgggttatt gctaacatag accagtctga ttttgaagg	960
	ttctcgtatg tcaaccccca gtttgtgcac cccatcttac agagtgcagt atga	1014
5	<210> 16 <211> 64 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 16 gtacgaattc gccaccatgg attacaagga tgacgacgat aagctcacgg acttcaattt	60
	cctc	64
15	<210> 17 <211> 34 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 17 tagcgatcc tcatactgca ctctgtaaga tggg	34

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que evita la unión de α PKC (Proteína Cinasa C tipo alfa) a ALMS1 (proteína 1 del síndrome de Alström) para su uso en el tratamiento o retraso de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.
- 5 2. La molécula para su uso según la reivindicación 1, en donde la molécula es para su uso en el tratamiento o retardo de la evolución o aparición de la diabetes mellitus tipo 2.
3. La molécula para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la molécula no interfiere con la unión de TBC1D4 a ALMS1.
- 10 4. La molécula para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula se selecciona del grupo que consiste en péptidos o polipéptidos o peptidomiméticos, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, aptámeros, Spiegelmers y compuestos químicos.
5. La molécula para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula es un péptido de menos de 50 aminoácidos, preferiblemente de menos de 20 aminoácidos.
- 15 6. La molécula para su uso según la reivindicación 5, en donde la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 (SEC. ID. n° 1).
7. La molécula para su uso según la reivindicación 6, en donde la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de ALMS1 que incluye uno o varios de los restos que se prevé que median en la interacción con α PKC, en particular uno o varios de los restos seleccionados en la lista que consiste en E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 y E2884.
- 20 8. La molécula para su uso según la reivindicación 6 o 7, en donde la molécula es un péptido que comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:
 - LDSDSHYGPQHLESIDD (SEC ID. n° 5);
 - DSHQTEETL (SEC ID. n° 6);
 - 25 - QQTLPEHLP (SEC ID. n° 7);
 - QALLDSHLPE (SEC ID. n° 8);
 - PADQMTDTP (SEC ID. n° 9);
 - HIPEEAQKVS AV (SEC ID. n° 10);
 - SCIFLEQ (SEC ID. n° 11), y
 - 30 - un fragmento de la misma que comprende 6 aminoácidos contiguos.
9. La molécula para su uso según la reivindicación 5, en donde la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC (SEC ID. n° 4).
10. La molécula para su uso según la reivindicación 9, en donde la molécula es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento de α PKC que incluye uno o varios de los restos que se prevé que median en la interacción con ALMS1, en concreto uno o varios de los restos seleccionados en la lista que consiste en F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 e I667.
- 35 11. Un método *in vitro* o *ex vivo* para identificar moléculas adecuadas para su uso en el tratamiento o retardo de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia, en donde se ensaya la capacidad de la molécula para evitar la unión de α PKC a ALMS1 y se seleccionan las moléculas capaces de evitar esta unión.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende además una etapa en la que se prueba la capacidad de la molécula seleccionada para interferir con la unión de TBC1D4 a ALMS1 y en donde se seleccionan las moléculas que no interfieren.
- 45 13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la unión se determina en un sistema celular sensible a la insulina.
14. El método de la reivindicación 11 a 13, en donde la unión se determina en presencia y/o ausencia de insulina.

15. Una molécula como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 y 10 para su uso como fármaco.

16. Una molécula que aumenta la expresión de ALMS1 o que mejora la unión de TBC1D4 a ALMS1 para su uso en el tratamiento o retardo de la evolución o aparición de diabetes mellitus, resistencia a la insulina, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, hiperglucemia, obesidad e hiperinsulinemia.

