



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 694**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05776018 .3**
96 Fecha de presentación : **19.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1774340**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Factor 1 promotor de la insulina como elemento de referencia/marcador de la insuficiencia de células beta.**

30 Prioridad: **28.07.2004 EP 04103611**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Christ, Andreas;**
Evers, Stefan;
Krapfenbauer, Kurt y
Sebokova, Elena

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Factor 1 promotor de la insulina como elemento de referencia/marcador de la insuficiencia de células beta.

5 La diabetes tipo 2 es una enfermedad que tiene cada día mayor importancia en el mundo entero y se puede describir como una insuficiencia de células beta pancreáticas (insuficiencia de células beta) para compensar la resistencia periférica a la insulina con una secreción superior de insulina por parte de las células beta. Esta insuficiencia se explica tanto por una pérdida relativa de la masa de células beta así como por unos defectos secretores que incluyen una secreción incrementada de la insulina basal por parte de las células beta y una pérdida selectiva de sensibilidad frente a la
10 insulina principalmente en el músculo esquelético pero también en otros órganos. Se cree que la pérdida de la función de las células beta es provocada por una exposición durante tiempo a elevados niveles de glucosa y lípidos (gluco- y lipotoxicidad).

15 Actualmente no existe un tratamiento comprobado clínicamente que haya podido prevenir o retardar la insuficiencia de las células beta en unas condiciones de lipo/glucotoxicidad. También sería útil identificar mejores grupos de referencia para el tratamiento y marcadores para la detección de la insuficiencia o función de las células beta, que sean más sensibles o más fiables que los marcadores frecuentemente utilizados, como la insulina, proinsulina o péptidos C.

20 Además sería una ventaja identificar los marcadores que pueden ser detectados en plasma.

Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención consiste en identificar y aportar un método nuevo para cribar o detectar compuestos que impidan, atenúen o inhiban la insuficiencia de células beta y un marcador para el diagnóstico de la insuficiencia de células beta en una etapa prematura de la diabetes tipo II y todo ello con mayor fiabilidad que la conocida actualmente.

30 Sorprendentemente, se descubrió que el uso de la proteína IPF-1 puede solventar, al menos en parte, los problemas conocidos de la tecnología actual.

El factor 1 promotor de la insulina (IPF-1) es un factor de transcripción que contiene un homeodominio, requerido críticamente para el desarrollo embrionario del páncreas y para la regulación transcripcional de los genes específicos del páncreas endocrino en adultos, como la insulina. Las mutaciones que conducen a un defecto de la función del IPF-1 se han relacionado con la diabetes tipo 2 (Macfarlane y cols., 1999, J.Clin.Invest.104, R33-R39).

35 Sorprendentemente, se ha averiguado que los grandes cambios en los niveles del IPF-1 secretado se hallan en la insuficiencia de las células beta. La presente invención aporta un método *in vitro* de cribado o detección de un compuesto que impida y/o inhiba y/o retarde la insuficiencia de las células beta, y de un marcador nuevo para el diagnóstico prematuro de la insuficiencia de células beta en la diabetes.

40 En las configuraciones preferidas, el marcador nuevo IPF-1 puede ser utilizado para el diagnóstico así como para fines de cribado o detección.

45 En una configuración preferida, el método diagnóstico conforme a la presente invención se utiliza para fines de detección de pacientes, es decir, se utiliza para evaluar individuos sin un diagnóstico previo de diabetes, midiendo el nivel del IPF-1 en una muestra de fluido corporal y correlacionando el nivel de IPF-1 con la presencia o ausencia de la insuficiencia de células beta.

50 La presente invención aporta también un método de cribado o detección de un compuesto que impida y/o inhiba y/o retarde la insuficiencia de las células beta, y que comprenda la etapa de detección de IPF-1 soluble secretado por una célula anfitriona en presencia o ausencia de dicho compuesto, donde un compuesto que impide y/o inhibe y/o retarda la insuficiencia de las células beta es un compuesto con el cual se modifica el nivel del IPF-1 secretado por una célula anfitriona.

55 Una célula anfitriona puede ser una célula modelo que represente las células beta en cultivo, o bien un animal que se pueda usar como un modelo para la insuficiencia de células beta.

La presente invención también informa sobre el uso de un IPF-1 proteínico como marcador para el cribado de un compuesto que impida y/o inhiba la insuficiencia de células beta.

60 Los métodos de cribado de pacientes y de diagnóstico conforme a la presente invención se basan en una muestra del líquido corporal que procede de un individuo. A diferencia de los métodos conocidos, el IPF-1 se mide de forma específica a partir de esta muestra de fluido corporal utilizando un aglutinante específico.

65 Un aglutinante específico es, por ejemplo, un receptor del IPF-1 o de un anticuerpo para el IPF-1. Como el experto apreciará, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen de forma significativa al aglutinante específico del IPF-1. Se considera que un nivel inferior al 5% de reactividad cruzada ya no es significativo.

Un aglutinante específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con el IPF-1. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como a las construcciones genéticas que comprende el dominio de unión de un anticuerpo.

Los anticuerpos son generados por procedimientos actuales como los descritos en Tijssen (Tijssen, P., Practice and Theory of enzyme immunoassays 11 (1990) todo el libro, en particular las páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam). Para estos ensayos se han utilizado anticuerpos policlonales procedentes de conejos. Sin embargo, también se pueden usar anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, de ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Puesto que los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad requerida con unas propiedades constantes, representan las herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

Ahora que el IPF-1 se ha identificado como un marcador que es útil en el diagnóstico de la insuficiencia de células beta, el experto observará que existen vías alternativas para alcanzar un resultado comparable a los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden entre otras cosas el uso de péptidos sintéticos, lo que representa un epítipo del IPF-1 para la inmunización. Alternativamente, se puede usar la inmunización del ADN también conocida como vacuna del ADN.

