

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 975**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2007** **E 07719741 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 2021792**

54 Título: **Marcadores proteínicos de la artritis disueltos**

30 Prioridad:

09.05.2006 US 798712 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
(100.0%)
NO 103 - 6190 AGRONOMY ROAD VANCOUVER
BRITISH COLUMBIA V6T 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**GHAHARY, AZIZ;
MAKSYMOWYCH, WOLODYMYR WALTER
PETER y
KILANI, RUHANGIZ TAGHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 407 975 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

Marcadores proteínicos de la artritis disueltos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a ensayos para la proteína 14-3-3 eta que es un biomarcador diagnóstico de la artritis cuando se encuentra en el suero o el líquido sinovial. El alcance de la protección es definido por las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la invención

Artritis o artralgia se refieren en general a trastornos inflamatorios de las articulaciones del cuerpo y generalmente se acompaña de dolor, inflamación y rigidez. La artritis puede ser el resultado de cualquiera de varias causas, por ejemplo infección, traumatismo, trastornos degenerativos, trastornos metabólicos o alteraciones u otras etiologías desconocidas. La artritis se puede describir más específicamente como, por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis bacteriana o infecciosa. La artritis puede además acompañar otros trastornos identificados, como gota, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis.

En las articulaciones normales, una pequeña cantidad de líquido sinovial (SF) lubrica el cartílago y la membrana sinovial y actúa como un reservorio de solutos y unas pocas células mononucleares y sinoviales en reposo (3). Durante la inflamación crónica, aumenta el volumen de SF y la concentración de células inmunitarias y proteínas solubles (4).

Para algunas formas de artritis, como la artritis reumatoide (RA), la causa específica puede ser desconocida. La RA es considerada como un "modelo del umbral multifactorial", en el cual deben actuar muchas influencias genéticas y ambientales sobre la misma persona para que la enfermedad se manifieste (1). Como carecen de un objetivo específico, las terapias actuales apuntan principalmente a la supresión de la respuesta inflamatoria (2). Una característica distintiva de la artritis reumatoide es la hiperplasia sinovial, caracterizada por la proliferación de sinoviocitos tipo fibroblastos (FLS) y la infiltración de células inflamatorias en la subíntima, o capa externa de la membrana sinovial (5). Los FLS, que constituyen alrededor de dos tercios de la población de la membrana sinovial, tienen un sistema secretor bien definido (5) y segregan grandes cantidades de metaloproteinasas de matriz (MMP) destructivas en RA (6), específicamente MMP-1, 3, 8, 9, 10, 11 y 13 (7-11). Numerosos investigadores han demostrado que MMP-1 y MMP-3 juegan papeles importantes en la RA (12) y que la colagenasa (MMP-1) es la más abundante (6). MMP-1 y MMP-3 son biomarcadores que han demostrado ser valiosos para predecir daños estructurales en la RA. La expresión local de las MMP en la artritis, particularmente de MMP-1, es especialmente prominente en el pannus articular adyacente al sitio de destrucción del cartílago y el hueso (13). Las colagenasas, particularmente MMP-1, escinden las moléculas de colágeno nativo a pH neutro, tornando al colágeno susceptible de degradación enzimática adicional (14).

Los factores conocidos que activan los FLS para producir MMP-1 incluyen citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y ambos están implicados en la RA (15). IL-1 alfa y TNF-alfa son capaces de estimular la producción de otras MMP y estromelisin en los fibroblastos sinoviales y los condrocitos *in vitro* (16). Las interacciones de los FLS con TNF-alfa o IL-1 alfa de los linfocitos T activados inducen la expresión de MMP-1 (17). Los linfocitos T también pueden activar los FLS para producir una gran variedad de mediadores inflamatorios (18). Este bucle de retroalimentación cíclico entre los FLS y los linfocitos T y sus respectivas citocinas conducen a la activación y proliferación de los linfocitos T y favorece la inflamación persistente observada en la RA (19-21). Se ha sugerido que los anticuerpos terapéuticos anti-TNF-alfa neutralizan el TNF-alfa y bloquean la activación de los linfocitos T que conduce a este estado persistente (22).

Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas diméricas implicadas en una serie de funciones (23-24). Existen siete isoformas mamíferas de 14-3-3: beta (β), gamma (γ), épsilon (ϵ), eta (η), sigma (σ), tau (τ) y dseda (ζ). Desde el descubrimiento de la primera proteína 14-3-3 en 1967 (26), los integrantes de la familia de proteínas 14-3-3 han sido repetidamente redescubiertos basándose en sus nuevas actividades biológicas, principalmente en vías de transducción de señales. Se han identificado como activadores de las triptofano y tirosina hidroxilasas (27-28) y como inhibidores de la PKC (29). Estudios posteriores identificaron las proteínas 14-3-3 como moléculas que interactúan con las PKC, integrantes de la familia Raf y ahora más de otras 200 proteínas intracelulares con importantes funciones biológicas (30-31) que incluyen la respuesta al daño del ADN y la regulación del ciclo celular (32-34). Jamal et al (1998) da a conocer 14-3-3 dseda como biomarcadores de la artritis.

60 Resumen de la invención

La invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que isoformas particulares de la proteína 14-3-3, 14-3-3 eta, están presentes en mayores niveles en el suero y el líquido sinovial de los pacientes con artritis en comparación con los pacientes normales.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico, donde el sujeto tiene, o se sospecha que tiene artritis, en el que el método comprende determinar la presencia, la ausencia, la cantidad o los niveles relativos de una proteína 14-3-3 η en una muestra, donde la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel relativo de la isoforma es indicativo de sensibilidad de la artritis del sujeto al régimen terapéutico.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un juego para detectar una proteína 14-3-3 η en una muestra de un paciente, como una muestra de suero o líquido sinovial de un paciente que tiene, o corre riesgo de tener, una artritis. El juego contiene al menos un anticuerpo específico para detectar la isoforma de la proteína 14-3-3. El juego puede contener además al menos un anticuerpo específico para detectar por lo menos una metaloproteinasa de matriz.

Según otro aspecto, se proporciona un método para seleccionar un grupo de sujetos para determinar la eficacia de un régimen terapéutico que se sabe o se sospecha que es útil para el tratamiento de la artritis, el método comprende detectar la presencia, la ausencia, la cantidad o los niveles relativos de una proteína 14-3-3 η o gamma en una muestra de suero o de líquido sinovial de un paciente, donde dicha presencia, ausencia, cantidad o dicho nivel relativo de una o más de estas isoformas de la proteína 14-3-3 en ese líquido, indica sensibilidad de la artritis del sujeto al régimen terapéutico.

Según otro aspecto, se proporciona un método para tratar la artritis en un sujeto mamífero que lo necesita, donde el método comprende administrar al sujeto un régimen terapéutico, en el que la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel relativo de una isoforma η o gamma de una proteína 14-3-3 en el suero o el líquido sinovial de ese sujeto indica sensibilidad al régimen terapéutico.

Según otro aspecto, se proporciona un método para tratar la artritis en un sujeto mamífero que lo necesita, donde el método comprende: seleccionar un sujeto que tenga presencia, ausencia, una cantidad o un nivel relativo de proteína 14-3-3 η en el suero o el líquido sinovial sea indicativo de sensibilidad a un régimen terapéutico; y administrar al sujeto el régimen terapéutico.

Según otro aspecto, se proporciona un método para identificar un sujeto mamífero con mayor sensibilidad a un régimen terapéutico para el tratamiento de la artritis, que comprende el paso de detectar selectivamente una población de sujetos para determinar la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel relativo de proteína η 14-3-3 en el suero o el líquido sinovial e identificar sujetos sensibles al régimen terapéutico, basándose al menos en parte en la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel relativo de la proteína en el líquido.

En ejemplos escogidos, la divulgación puede incluir ensayos para otros marcadores de la artritis en los sueros o líquidos sinoviales de sujetos, junto con ensayos para determinar la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel relativo de proteínas 14-3-3 η o gamma. Por ejemplo, los ensayos pueden implicar además determinar la presencia, la ausencia, la cantidad o los niveles relativos de una o más metaloproteinasas de matriz, como MMP-1 o MMP-3, en las muestras de suero o líquido sinovial.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Detección de diferentes isoformas de 14-3-3 en el líquido sinovial (SF) y el suero (PS) de pacientes artríticos por inmunotransferencia tipo western. Se usó lisado de queratinocitos (K) como control positivo.

Figura 2.