FIGURA 1

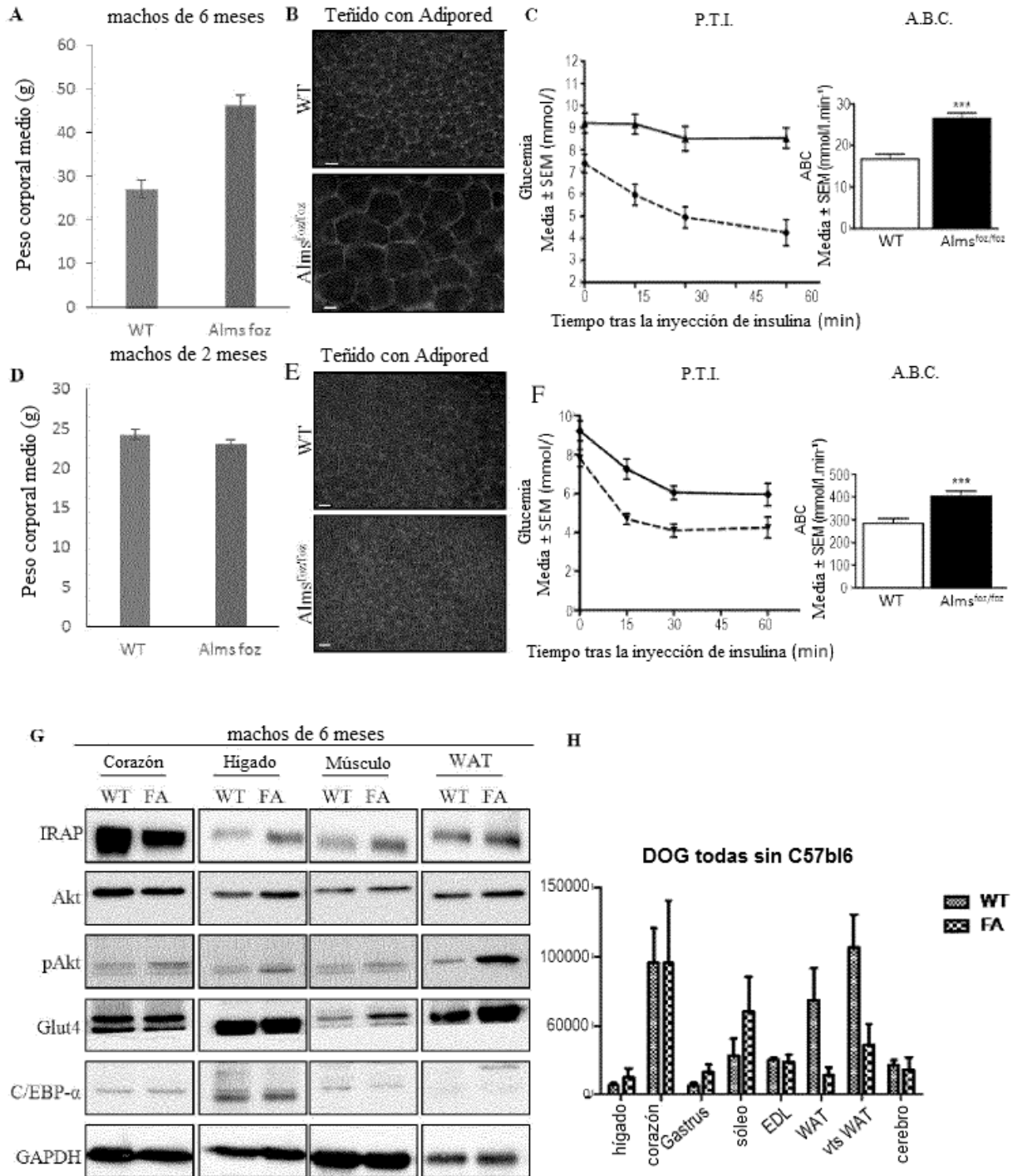


FIGURA 2

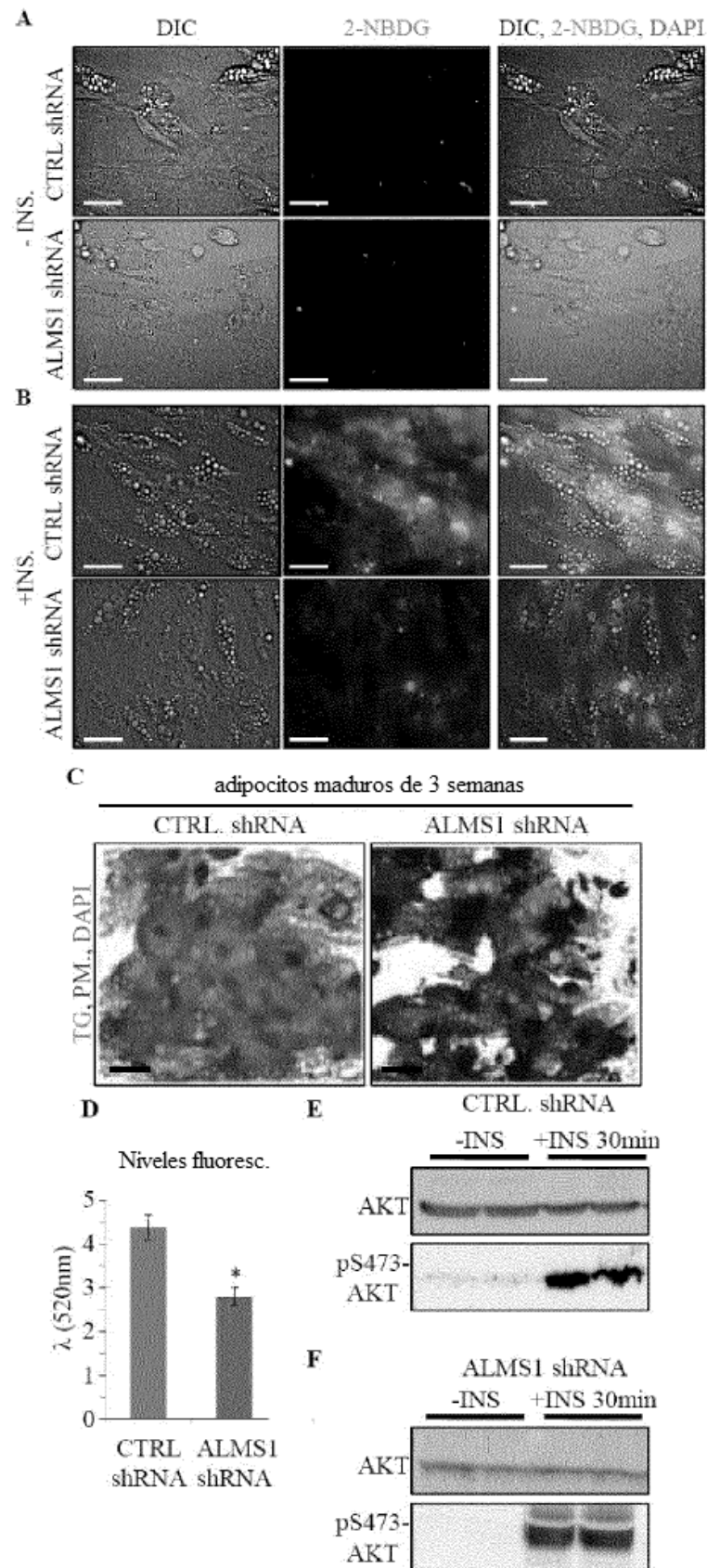


FIGURA 2 (continuación)