Para la medición, la muestra de fluido corporal obtenida de un individuo se pone en contacto con el aglutinante específico para el IPF-1 en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente aglutinante-IPF-1. No es preciso especificar dichas condiciones puesto que el experto prácticamente sin esfuerzo alguno puede identificar fácilmente las condiciones apropiadas de la incubación.

Como etapa final de acuerdo con los métodos revelados en la presente invención se mide la cantidad de complejo y se correlaciona con el diagnóstico de insuficiencia de células beta o con el control respectivo tal como se ha descrito aquí previamente. Tal como apreciará el experto existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo de agente aglutinante específico - IPF-1 todos descritos con detalle en los libros de texto relevantes (por ejemplo, Tijssen P., *supra* o Diamandis y cols., eds(1996) Immunoassay, Academia Press, Boston).

Preferiblemente, la IPF-1 se detecta en un formato de ensayo tipo sándwich. En dicho ensayo se utiliza un primer agente aglutinante específico para capturar la IPF-1 por un lado y un segundo agente aglutinante específico, que se marca para poder ser detectado directa o indirectamente, por el otro lado.

Tal como se ha mencionado antes, se observa sorprendentemente que se puede medir el IPF-1 de una muestra de líquido corporal obtenida de una muestra individual. No se precisa ninguna muestra de biopsia o de tejido para aplicar el marcador IPF-1 en el diagnóstico de la insuficiencia de células beta.

En una configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con suero como material de muestra líquido.

En otra configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con plasma como material de muestra líquido.

En otra configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con sangre entera como material de muestra líquido.

Mientras la aplicación de los métodos rutinarios a las muestras tisulares condice a la identificación de muchos marcadores posibles para el tejido seleccionado, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar la IPF-1 proteínica en una muestra de líquido corporal. Incluso más sorprendentemente, han sido capaces de demostrar que la presencia de IPF-1 en dicha muestra líquida obtenida de un individuo se puede correlacionar con el diagnóstico de la insuficiencia de células beta.

Preferiblemente en los procedimientos establecidos se pueden utilizar los anticuerpos frente al IPF-1, por ejemplo, para la insuficiencia de células beta *in situ*, en biopsias o en método inmunohistológicos.

El anticuerpo se utilizará preferiblemente en un ensayo inmunológico cualitativo (IPF-1 presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de IPF-1).

La medición del nivel de IPF-1 proteínico ha resultado ser muy favorable en el campo de la insuficiencia de células beta y de diabetes. Por lo tanto, en otra configuración preferida, la presente invención se relacionará con el uso de la IPF-1 proteínica como molécula marcador en el diagnóstico de insuficiencia de células beta de una muestra de líquido corporal obtenida de un individuo.

El término molécula marcador se utiliza para indicar que cambios en el nivel de IPF-1 del analito marcan la presencia de la insuficiencia de células beta.

Se prefiere usar el marcador nuevo IPF-1 en el diagnóstico prematuro de la diabetes tipo II.

Se prefiere usar preferiblemente el marcador nuevo IPF-1 en el diagnóstico prematuro de la intolerancia a la glucosa.

El uso del IPF-1 proteínico propiamente representa un avance significativo en el ámbito desafiante del diagnóstico de la insuficiencia de células beta. El combinar las mediciones del IPF-1 con otros marcadores conocidos para la diabetes como la insulina o con otros marcadores de la insuficiencia de células beta por descubrir, conduce a otros avances o mejoras. Por lo tanto en otra configuración preferida la presente invención hará referencia al uso del IPF-1 como de una molécula marcador para la diabetes, preferiblemente para la insuficiencia de las células beta, en combinación con otra molécula marcador de la diabetes, preferiblemente para la insuficiencia de las células beta de una muestra de líquido corporal obtenida de un individuo. Otros marcadores especialmente preferidos con los que se combina la medición de la insuficiencia de células beta son la insulina, pre-insulina y/o los péptidos C.

Los reactivos diagnósticos para ensayos específicos se suministran preferiblemente en estuches que comprenden el agente aglutinante específico y los reactivos auxiliares requeridos para realizar el ensayo.

Una forma de evaluar la utilidad clínica del nuevo marcador IPF-1 consiste en medir sus niveles en 10 pacientes diabéticos dependiendo de las inyecciones de insulina exógena y comparando los niveles con los medidos en 10 pacientes con una función normal demostrada de las células beta. Para el análisis estadístico, se realiza la evaluación estándar del test t de Student con valores $<0,05$ que se consideran como significativos.

La exactitud de un ensayo se puede describir por sus características como receptor (ROC)(ver especialmente Xweig, M.H., y Campbell,G.,Clin.Chem.39(1993)561-577). El gráfico ROC es un diagrama de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de variar el umbral de decisión en toda la gama de datos observados.

El rendimiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica o de la capacidad de clasificar correctamente los individuos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de un ensayo para distinguir correctamente dos situaciones diferentes de los individuos investigados. Dichas situaciones son, por ejemplo, la salud y la enfermedad.