Detección de 14-3-3 η en el líquido sinovial de 17 pacientes artríticos. Se extrajeron muestras de líquido sinovial (2 μ l/línea) de 17 pacientes con RA que tenían sinovitis activa y se analizaron por inmunotransferencia tipo western, usando un anticuerpo específico de la isoforma para la isoforma 14-3-3 η . Se usó lisado de queratinocitos (K) como control positivo. Los niveles de 14-3-3 η varían en la población de pacientes estudiada, pero se detecta confiablemente en todas las muestras de líquido sinovial.

Figura 3

Expresión de 14-3-3 η , MMP-1 y MMP-3 en el suero y líquido sinovial de pacientes. Se examinaron muestras emparejadas de líquido sinovial y suero de 12 pacientes por inmunotransferencia tipo western. Se usó lisado de queratinocitos (K) como control positivo. SF: líquido sinovial; PS: suero del paciente; MMP-1: metaloproteinasa de matriz 1; MMP-3: metaloproteinasa de matriz 3.

Figura 4

Detección y comparación de los niveles de 14-3-3 η y γ en muestras emparejadas de suero y líquido sinovial de 9 pacientes. El líquido sinovial o el suero (2 μ l/línea) de los pacientes se analizó por inmunotransferencia tipo western usando anticuerpo anti-14-3-3 η o γ . Se usó lisado de queratinocitos (K) como control positivo. SF: líquido sinovial; PS: suero del paciente.

Figura 5

Los niveles de 14-3-3 η en muestras emparejadas de suero y líquido sinovial de pacientes se cuantificaron por densitometría y se representan en el panel inferior. Las barras sólidas muestran el nivel de 14-3-3 η en suero normalizado a una muestra de líquido sinovial del mismo paciente (barras abiertas).

Figura 6

Detección de 14-3-3 η , γ , MMP-1 y MMP-3 en diferentes volúmenes de sueros normales y de pacientes.

A) Se prepararon muestras combinadas de 12 sueros normales o de pacientes y se analizó un rango de volúmenes (0.1-2.0 μ l/línea) por inmunotransferencia tipo western, usando anticuerpos específicos para 14-3-3 η , γ , MMP-1 o MMP-3. Se incluyeron 2 μ l de líquidos sinoviales (SF) combinados de pacientes afectados como control positivo. B) Se analizó la isoforma 14-3-3 η recombinante (0.01-2.0 μ g/línea) mediante inmunotransferencia tipo western en paralelo con 2 μ l de suero normal (NS) o del paciente (PS).

Figura 7

Ilustra la detección de 14-3-3 η antes y después del tratamiento anti-TNF:

Niveles de proteína 14-3-3 η en 4 ml de muestras de suero de pacientes con RA antes (U) y después del tratamiento anti-TNF- α (T). N = control negativo, que es 4 ml de una muestra de mezcla de sueros preparada a partir de 12 muestras de suero de 12 individuos sanos. P = control positivo que es 4 mg de proteína total de lisado de queratinocitos.

Descripción detallada

Un "índice de la actividad de la enfermedad" (DAS, Disease Activity Score) se refiere a una medida de la actividad o el estado de la artritis reumatoide en un paciente. DAS es uno de varios estándares o índices que se utilizan en la práctica clínica. Un cálculo de un DAS puede incluir los parámetros siguientes: número de articulaciones dolorosas al tacto (TEN), número de articulaciones tumefactas (SW), velocidad de eritrosedimentación (ESR) y evaluación del paciente de la actividad de la enfermedad (VAS). Alternativamente, un DAS puede incluir la evaluación del marcador proteína C reactiva (CRP) (Skogh T et al 2003. Ann Rheum Dis 62:681-682).

Un paciente o sujeto experimental, según se usa en este documento, incluye un paciente humano sometido, o a punto de someterse, a un tratamiento para la artritis. Un sujeto experimental incluye mamíferos no humanos sometidos a, o a punto de ser sometidos, a un tratamiento para la artritis. En el caso de un sujeto experimental, la artritis puede ser inducida o implantada deliberadamente, o se puede presentar espontáneamente. El paciente o sujeto experimental puede haber sido diagnosticado previamente utilizando, por ejemplo, los métodos descritos en este documento u otros métodos diagnósticos conocidos en el área, o puede haber sido seleccionado como parte de la población general (un paciente de "control" o un sujeto experimental de "control"). Los pacientes y sujetos experimentales, ya sean de control o no, pueden ser mencionados en general como sujetos. Los pacientes se pueden seleccionar o diferenciar en función de la gravedad de la enfermedad, el género, la edad o la idoneidad para un tratamiento o método de análisis particular.