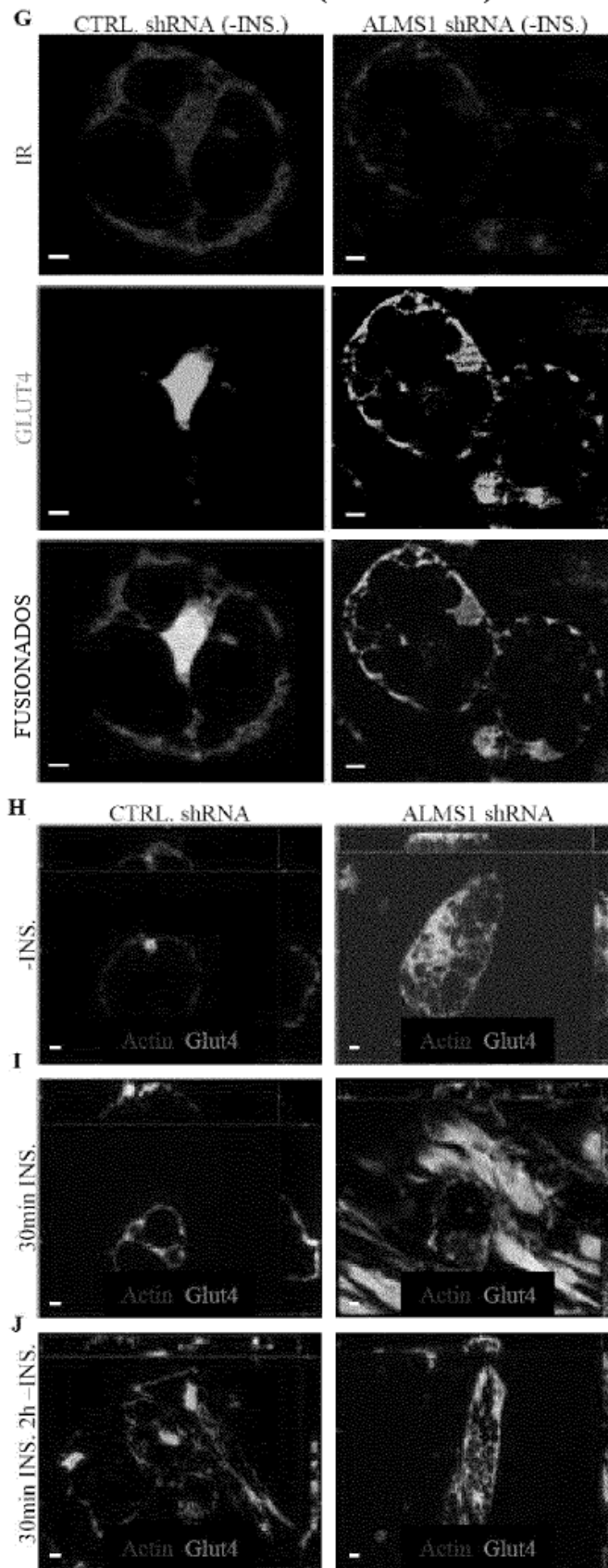
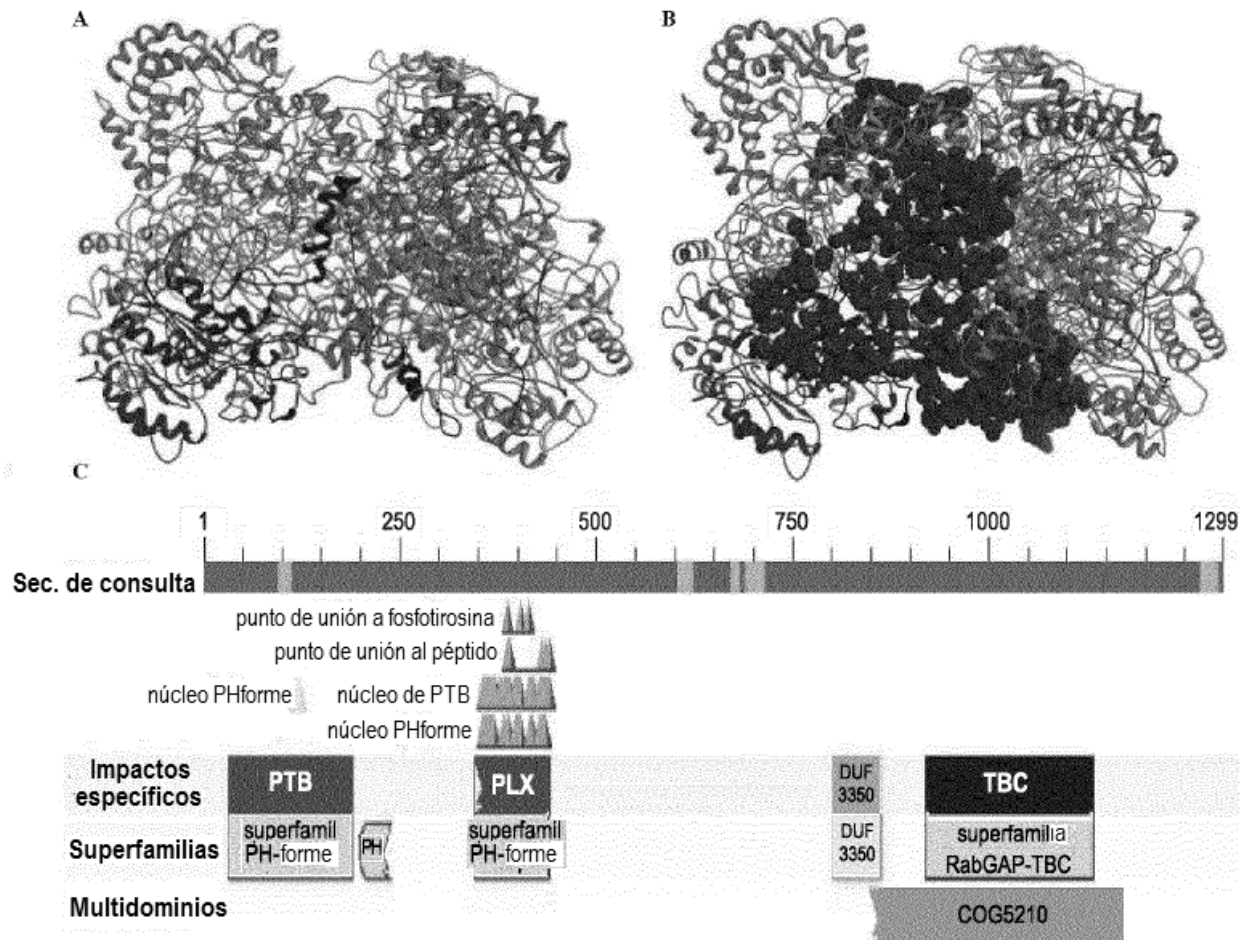


FIGURA 3



D

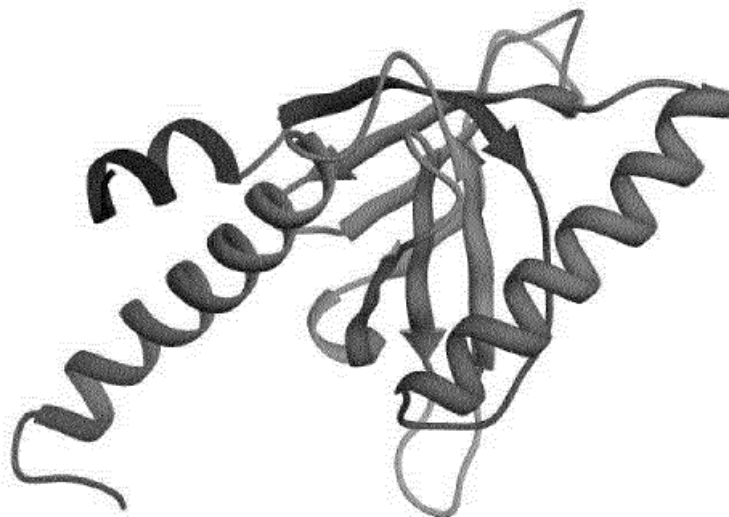
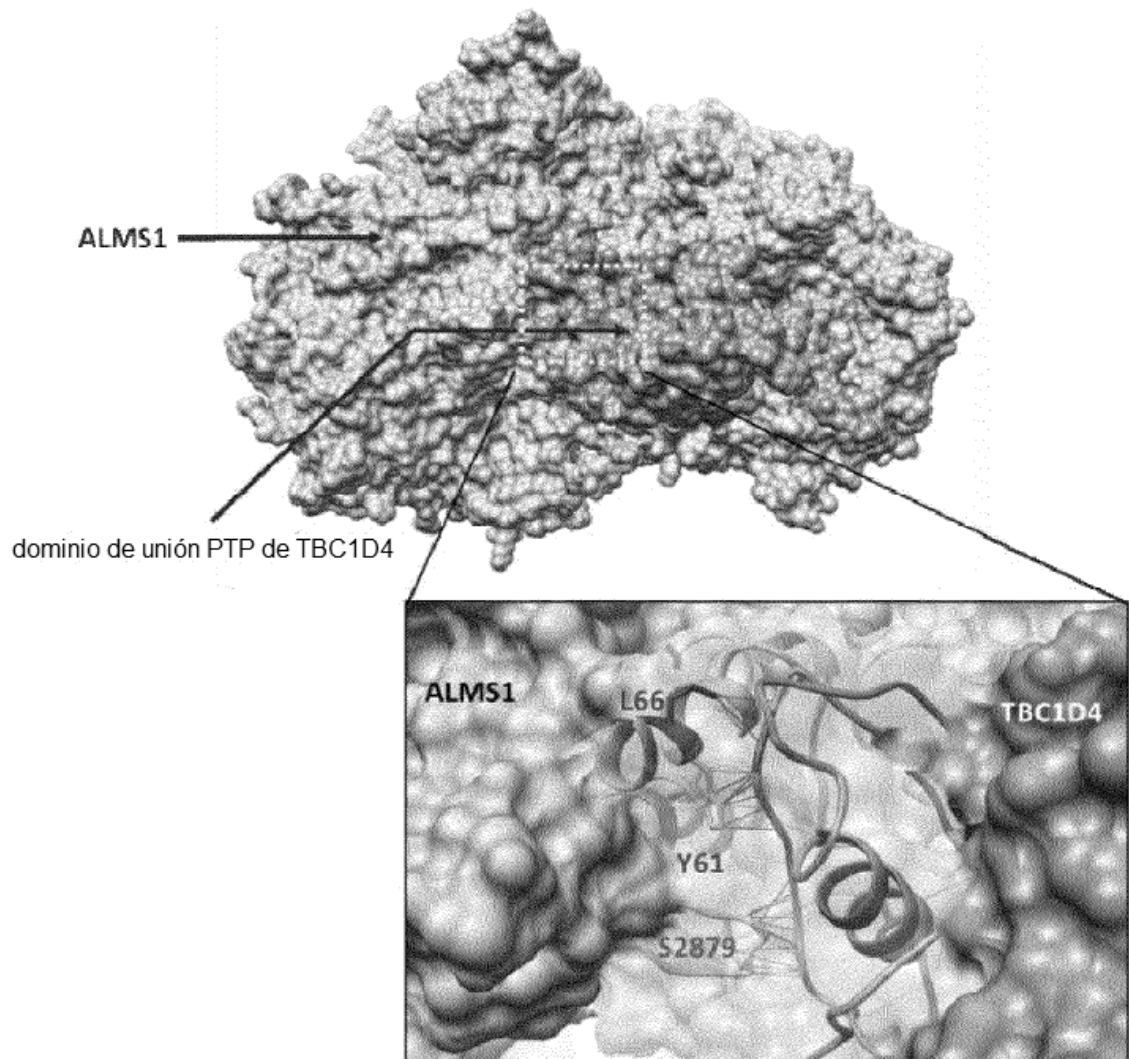