En cada caso, el diagrama ROC refleja el solapamiento entre las dos distribuciones mostrando la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el margen completo de decisiones. En el eje y, la sensibilidad o bien la fracción verdadera positiva se define como (número de resultados verdaderos positivos)/(número de resultados verdaderos positivos + número de falsos negativos). Esto también se conoce como positividad en presencia de una enfermedad o de un estado. Se ha calculado únicamente del subgrupo afectado. En el eje x, la fracción de falsos positivos o bien 1-especificidad se define como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de falsos positivos). Esto es un índice de especificidad y se calcula íntegramente a partir del subgrupo no afectado. Puesto que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan totalmente por separado, utilizando los resultados del ensayo de dos subgrupos diferentes, el diagrama ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del diagrama ROC representa un par de sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión específico. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una línea ROC que pasa por la esquina izquierda superior, donde la fracción de verdaderos positivos es de 1,0 o del 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0(especificidad perfecta). La línea teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados de los dos grupos) es una línea en diagonal de 45° desde la esquina izquierda inferior hasta la esquina derecha superior. La mayoría de líneas se encuentran entre estos dos extremos. (Si la línea ROC cae totalmente por debajo de la diagonal de 45° , esto se soluciona invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor a" hasta "menor a" o viceversa). De forma cualitativa, cuanto más próxima se encuentra la línea a la esquina izquierda inferior, mayor es la exactitud global del ensayo.

Un objetivo conveniente para cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio consiste en expresar su rendimiento mediante un número. La medida global más frecuente es el área bajo la línea ROC. Por convención, este área es siempre $\geq 0,5$ (en caso de que no lo sea, se puede invertir la regla de decisión que lo indica). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (ninguna diferencia aparente en cuanto a la distribución entre los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende solamente de una parte especial de la línea como del punto más próximo a la diagonal o de la sensibilidad para una especificidad del 90%, sino que de toda la línea. Esta es una expresión descriptiva, cuantitativa de lo próxima que se encuentra la línea ROC a la perfecta (área=1,0).

Los siguientes ejemplos, referencias y listado de secuencias serán una ayuda para comprender la presente invención, cuyo verdadero objetivo se ha definido en las reivindicaciones. Se entiende que se pueden efectuar modificaciones en los procedimientos mencionados.

Ejemplos

Para identificar las proteínas secretadas por INS-1 (Safari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines, Endocrinology, 1992 Jan;130(1):167-78) o células de RINm5finsulinoma (Praz GA, Halban PA, Wollheim CB, Blondel B, Strauss AJ, Renold AE. Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). Biochem J. 1983 Feb 15; 210(2):345-52) hemos aplicado dos métodos: (i) Fraccionamiento de las células por sedimentación diferencial en compartimentos

subcelulares con posterior identificación de las proteínas en base a su impresión digital de la masa peptídica usando espectrometría de masa MALDI-TOF y (ii) enriquecimiento de las glucoproteínas por cromatografía de la heparina seguida del método SDS-PAGE monodimensional e identificación de las proteínas mediante análisis de los péptidos tripticos resultantes del grupo de proteínas por cromatografía líquida acoplado en tandem a la espectrometría de masas, resultando una identificación basada en las marcas de la secuencia proteínica. La combinación de estas dos estrategias de purificación nos permitía incrementar la eficacia de la identificación proteínica en los compartimentos celulares así como en el medio de células de cultivo.

Cultivo celular

Hemos reproducido los rasgos de la insuficiencia de células beta mediante la exposición crónica de células beta a una combinación de glucosa/ácidos grasos (FAs), lo que sugiere que la hiperlipidemia así como la hiperglucemia puede contribuir a una descompensación de las células beta. Para estos experimentos se utilizaban células INS-1E y RINm5f previamente tratadas durante 24 horas con una combinación de glucosa 10 mM y palmitato 0,5 mM.

Ejemplo 1

Planificación e identificación de proteínas señalizadoras en el compartimento celular mediante electroforesis 2DE e identificación por MALDI-MS

Las muestras preparadas de cada línea celular se sometían a 2-DE tal como se ha descrito (Peyrl A, Krapfenbauer K, Slavc I, y cols. *PROTEOMICS* 3(9):1781-1800 SEP 2003; Fountoulakis M., Lancen H., Anal. Biochem. 250 (1997) 153-156). La 2-DE se realizaba básicamente tal como se ha indicado (Lancen, H., Roedor, D., Juranville, J.-F., Fountoulakis, M. *Electrophoresis* 1997, 18, 2085-2090). Las muestras se desalaban usando tubos de filtración de membrana (Millipore, Art.No.UFV4BGC25) y se aplicaban 2,0 mg en tiras de gradiente no lineal inmovilizadas de pH 3-10 (Amersham, Pharmacia Biotechnology, Upsala, Sweden) tanto en el extremo básico como el ácido de las tiras. Las proteínas se enfocaban a 200 V después de lo cual se aumentaba gradualmente el voltaje hasta 5000 V a 2 V/min. El enfoque continuaba a 5000 V durante 24 h. La segunda separación dimensional se realizaba en un gel de poliacrilamida al 12% (Biosolve, Walkinswaard, Netherland). Los geles (180x200x1,5 mm) eran recorridos a 50 mA/gel, en un sistema Ettan DALT II (Amersham, Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden) acomodando doce geles. Tras la fijación proteínica durante 12 horas en metanol al 50% que contiene ácidos fosfórico al 5%, los geles se coloreaban con Coomassie blue coloidal (Novex, San Diego, CA) durante 24 h. Las masas moleculares se determinaban por el recorrido de los marcadores proteínicos estándar (Gibco, Basel, Suiza) que abarcaba el margen de 10 a 200 kDa. Se usaban los valores PI suministrados por el proveedor de las tiras IPG (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los geles se decoloraban con H₂O y se escaneaban en un densitómetro AGFA DUOSCAN. Las imágenes electrónicas de los geles se registraban usando Photoshop (Adobe) y PowerPoint (Microsoft).