Según se usa en este documento, una "isoforma" se refiere a cualquiera de las dos o más proteínas funcionalmente similares que tienen una secuencia de aminoácidos similar pero no idéntica y que están codificadas por genes diferentes o por transcritos de ARN del mismo gen a los que se les eliminaron diferentes exones.

Un técnico con experiencia comprenderá que las designaciones numéricas de las posiciones de los nucleótidos o aminoácidos dentro de una secuencia son en relación con la secuencia específica. Asimismo, a las mismas posiciones se les pueden asignar diversas designaciones numéricas dependiendo de la forma en que la secuencia se numera y de la secuencia elegida. Además, variaciones en la secuencia como inserciones o deleciones, pueden cambiar la posición relativa y posteriormente las designaciones numéricas, de nucleótidos o aminoácidos particulares, en o alrededor de un sitio en particular.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente y se refieren a un compuesto conformado por al menos dos residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos o enlaces

peptídicos modificados, por ejemplo isómeros de péptidos (enlaces peptídicos modificados) que pueden proporcionar al péptido propiedades adicionales deseadas, como mayor vida media. Un péptido puede contener al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos que constituyen un péptido o una proteína como los descritos en este documento también pueden ser modificados por procesos naturales, como el procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en el área. Las modificaciones se pueden producir en cualquier lugar en un péptido, como en el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxi terminales. Se entiende que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos o distintos grados en varios sitios en un péptido determinado.

La nomenclatura utilizada para describir los compuestos peptídicos sigue la práctica convencional en la que se presenta el grupo amino a la izquierda y el grupo carboxi a la derecha de cada residuo de aminoácido. En las secuencias, los grupos amino y carboxi terminales, aunque no se muestra específicamente, se entenderá que están en la forma que asumirían a valores de pH fisiológico, a menos que se especifique lo contrario. En las fórmulas estructurales del aminoácido, cada residuo puede estar representado generalmente por una designación de una sola letra o de tres letras, correspondientes al nombre trivial del aminoácido.

El término "anticuerpo" según se usa en este documento incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, quiméricos, de cadena única, o anticuerpos humanizados, así como fragmentos Fab o F(ab)², que incluyen los productos de una genoteca de expresión de Fab u otra inmunoglobulina. Los métodos para preparar dichos anticuerpos o fragmentos son conocidos en el área y se pueden encontrar, por ejemplo, en HARLOW, E y LANE D. Antibodies: A Laboratory Manual. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press. La selección o identificación de péptidos específicos para utilizar como epítopos para la producción de anticuerpos que diferencian entre proteínas o isoformas de las proteínas, se puede llevar a cabo usando comparaciones de secuencias; un técnico con experiencia en el área será capaz de identificar secuencias de péptidos o proteínas adecuadas que pueden ser útiles para la producción de anticuerpos con la selectividad deseada. Ejemplos de secuencias que pueden ser útiles para un técnico con experiencia pueden incluir las SEC. ID N°: 1 a 7.

Según se usan en este documento, "artritis" o "artralgia" se refieren a un trastorno inflamatorio de las articulaciones del cuerpo. Dolor, hinchazón, rigidez y dificultad de movimientos se asocian con frecuencia a enfermedades artríticas. La artritis puede ser el resultado de cualquiera de varias causas, por ejemplo infección, traumatismo, trastornos degenerativos, trastornos metabólicos o alteraciones u otras etiologías desconocidas. La artritis se puede describir más específicamente como, por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, artritis bacteriana o infecciosa. La artritis puede además acompañar otros trastornos identificados, como gota, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis. Las proteínas 14-3-3, particularmente las isoformas eta y gamma, se pueden detectar fácilmente en el líquido sinovial o el suero de pacientes afectados por artritis, por ejemplo artritis reumatoide. En un ejemplo, la detección de estas proteínas de transducción de señal en el sitio de la inflamación puede tener aplicación en el diagnóstico precoz o más simplificado de la artritis, o la diferenciación entre los distintos tipos de artritis en un paciente. Alternativamente, la presencia o los niveles relativos de isoformas de las proteínas 14-3-3 pueden ser un indicador pronóstico de artritis incipiente, antes de que evolucione a una forma debilitante. Una ventaja del diagnóstico o pronóstico precoz es la implementación más temprana de un régimen de tratamiento. Alternativamente, la presencia o los niveles relativos de isoformas de las proteínas 14-3-3 en una muestra de un paciente pueden ser útiles para determinar la idoneidad de un paciente para un régimen de tratamiento particular.