FIGURA 4

A



B Adipocito maduro (imagen 3D)

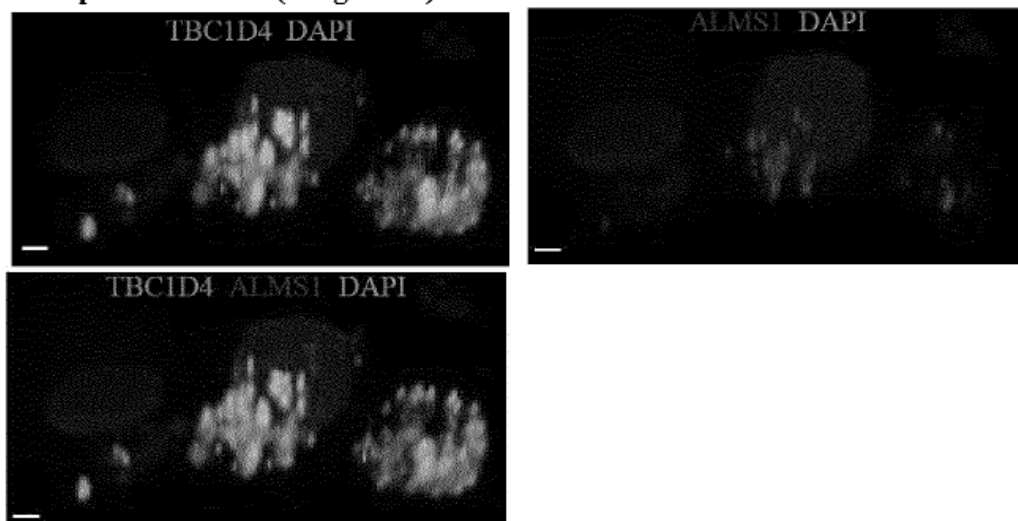


FIGURA 4 (continuación)