MALDI-MS: El análisis EM se realizaba tal como se ha descrito (Lancen, H., Roedor, D. Juranville, J.-F., Fountoulakis, M. *Electrophoresis* 1997, 18, 2085-2090) con mínimas modificaciones.

Resumiendo, se separaban las manchas, se decoloraban con acetonitrilo (v/v) al 30% en bicarbonato de amonio 0,1 M y se secaban en un vaporizador Speed vac. Los trozos de gel secados se volvían a inflar con 5 μ l de bicarbonato de amonio 5 mM, (pH 8,8), se añadían 50 ng de tripsina (Promega, Madison, WI, USA), se centrifugaban durante 1 minuto y se dejaban a temperatura ambiente durante unas 12 horas. Tras ello se añadían 5 μ l de agua seguidos 10 minutos más tarde de 10 μ l de acetonitrilo al 75%, que contenían un 0,3% de ácido trifluoroacético, se centrifugaban durante 1 minuto y el contenido se agitaba durante 20 minutos. Para MALDI-MS 1,5 μ l del líquido separado se mezclaban con 1 μ l de ácido alfa-ciano cinámico en acetonitrilo al 50%, un 0,1% de TFA en agua y se aplicaban a la referencia MALDI. Las muestras se analizaban en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Ultraflex, Bruker, Bremen, Alemania) equipado con un reflector y extracción retardada. La Des-Arg-1 Bradiquinina (Sigma) y la ACTH (18-38)(Sigma) se utilizaban como péptidos estándar. La calibración era interna para las muestras. Las masas peptídicas se comparaban con las masas peptídicas teóricas de todas las proteínas de todas las especies de la base de datos Swiss-Prot.

Anotación de picos para la espectrometría de masas MALDI

Los datos de la espectrometría de masas se filtran dos veces usando un filtro paramétrico contra el paso de bajas frecuencias para determinar el valor de referencia del instrumento. La desviación estándar media residual suavizada del valor de referencia se utiliza como un valor aproximado del nivel de ruido del instrumento en los datos. Tras la corrección del valor de referencia y la reclasificación de los datos en las coordenadas nivel-sobre ruido, el dato puntual con la mayor desviación del valor de referencia se utiliza para sembrar un procedimiento de ajuste de datos no lineales (Lavenberg-Marquardt) para detectar los máximos o picos de péptidos posibles. De forma específica, el procedimiento de ajuste intenta crear la distribución de isótopos de péptidos teórica promedio de mejor ajuste en función de los parámetros como la altura del pico, la resolución y la masa monoisotópica. La convergencia a un ajuste significativo viene determinada normalmente por la localización de los valores sigma. Tras una convergencia exitosa, se crea un valor aproximado de los errores de los parámetros determinados empleando un procedimiento autoinducido que utiliza dieciséis repeticiones con un intercambio aleatorio de 1/3 de los puntos de referencia. El ajuste resultante se sustrae de los datos, el nivel de ruido cerca del ajuste se ajusta a la suma del nivel de ruido extrapolado y a la desviación del ajuste del pico, y el proceso es iterado para hallar el pico siguiente siempre que un pico candidato se pueda hallar

más de cinco veces sobre el nivel de ruido. EL proceso se interrumpe cuando se han hallado más de 50 picos de datos. El cero y el primer orden del tiempo de vuelo a la conversión de masa se corrigen usando la extrapolación lineal a partir de los picos estándar internos detectados y de los intervalos de confianza y se estiman los intervalos de confianza para los valores de masa monoisotópica a partir de las exactitudes de masa de los picos y de los estándares.

Prueba de compatibilidad probabilística de los picos de los espectros para con los extractos proteicos in silico

Se comparan directamente las listas de masas de los picos para los espectros de masa con los extractos teóricos para toda la secuencia proteica. Para cada extracto teórico, se calcula el $(1 - \pi(1 - N P(\pi))^{cMatches})$, donde N es el número de péptidos en el extracto teórico, P(pi) es el número de péptidos que corresponde al intervalo de confianza para la masa monoisotópica del pico dividido por el recuento de todos los péptidos en la base de datos de la secuencia, y cMatches es el número de coincidencias entre el extracto y el espectro de masas. Se puede observar que este valor es proporcional a la probabilidad de obtener un valor de coincidencia falso positivo entre el extracto y el espectro. Los valores de probabilidad se filtran para una mayor significación de los picos del espectro que producen las coincidencias. Después de una primera vuelta de identificaciones, las desviaciones de las identificaciones para los espectros de masa adquiridos en condiciones idénticas se utilizarán para corregir los términos de segundo y tercer orden del tiempo de vuelo frente a la conversión de masa. Los valores resultantes tienen mayoritariamente unas desviaciones absolutas inferiores a 10 ppm. Estos valores de masa se utilizan luego para una vuelta final de coincidencias, donde se aceptan todas las coincidencias que tienen un P_{mism} inferior a $0,01/N$ proteínas (nivel de significación del 1% con corrección de Bonferroni).