Los regímenes de tratamiento para diversos tipos de artritis son conocidos en el área. Los enfoques terapéuticos para la artritis se pueden caracterizar en general, por ejemplo, como terapia modificadora de la enfermedad para artritis, o terapias de remisión. Por ejemplo, a un paciente con diagnóstico de artritis reumatoide se le pueden prescribir inicialmente medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), para aliviar el malestar y reducir la inflamación. Otros regímenes de tratamiento pueden incluir, por ejemplo inhibidores específicos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), glucocorticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), agentes neutralizantes anti-TNF-alfa o fármacos inmunosupresores o citotóxicos. Los detalles sobre dosificación o los ejemplos de fármacos particulares forman parte del conocimiento de los técnicos con experiencia y se pueden encontrar, por ejemplo en Harrison's Principles of Internal Medicine 15ª ed. BRAUNWALD et al eds. McGraw-Hill o "The Pharmacological basis of therapeutics", 10ª edición. HARDMAN HG., LIMBIRD LE. editors. McGraw-Hill, Nueva York, y en "Clinical Oncology", 3ª edición. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor.

En otro ejemplo, la presencia o los niveles relativos de proteína 14-3-3 eta se pueden correlacionar con la presencia o los niveles relativos de otras proteínas en la muestra del paciente, por ejemplo metaloproteinasas de matriz (MMP), como MMP-1 o MMP-3. Las MMP son endopeptidasas dependientes de cinc que degradan componentes de la matriz extracelular. Las MMP tienen diferentes especificidades de sustrato y son codificadas por genes diferentes. Se han identificado al menos 25 MMP diferentes. La detección de proteínas 14-3-3 eta o gamma en combinación con al menos una MMP en la muestra de un paciente puede tener aplicación en el diagnóstico precoz o más simplificado de la artritis, o en la diferenciación entre los distintos tipos de artritis en un paciente. Alternativamente, la presencia o los niveles relativos de las isoformas eta o gama de las proteínas 14-3-3 en combinación con al menos una MMP pueden ser un indicador pronóstico de artritis incipiente, antes de que evolucione a una forma debilitante.

Una ventaja del diagnóstico o pronóstico precoz puede incluir la implementación más temprana de un régimen de tratamiento. Alternativamente, la presencia o los niveles relativos de la isoforma eta de 14-3-3 en combinación con al menos una MPP en una muestra de un paciente pueden ser útiles para determinar la idoneidad de un paciente para un régimen de tratamiento particular.

5 En otro ejemplo, se proporciona un juego para detectar la presencia de proteínas 14-3-3 eta o gamma o MMP particulares en una muestra de un paciente, donde el juego es adecuado para proporcionar un resultado diagnóstico o pronóstico conveniente para diagnosticar o diferenciar distintos tipos de artritis. Un juego puede incluir, por ejemplo, anticuerpos específicos para la isoforma eta de las proteínas 14-3-3. Dicho juego puede incluir además anticuerpos específicos para MMP particulares. El juego puede incluir además otros reactivos necesarios para la detección de 14-3-3 eta o MMP inmunológicamente, como anticuerpos secundarios marcados, reactivos cromógenos o fluorógenos, agentes de polimerización y/o instrucciones para utilizar el juego con fines diagnósticos o pronósticos.

15 Métodos generales

Una vez que se identifica que un sujeto corre riesgo de tener o tiene artritis, la información útil para evaluar el estado de la enfermedad artrítica diagnosticada, la respuesta a un régimen de tratamiento terapéutico para la artritis, el pronóstico de la artritis, o el tipo de artritis se puede obtener del paciente o sujeto experimental. En el área se conocen diversos métodos para obtener muestras biológicas de un sujeto que contengan proteínas o péptidos que pueden ser útiles como biomarcadores. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de tejido por legrado, biopsia por aspiración con aguja o biopsia (central) con aguja, biopsia quirúrgica para tomar muestras de un tumor o biopsia por escisión, que puede implicar la eliminación total del tejido de interés. Alternativamente, se pueden obtener otras muestras corporales que contienen material genético, como líquido sinovial, cabello, esputo, orina, heces, semen, plasma, suero o sangre mediante métodos conocidos en el área.