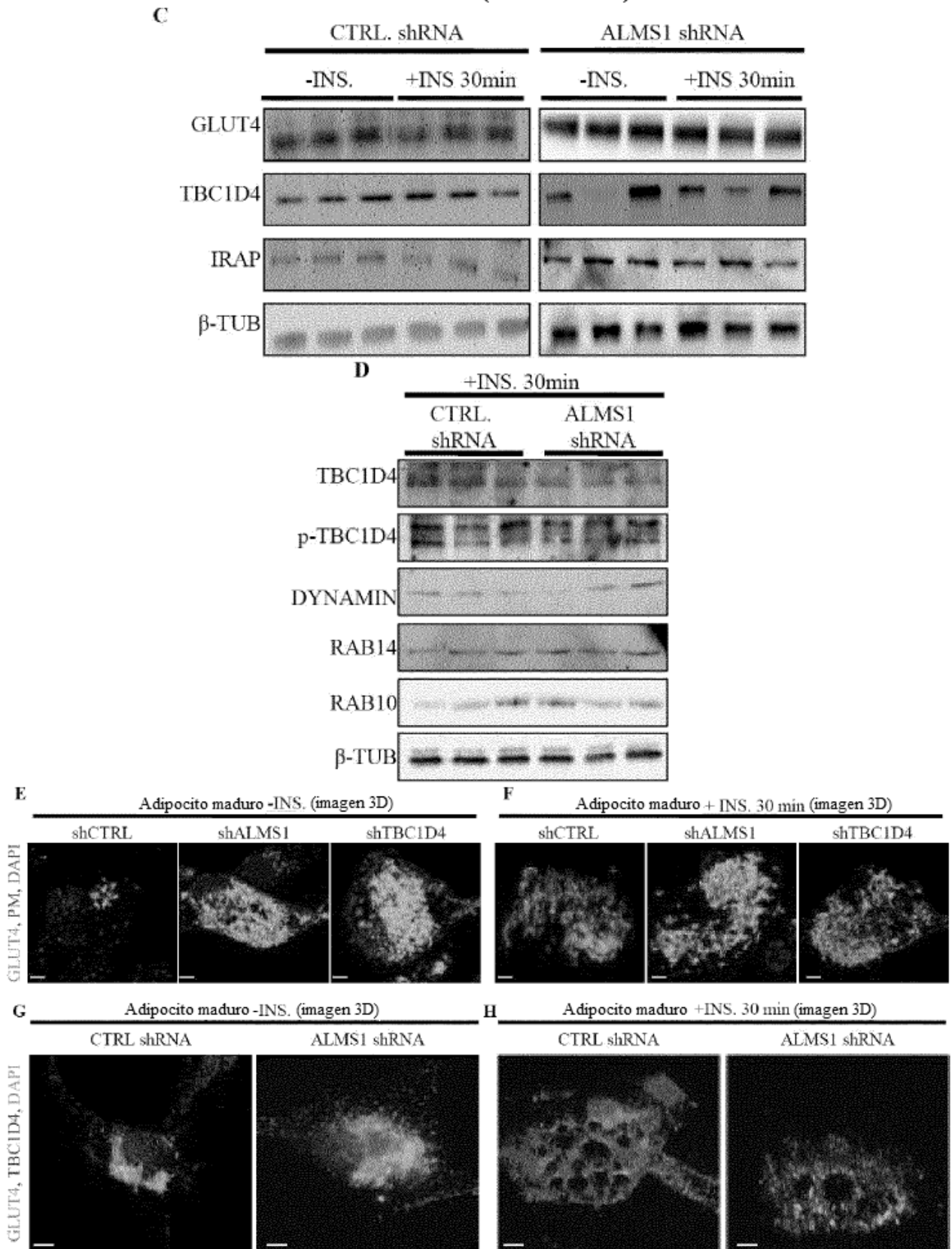


FIGURA 5

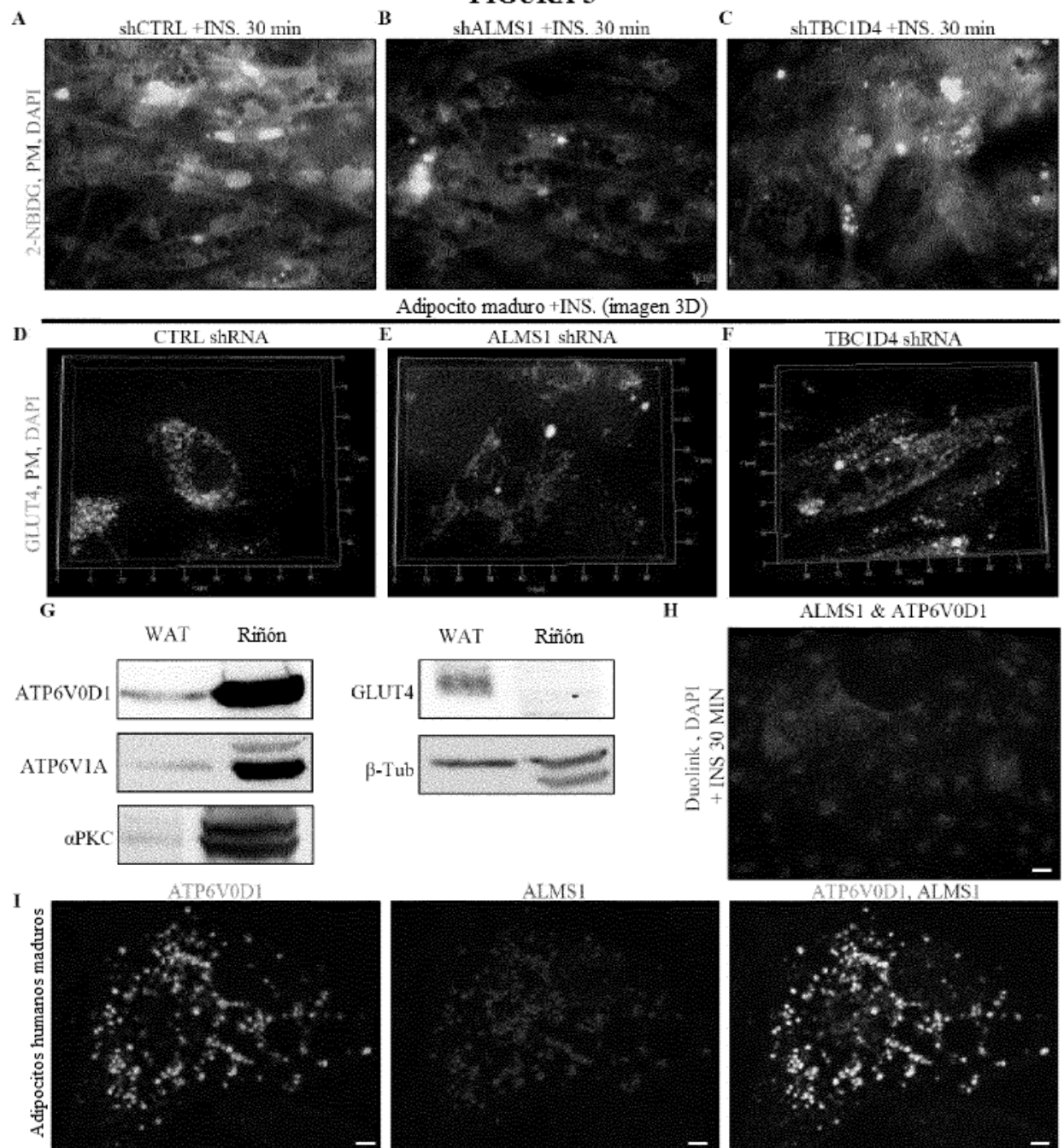
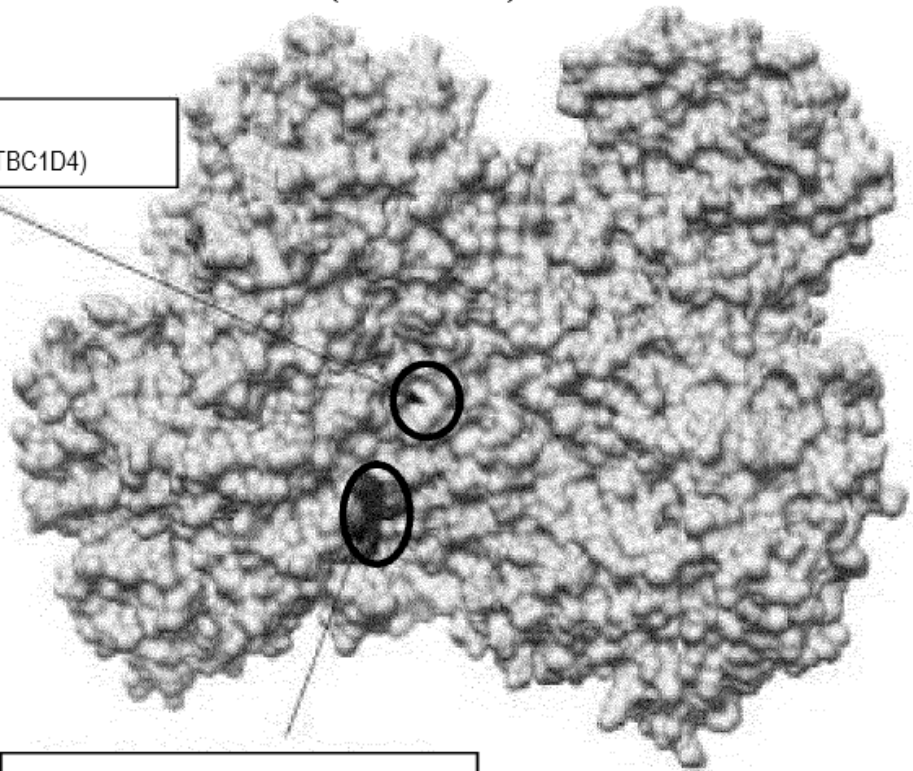


FIGURA 5 (continuación)