Ejemplo 2

Enriquecimiento de las proteínas putativas secretadas por las columnas de heparina del medio e identificación mediante LC-MS

En base a la observación de que la mayoría de las proteínas con una función de señalización son glucosiladas, la naturaleza de las columnas de *Heparina Sepharose* hace que sea una herramienta muy versátil para la separación de muchas proteínas glucosiladas como, por ejemplo, las proteínas con función de señalización, los factores de crecimiento, las proteínas de coagulación y los receptores esteroideos. El ligando en la columna de *Heparina Sepharose* es un glucosaminoglucano sulfatado natural que se extrae del proteoglicano nativo de la mucosa intestinal porcina. La heparina consiste en unidades alternantes de ácido urónico y D-glucosamina, la mayoría de las cuales son sustituidas por uno o dos grupos sulfato. La heparina inmovilizada tiene dos formas importantes de interacción con las proteínas. Puede funcionar como un ligando de afinidad; por ejemplo, en su interacción con los factores de coagulación. La heparina tiene también una función como de intercambiador catiónico de elevada capacidad debido a sus grupos sulfato aniónicos. En nuestro caso, la columna se manipulaba usando una jeringa.

Las condiciones de elución recomendadas para ambos casos comprendían el aumento de la resistencia iónica usando un gradiente de NaCl 2M en el cual el tampón ligante era el fosfato de sodio 10 mM pH 7 y el tampón de elución era el fosfato de sodio 10 mM, NaCl 2M, pH 7.

Preparación de muestras

25 ml del medio se centrifugaban a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar las células y otros materiales insolubles. La solución de prueba se ajustaba a la composición de la solución tampón de enlace. Esto se efectuaba diluyendo la muestra añadiendo 25 ml de una solución tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH=7). La muestra se centrifugaba inmediatamente antes de aplicarlo en la columna. El volumen de descarga para la columna de heparina (HiTrap Heparin HP, 1 ml, Cat.Nr. 17-0406-01, Amersham), era de 5 ml para columna de 1 ml.

Procedimiento para el enriquecimiento de proteínas mediante la cromatografía de la heparina

1. Una jeringa de 25 ml se llenaba de solución tampón de enlace. Además se retiraba el tapón y la columna se conectaba a la jeringa con el adaptador "gota a gota" para evitar la entrada de aire en la columna.
2. Se retiraba el extremo doblado para equilibrar la columna, se lavaba con 0 volúmenes de columna de solución tampón de unión.
3. Luego se prepara la muestra tal como se ha descrito y se aplicaba usando una jeringa ajustada al adaptador luer mediante bombeo en la columna
4. Luego la columna se lavaba con 5 volúmenes de solución tampón o hasta que el material no apareciera en el efluente.
5. Para eluir la muestra, la columna se lavaba con 5 volúmenes de columna de tampón de elución usando un gradiente
6. Finalmente, las fracciones purificadas se desalaban usando columnas de R2 POROS

ES 2 314 694 T3

Las fracciones de muestra eluidas de la columna de heparina se desalaban usando cromatografía de fase invertida (POROS R2, PerSeptive Biosystems), y se secaban usando un Speed Vac (concentrador centrífugo). Tras el secado, las muestras se disolvían en un tampón de muestra mencionado antes y el contenido en proteína se determinaba mediante el procedimiento de Bradford (BioRad protein assay, BioRad).

Electroforesis 1D

Carga de muestras y condiciones de trabajo

15 μg de muestra se disolvían en 20 μl de solución tampón de muestra (Muestra, 2,5 μl de tampón de muestra NuPAGE LDS (4X), 1,0 μl de agente reductor NuPAGE (10X) y agua desionizada hasta 6,5 μl , para un volumen total de 10 μl) y antes de aplicarlo en el gel, se calentaba a 70°C durante 10 minutos. La cámara superior para el tampón se llenaba de 200 ml de tampón corriente 1X NuPAGE SDS (el tampón corriente MES SDS se preparaba añadiendo 50 ml de tampón corriente 20X NuPAGE MES SDS a 950 ml de agua desionizada). Como un agente reductor, se añadían 200 μl /200 ml de solución antioxidante a la cámara de tampón superior. Finalmente, la cámara inferior de solución tampón se llenaba con 600 ml de tampón corriente 1X NuPAGE SDS y la electroforesis del gel se realizaba sobre un gradiente lineal BT del 10%, geles de poliacrilamida (NuPAGE, Invitrogen) a un voltaje constante de 200V a temperatura ambiente durante 35 minutos.

Procedimiento de coloración y decoloración

Después de la fijación proteínica con un 50% de metanol (v/v) que contiene un 5% de ácido fosfórico durante 12 horas, los geles se coloreaban con azul Coomassie coloidal (Novex, San Diego, CA, USA) durante otras 24 horas. Los geles se decoloraban con H_2O y se escaneaban en un escáner estándar. Las imágenes se trataban usando el software Photoshop (Adobe) y el Power Point (Microsoft). Las bandas proteicas se cuantificaban usando el software Image Master 2D Elite (Amersham Pharmacia Biotechnology).