La presencia de proteínas o péptidos específicos en una muestra biológica, o los niveles relativos de proteínas o péptidos específicos en una muestra biológica se pueden detectar por cualquiera de los varios métodos conocidos en el área. Los ejemplos de dichos métodos incluyen espectrometría de masas, técnicas inmunológicas como inmunotransferencia tipo western, ELISA, inmunohistoquímica, FACS, resonancia de plasmones superficiales o cromatografía. Métodos para estas y otras técnicas se pueden encontrar, por ejemplo, en AUSUBEL et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1998; ABELOFF, *Clinical Oncology*, 3ª edición. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004; HARLOW, E y LANE D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press; SAMBROOK J y RUSSELL DW. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press; Harrison's *Principles of Internal Medicine* 15ª ed. BRAUNWALD et al eds. McGraw-Hill. Métodos de detección de 14-3-3 se describen por ejemplo en WO 99/46401, US 2005/9094, WO 97/38315 y WO 97/33601. WO 98/26193 da a conocer métodos de detección de isoformas de 14-3-3, por ejemplo mediante el uso de anticuerpos específicos contra la isoforma eta de 14-3-3.

40 Inmunotransferencia tipo Western

Se sometió líquido sinovial o suero (2 µl de cada uno) un análisis SDS-PAGE con 12% (peso/vol) de gel de acrilamida y se electrotransfirió a membranas de PVDF (Millipore Corporation). Las proteínas no específicas de las membranas se bloquearon en leche descremada en polvo al 5% en PBS con 0.1% de Tween-20 durante toda la noche. La inmunotransferencia se realizó usando 2 µg/ml de 7 isoformas específicas de anticuerpos policlonales anti-14-3-3 humana de conejo (Martin H, Patel Y, Jones D, Howell S, Robinson K y Aitken A 1993. *Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein.* FEBS Letters. 331:296-303). Después las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados anti-IgG de conejo (Sigma, St Louis, EE.UU.) o anti-IgG de ratón (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.) conjugados a peroxidasa de rábano (dilución 1:2500). Después se visualizaron las proteínas inmunoactivas usando ECL + el sistema de detección de la inmunotransferencia tipo western (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Se usó lisado de queratinocitos (K) como control positivo. SF: líquido sinovial; PS: suero del paciente.

55 Muestras del paciente

Se obtuvo líquido sinovial de las articulaciones de la rodilla de pacientes con sinovitis activa antes de la iniciación del tratamiento anti-TNF. Todos los pacientes tenían un índice DAS >6.0. Se obtuvieron muestras de sangre emparejadas por procedimientos de venopunción corrientes. El coágulo se eliminó por centrifugación.

60 14-3-3 eta recombinante

Se preparó ADNc para 14-3-3 eta derivada de queratinocitos de ARN total extraído de queratinocitos humanos, se clonó y expresó en *E. coli* y se purificó por afinidad, siguiendo los métodos descritos en Ghahary et al 2004 J Invest

Dermatol 122:1188-1197. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR del ADNc de 14-3-3 eta fueron SEC. ID N°: 15 (GCGAATTCCTGCAGCGGGCGCGGCTGGCCGA) y SEC. ID N°: 16 (GCTCGAGCCTGAAGGATCTTCAGTTGCCTTC).

Ejemplos

5

Ejemplo 1

Expresión de 14-3-3 en el líquido sinovial y el suero de pacientes afectados por RA

- 10 Los niveles de las diferentes isoformas de las proteínas 14-3-3- β , γ , ϵ , η , τ , σ y ζ en muestras de líquidos sinoviales (SF) combinados y sueros (PS) combinados de pacientes se analizaron por inmunotransferencia tipo western con lisado de queratinocitos (K) como control positivo. Sólo se detectaron las isoformas η y γ en las muestras de SF y se tiñeron con mayor intensidad en comparación con las de PS. Las muestras de líquido sinovial de articulaciones de 17 pacientes con RA que presentaban sinovitis activa, pero que no habían recibido tratamiento anti-TNF también exhibieron expresión concordante de la isoforma η de 14-3-3 (Figura 2). Todos los pacientes tenían un índice de actividad de la enfermedad (DAS) superior a 6.0.