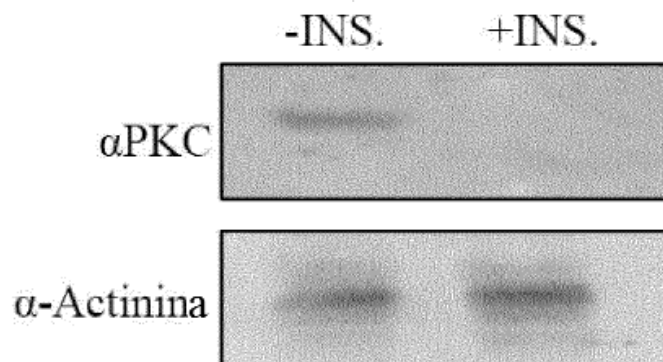
J

motivo de unión para PKC
(~20Å apartado del punto TBC1D4)



Punto de unión a TBC1D4 predicho

K



L

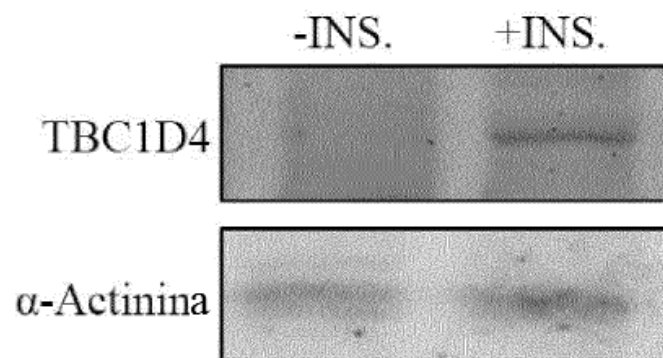