LC-MS: Para la identificación de las proteínas segregadas nuestros estudios de la proteómica también se llevaban a cabo usando un sistema LC/MS denominado tecnología de identificación proteínica multidimensional (MudPIT) que combina la cromatografía líquida multidimensional con la espectrometría de masa junto con la ionización por electrospray (ESI). Para separar las proteínas extraídas enriquecidas por las columnas de heparina, nuestro método de cromatografía líquida multidimensional consiste en una fuerte resina de intercambio catiónico (SCX) y una resina de fase invertida en una columna bifásica. Cada análisis MudPIT se realizaba por duplicado y la separación era reproducible en un 0,05% entre dos análisis. Además, se ha demostrado un margen dinámico de 10000 a 1 entre las proteínas/péptidos más abundantes y menos abundantes en una mezcla de péptidos compleja. Mejorando la preparación de la muestra junto con las separaciones, el método mejoraba el análisis global de proteomas al identificar las proteínas de una fracción enriquecida con las proteínas segregadas. El sistema MudPIT incluía una pre-columna de 4 cm x 50 - μm d.i. x 5 μm C18 microSPE para la concentración de la muestra y una columna capilar empaquetada de 85 cm x 15 - μm d.i. x 3 μm C18 para una separación LC a nanoescala de fase invertida de cantidades de muestra extremadamente pequeñas. La fase microSPE permitía que la solución se cargara en la columna nanoLC a aproximadamente 8 $\mu\text{l}/\text{min.}$, lo que requería <2 min. para cargar una solución de 10 μl con una pérdida de muestra <5% (debido a los adaptadores de la jeringa y de la válvula). La separación se realiza a una presión constante de 10.000 psi. La columna capilar empaquetada de diámetro interior de 15 μm y una longitud de partícula de 3 μm aporta una capacidad máxima de separación de aproximadamente 10^3 . La columna está conectada mediante una tuerca de unión de acero inoxidable de volumen muerto cero a un nanoESI emisor reemplazable fabricado a partir de una columna capilar de sílice fundido de 10 μm de d.i. x 150 μm de diámetro exterior con un orificio de aproximadamente 2 μm de diámetro interior para una ionización altamente eficaz del péptido que se eluye. La fuente ESI se interconecta a un FTICR MS o bien a un MS/MS iónico para la detección e identificación de péptidos/proteínas. Un espectrómetro de masa FTICR se utilizaba para la MS de una sola etapa en base a mediciones de masa de elevada exactitud y al uso de la información (RRT) del tiempo de retención relativo y un espectrómetro de masa captador de iones Finnigan (LCQ XP, ThermoQuestCorp., San Jose, CA) se utilizaba para el MS/MS.

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos al marcador IPF-1 de la insuficiencia beta celular

El anticuerpo policlonal al marcador IPF-1 de insuficiencia de células beta es generado para el uso ulterior de los anticuerpos en la medición de suero y plasma y de los niveles de sangre del IPF-1 mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo, Western Blotting y ELISA.

Expresión proteínica recombinante en *E. coli*

Para generar anticuerpos al IPF-1 se realiza la expresión recombinante de la proteína para obtener inmunógenos. La expresión se lleva a cabo aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y de la *E. coli*. En una primera etapa, se analiza la secuencia del ADN y se obtienen las recomendaciones para las variantes mutacionales silenciosas del ADNc de alto rendimiento y las respectivas secuencias del cebador de la RCP utilizando el sistema "ProteoExpert RTS *E. coli* HY". Este es un servicio basado en una web comercial (www.proteoexpert.com). Utilizando los pares de cebadores recomendados, se utiliza el sistema "RTS 100 *E. coli* Linear Template Generation Set, His-tag" (Roche

ES 2 314 694 T3

5 Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat.No. 3186237) para generar los templados de la RCP lineal a partir del ADNc y para la transcripción *in vitro* y la expresión de l código de la secuencia de nucleótidos para la proteína IPF-1. Para la detección mediante el sistema Western-blot y posterior purificación, la proteína expresada contiene un His-tag. Se identifica la variante que mejor se expresa. Todas las etapas desde la RCP a la expresión y detección se
10 llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto respectivo de la RCP que contiene todas las regiones reguladoras necesarias T7 (promotor, lugar del enlace ribosómico y terminador T7) está clonado al vector pBAD TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, Nr. cat. K 4300/01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión que utiliza las secuencias reguladoras T7, la construcción se transforma en *E. coli* BL 21(DE 3)(Studier, F.W., y cols., Methods. Enzymol.185(1990)60-89) y las bacterias transformadas son cultivadas en un lote de 1 litro para la expresión proteínica.

15 La purificación de la proteína de fusión His-IPF-1 se realiza siguiendo los procedimientos estándar en una columna de quelato de níquel. Brevemente, 1 l de cultivo de bacteria que contiene el vector de expresión para la proteína de fusión His-IPF-1 se granula mediante centrifugación. El granulado celular se vuelve a suspender en una solución tampón de lisis que contiene fosfato, cloruro de guanidio 0,7M pH 8,0, imidazol y tioglicerol, y se somete a un proceso de homogenización usando un Ultra-Turrax®. El material insoluble se granula mediante centrifugación a elevada velocidad y el sobrenadante se aplica a una columna cromatográfica de quelato de níquel. La columna se lava con varios volúmenes de solución tampón de lisis y seguidamente lavados con la solución tampón que contiene fosfato, a pH 8,0 y urea. Finalmente, el antígeno enlazado es eluido usando un tampón de fosfato que contiene SDS
20 en condiciones ácidas.

Producción de anticuerpos monoclonales frente a la proteína IPF-1

a) Inmunización de ratones

25 Ratones A/J de 12 semanas son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal con 100 µg de IPF-1. Al cabo de 6 semanas se realizan otras dos inmunizaciones intraperitoneales a intervalos mensuales. En este proceso cada ratón recibe 100 µg de IPF-1 adsorbidos en hidróxido de aluminio y 10⁹ gérmenes de *Bordetella pertussis*. Posteriormente se llevan a cabo las dos últimas inmunizaciones por vía intravenosa el tercer y segundo día previo a la fusión utilizando
30 100 µg de IPF-1 en tampón de PBS para cada uno.

b) Fusión y clonación

35 Las células del bazo de los ratones inmunizados según a) se funden con células del mieloma conforme a Galfre, G., y Milstein, C., Methods in Enzymology 73(1981)3-46. En este proceso, aproximadamente 1*10⁸ células del bazo del ratón inmunizado se mezclan con 2x10⁷ células de mieloma (P3x63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) y se centrifugan (10 min a 300 g y 4°C). Las células se lavan luego una vez con el medio RPMI 1640 sin suero bovino fetal (FCS) y se centrifugan de nuevo a 400 g en un tubo cónico de 50 ml. Se descarta el sobrenadante, el sedimento celular se afloja suavemente con una ligera sacudida, se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla
40 mediante pipeteo. Al cabo de 1 minuto en un baño de agua a 37°C, 5 ml de RPMI 1640 sin FCS se añadirán gota a gota a temperatura ambiente en un periodo de 4-5 minutos. Posteriormente 5 ml de RPMI 1640 que contienen un 10% de FCS se añaden gota a gota en aproximadamente 1 minuto, se mezcla minuciosamente, y se llena con medio (RPMI 1640+10% FCS) hasta 50 ml y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 400 g y a 4°C. Las células sedimentadas son absorbidas en el medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y cultivadas en un medio de
45 selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina en RPMI 1640+ 10% de FCS). La interleucina 6 se añadirá al medio a 100 U/ml como un factor de crecimiento. Después de aproximadamente 10 días, se analiza el anticuerpo específico en los cultivos primarios. Los cultivos primarios positivos de IRPF-1 son clonados en unas placas de cultivo celular de 96 pocillos por medio de un distribuidor de células activado por fluorescencia. En este proceso de nuevo se añade interleucina 6 al medio a 100 U/ml como aditivo de crecimiento.

50

c) Aislamiento de la inmunoglobulina de los sobrenadantes del cultivo celular

55 Las células del hibridoma obtenidas son cultivadas en una densidad de 1x10⁵ células por ml en un medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y son proliferadas durante 7 días en un fermentador (Thermodux Co., Wertsheim/Main, Model MCS-104XL, Pedido nr. 144-050). Se obtienen concentraciones promedio de 100 µg de anticuerpo monoclonal por ml en el sobrenadante del cultivo. La purificación de este anticuerpo del sobrenadante del cultivo se realiza siguiendo métodos convencionales en la química de las proteínas (por ejemplo, según Bruck, C., y cols., Methods in Enzymology 121 (1986) (587-695).

60 Generación de anticuerpos policlonales

a) Inmunización

65 Para la inmunización, se prepara una emulsión nueva de la solución proteínica (100 µg/ml de proteína IPF-1) y el adyuvante completo de Freund en el porcentaje 1:1. Cada conejo se inmuniza con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. La sangre se extrae y el suero anti-IPF-1 resultante es utilizado para otros experimentos tal como se ha descrito en los ejemplos 3 y 4.

ES 2 314 694 T3

b) Purificación de la IgG (Inmunoglobulina G) de suero de conejo por la precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio

Un volumen de suero de conejo se diluye con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajusta a 4,5 con Tris-base 2M. El ácido caprílico (25 μ l/ml de muestra diluida) se añadirá gota a gota agitando vigorosamente. Después de 30 minutos la muestra se centrifuga (13.000 x g, 30 min, 4°C), se descartan los gránulos y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajusta a 7,5 añadiendo la tris-base 2M y se filtra (0,2 μ m).

La inmunoglobulina en el sobrenadante se precipita agitando vigorosamente mediante la adición gota a gota de una solución de sulfato de amonio 4M a una concentración final de 2M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogen por centrifugación (8000 x g, 15 min, 4°C).

Se descarta el sobrenadante. Los gránulos se disuelven en NaH_2PO_4 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializan de forma exhaustiva. El dializado es centrifugado (13.000xg, 15 min, 4°C) y filtrado (0,2 μ m).

Biotinilación de IgG de conejo policlonal

La IgG de conejo policlonal se lleva a 10 mg/ml en NaH_2PO_4 /NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. A la solución de IgG se añaden 50 μ l de Biotin-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO) por ml. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra es cromatografiada en Superdex 200 (NaH_2PO_4 /NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogen las fracciones que contienen IgG biotinilado. Los anticuerpos monoclonales han sido biotinilados según el mismo procedimiento.

Digoxigenilación de IgG policlonal de conejo

La IgG policlonal de conejo se añade a 10 mg/ml a NaH_2PO_4 /NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. A la solución de IgG se añaden 50 μ l de ester de digoxigenina-3-O-metilcarbonil- ϵ -aminocaproico -N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Nr. Cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra es cromatografiada en Superdex[®] 200 (NaH_2PO_4 /NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogen las fracciones que contienen IgG digoxigenilado. Los anticuerpos monoclonales son etiquetados con digoxigenina según el mismo procedimiento.