FIGURA 6

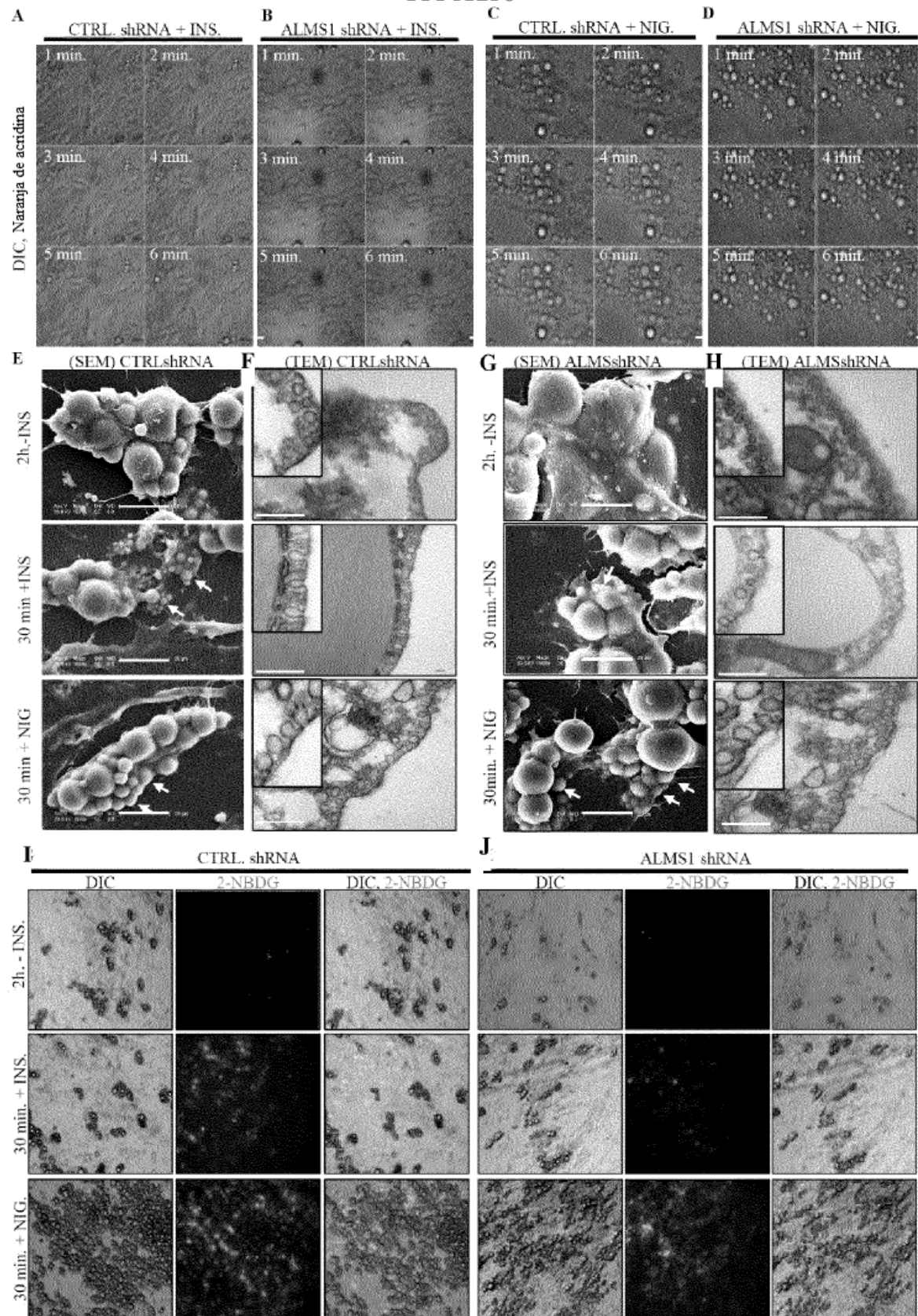


FIGURA 7

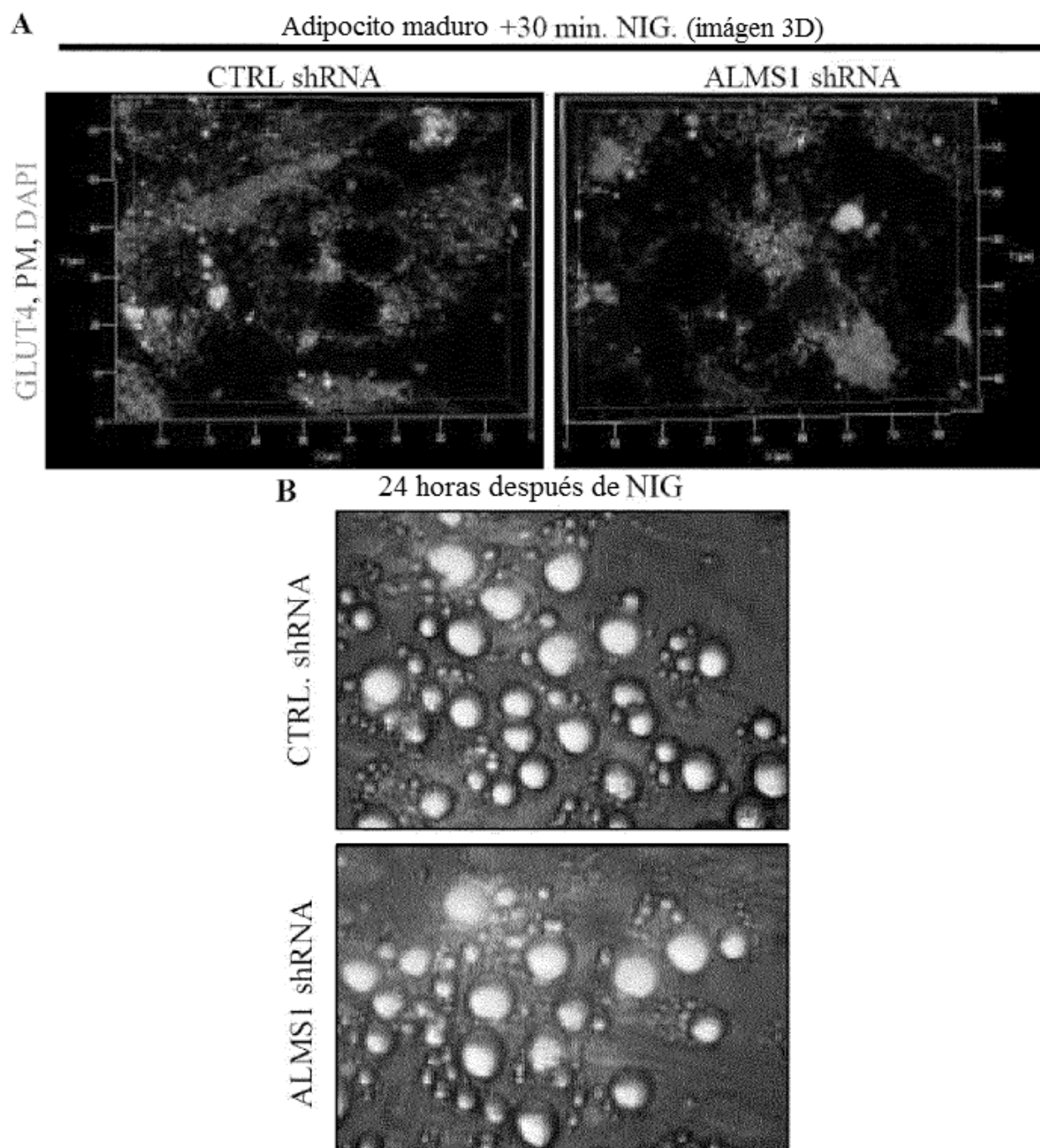
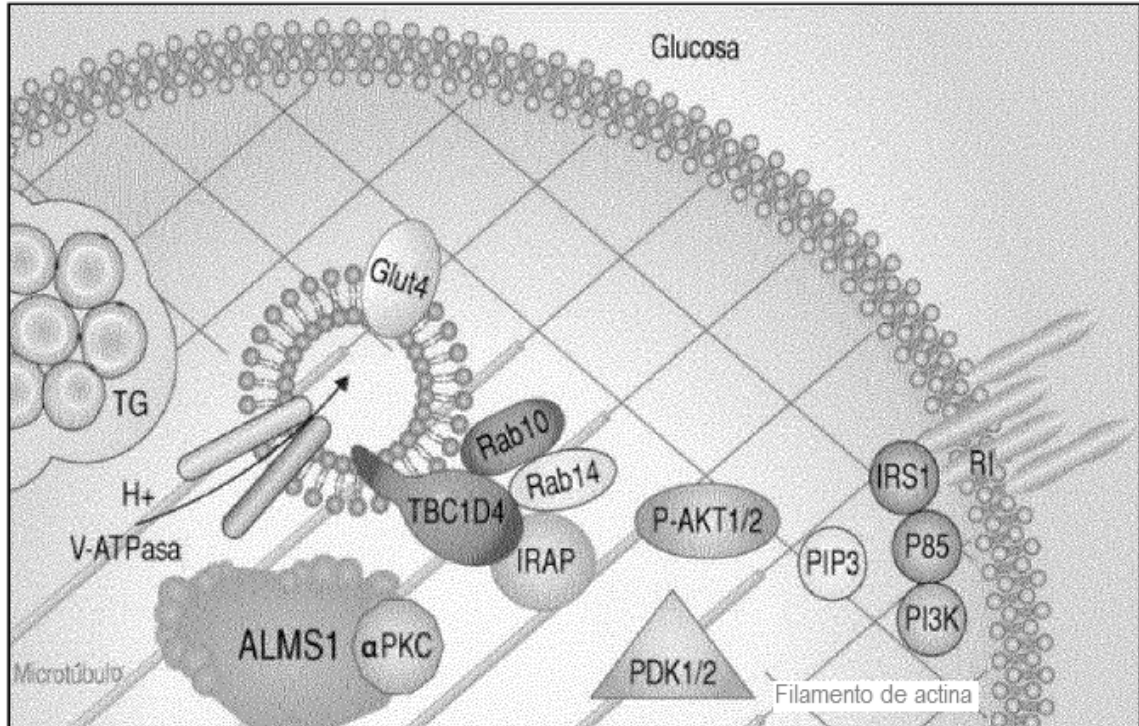


FIGURA 7 (continuación)

En ausencia de insulina



D

En presencia de insulina

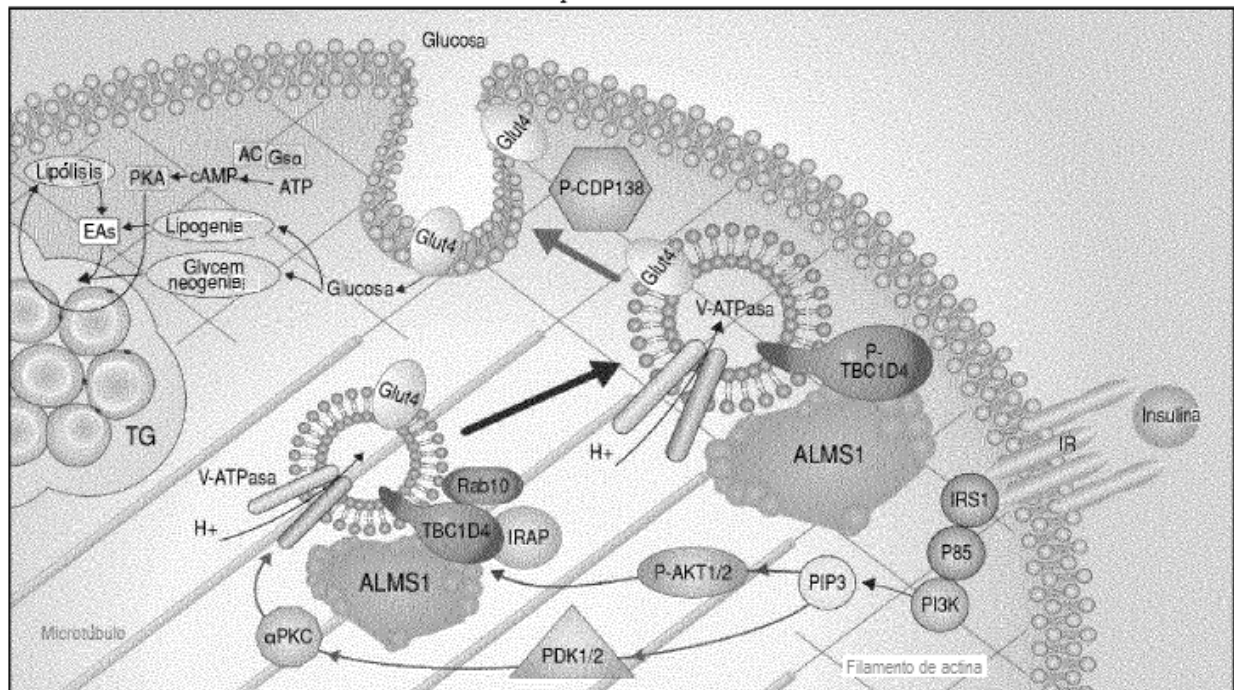


FIGURA 8A

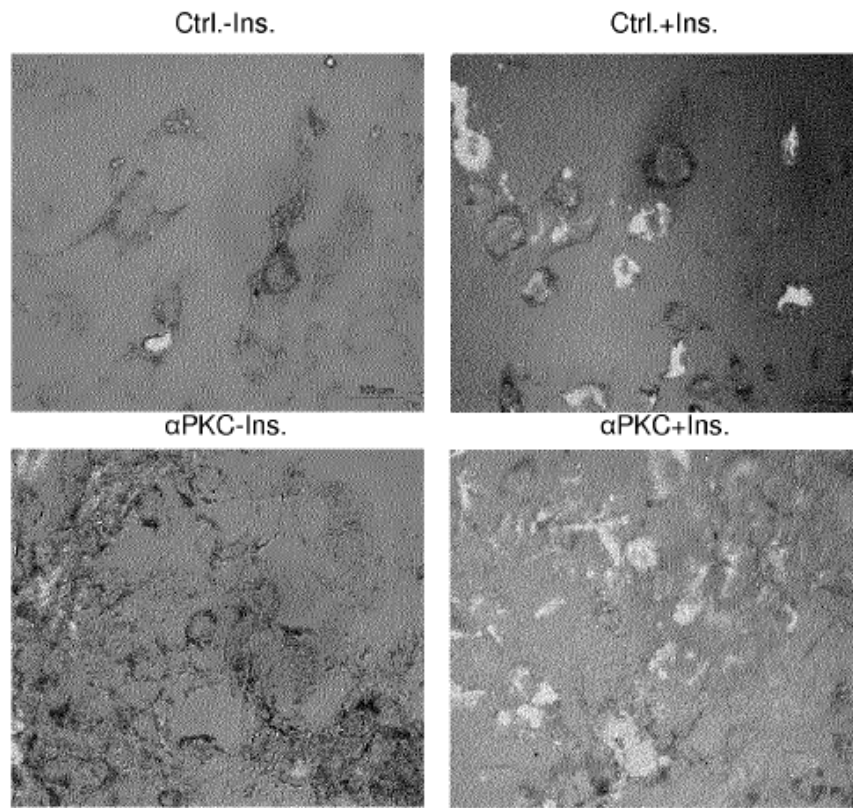


FIGURA 8B

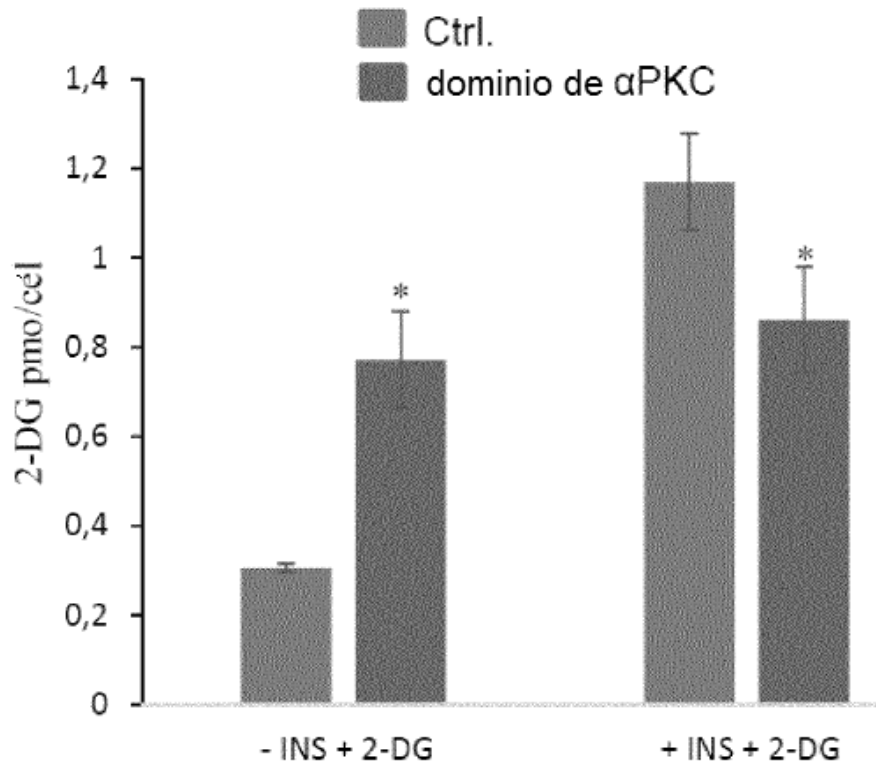


FIGURA 9

DAPI, dominio Flag-Tag- α PKC

adipocito maduro

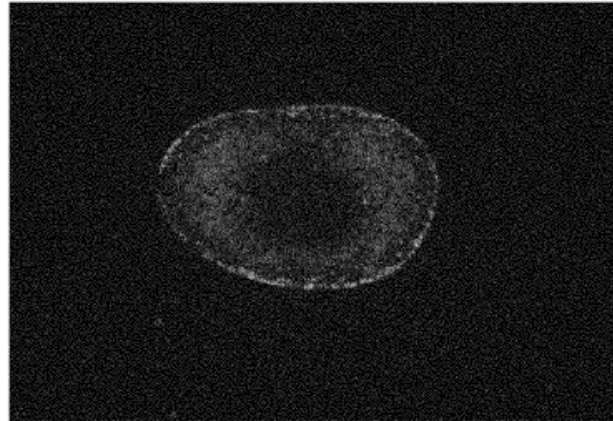
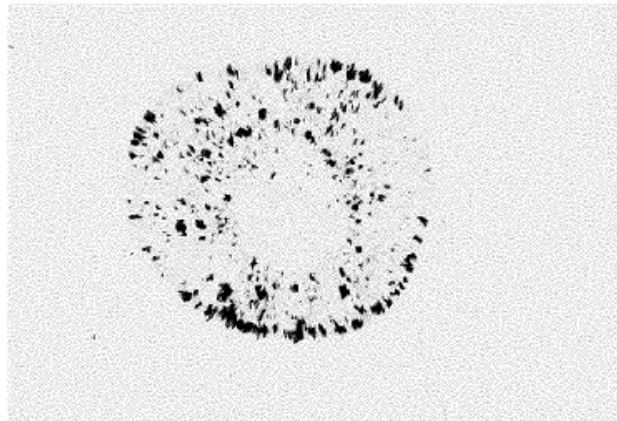


imagen 3D

DAPI



DAPI,
dominio Flag-Tag- α PKC