Ejemplo 4

Western Blot

Las muestras de proteínas enriquecidas y aisladas del medio por las columnas de heparina (mencionadas antes) se disuelven en la solución tampón de la muestra formada por Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% Tween 20, 1% de SDS, y se centrifugaban a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. La concentración proteínica del sobrenadante se medía mediante Bradford usando una curva estándar construida a partir de una gama de estándares de albúmina de suero bovino conocida. Tras el mezclado de muestras con el tampón de muestra (Tris-HCl 60 mM, 2% SDS, 0,1% de azul de bromofenol, 25% de glicerina, y 2-mercaptoetanol 14,4 mM, Ph 6,8) y la incubación a 70°C durante 5 minutos, las muestras se separaban por medio de geles ExcelGel SdS homogéneos del 12,5% (Amersham Bioscience) y se electrotransferían a las membranas de nitrocelulosa. Después de la incubación en la solución de bloqueo (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% Tween 20 y 5% de leche seca no grasa), las membranas se incubaban con anticuerpo de rata anti-anti conejo durante 2 horas a temperatura ambiente, respectivamente. Tras lavar 3 veces durante 10 minutos con solución de lavado (0,3% Tween 20 en solución salina tris-tamponada), las membranas se incubaban con una IgG anti-conejo conjugada de peroxidasa de rábano (H+L), una IgG₁ anti-ratón y una IgG_{2a} anti-ratón (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL), respectivamente, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaban 3 veces durante 10 minutos y los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaban mediante un reactivo de quimioluminiscencia (Western Lightning[™], Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA) sobre una película de rayos X según el protocolo del fabricante.

Ejemplo 5

ELISA para la medición del IPF-1 en las muestras de plasma y suero humano

Para la detección del IPF-1 en suero humano o plasma, se desarrolla un ELISA con la técnica sándwich. Para la captura y detección del antígeno, las partes alícuotas del anticuerpo policlonal anti-IPF-1 (ver ejemplo 2) se conjugan con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Las placas de microvaloración de 96 pocillos revestidas de estreptavidina se incuban con 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-IPF-1 biotinilado durante 60 minutos a 10 μ g/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA y 0,1% Tween 20. Tras la incubación, las placas se lavan tres veces con 0,9% de NaCl, 0,1% Tween 20. Los pocillos se incuban luego durante 2 horas con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver ejemplo 2) como antígeno estándar o bien con muestras de plasma diluido de los pacientes. Después de la unión del IPF-1, las placas se lavan tres veces con un 0,9% de NaCl, 0,1% Tween 20. Para la detección específica del IPF-1-enlazado, los pocillos se incuban con 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-IPF-1 digoxigenilado durante 60 minutos a 10 μ g/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA,

ES 2 314 694 T3

0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Posteriormente, las placas se lavan tres veces para eliminar el anticuerpo no enlazado. En una etapa posterior, los pocillos se incuban con conjugados de anti-digoxigenina-POD 20 mU/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nr. catálogo 1633716) durante 60 minutos en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Las placas se lavan seguidamente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 10 μ l de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, nr. catálogo 11685767) y el OD se mide después de 30-60 minutos a 405 nm con un lector ELISA.

Ejemplo 6

Análisis estadístico de los datos de los pacientes

La utilidad clínica del marcador nuevo IPF-1 se evalúa midiendo sus niveles en 10 pacientes diabéticos según las inyecciones de insulina exógena y comparando los niveles con los medidos en 10 pacientes con función normal verificada de las células beta. El análisis estadístico se lleva a cabo mediante la evaluación del test t de Student con valores <0,05 tomados como significativos.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de cribado para un compuesto que impide y/o inhibe y/o retarda la insuficiencia de células beta, que comprende la etapa de detección del factor 1 (IPF-1) promotor de la insulina soluble, secretado por un anfitrión en presencia o ausencia de dicho compuesto, de forma que un compuesto que impide y/o inhibe y/o retrasa la insuficiencia de las células beta es un compuesto con el cual el nivel de IPF-1 de un anfitrión se ve alterado.

2. Un método para el diagnóstico de la insuficiencia de células beta que comprende las etapas de

a) aporte de una muestra de líquido corporal obtenida de un individuo

b) puesta en contacto de dicha muestra de líquido corporal con un agente aglutinante específico para el IPF-1 en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente aglutinante y el IPF-1, y

c) correlación de la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico de la insuficiencia de células beta.

3. Los métodos conforme a cualquiera de los puntos de la reivindicación 2, que se **caracterizan** porque dicha muestra es suero.

4. El método conforme a la reivindicación 2, que se **caracteriza** porque dicha muestra es plasma.

5. El método conforme a la reivindicación 2, que se **caracteriza** porque dicha muestra es sangre entera.

6. Uso de un IPF-1 proteínico como una molécula marcador en el diagnóstico de la insuficiencia de células beta y/o en el diagnóstico prematuro de la diabetes tipo II de una muestra de líquido corporal obtenido de un individuo

7. El uso de la reivindicación 6, de forma que el factor proteínico se utiliza en combinación con al menos otra molécula marcador para la insuficiencia de células beta en el diagnóstico de la insuficiencia de células beta de una muestra de líquido corporal obtenida de un individuo

8. El uso conforme a la reivindicación 6, de forma que el diagnóstico prematuro de la diabetes tipo II se realiza con una muestra derivada de pacientes que sufren intolerancia a la glucosa.

ES 2 314 694 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <100> F. Hoffmann- La Roche AG
- 5 <120> IPF-1 como un marcador/referencia para la insuficiencia de células beta
- <130> caso 22665
- <160> 1
- <170> Paciente versión 3.2
- 10 <210> 1
- <211> 283
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 15 <220>
- <221> Promotor de insulina factor 1
- <222> (1)...283
- 20 <223> nr. Acceso P52945

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 314 694 T3

<400> 1

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

ES 2 314 694 T3

	195	200	205
5	Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu		
	210	215	220
10	Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro		
	225	230	235
15	Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala		
	245	250	255
20	Arg Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser		
25	260	265	270
	Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg		
30	275	280	
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			