Ejemplo 2

- 20 Expresión de MMP en suero y líquido sinovial de pacientes

Para determinar si estas variaciones se correlacionaban con las de MMP-1 y MMP-3 en las mismas muestras sinoviales, se evaluaron simultáneamente un total de 12 muestras de líquido sinovial de RA y sus sueros emparejados, para determinar 14-3-3 η y γ , así como las proteínas MMP-1 y MMP-3 (Figura 3). Se detectó 14-3-3 η en todas las muestras. Se detectó MMP-1 en todas las muestras, tanto de SF como de PS, mientras que MMP-3 fue más variable en los niveles detectados. También se detectó la isoforma γ de 14-3-3 en las muestras de líquido sinovial y de suero de los pacientes (Figura 4 y 5).

- 30 La expresión de MMP-1 y MMP-3 demuestra una correlación significativa con la expresión de las isoformas η y γ de 14-3-3 tanto en el líquido sinovial como en el suero (tabla 1).

Tabla 1. Correlación de los niveles de proteínas MMP y 14-3-3 en suero y líquido sinovial.

	14-3-3 η en suero	14-3-3 η en liq. sinovial	14-3-3 γ en suero	14-3-3 γ en liq. sinovial
MMP-1	$r = 0.62$; $p = 0.02$	$r = 0.83$; $p = 0.03$	$r = 0.77$; $p = 0.02$	$r = 0.65$; $p = 0.03$
MMP-3	$r = 0.68$; $p = 0.01$	$r = 0.77$; $p = 0.003$	$r = 0.88$; $p = 0.03$	$r = 0.76$; $p = 0.04$

Ejemplo 3

- 35 Sensibilidad de la detección por inmunotransferencia tipo western de la proteína 14-3-3 en muestras de suero y líquido sinovial de pacientes.

40 Para determinar el nivel de detección de 14-3-3 η en muestras de líquido sinovial y suero, se combinaron muestras de 12 pacientes afectados por RA o normales, y se analizaron diluciones limitantes de las muestras combinadas por inmunotransferencia tipo western. 14-3-3 η fue detectable en un rango de diluciones tan bajo como 0.1 μ l de volumen eficaz de líquido sinovial y 1.0 μ l de volumen eficaz de suero (Figura 6A).

45 Se corrieron 2 μ l de la combinación de sueros normales (NS) o sueros de pacientes (PS) junto con concentraciones conocidas de 14-3-3 η recombinante, que variaban de 0.05 a 2.0 μ g. Se estimó que el volumen de 2 μ l de las muestras de NS y PS tenía aproximadamente 1-1.5 y 15-20 μ g de 14-3-3 η , respectivamente (Figura 6B). Esto sugiere que el nivel de 14-3-3 η es 10 veces mayor en el suero de los pacientes afectados por AR en comparación con el de los pacientes normales.

Ejemplo 4

Detección de 14-3-3 η antes y después de tratamiento anti-TNF

- 55 La figura 7 ilustra la detección secuencial de los niveles de proteína 14-3-3 eta en 4 ml de muestras de suero de pacientes con RA antes (U) y después del tratamiento anti-TNF- α (T). N = control negativo que es 4 ml de una muestra de sueros combinados preparada a partir de 12 muestras de suero de 12 individuos sanos. P = control positivo que es 4 mg de proteína total de lisado de queratinocitos.

Referencias

1. Harris ED Jr., History and Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: How long has it affected us, and who is at risk?
5 In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 21-27.
2. Harris ED Jr., Introduction. In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: xix-xxiii.
3. Harris ED Jr., Rheumatoid Synovium: Complex, and More Than the Sum of its Parts. In: Rheumatoid Arthritis.
Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 127-149.
5. Firestein GS. (1997). Rheumatoid synovitis and pannus. In: J.H. Klippel and P.A. Dieppe, Editors, Rheumatology,
10 Mosby, London , pp. 5/13.1-5/13.5, 1997.
6. Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S. (2000). Arthritis Rheum. 43: 1226-1232.
7. Tolboom TCA, Pieterman E, van der Laan WE. Ann. Rheum. Dis. 61: 975-980, 2002.
8. Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O. Arthritis Rheum. 22: 44-53, 1992.
9. Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Arthritis Rheum. 40:1391-1399, 1997.
- 15 10. Ahrens D, Koch AE, Pope RM. Arthritis Rheum. 39:1576-1587, 1996.
11. Smeets TJM, Dayer JM, Karan MC. Arthritis Rheum. 43:270-274, 2000.
12. Poole AR; Cartilage in health and disease. In: Koopman WJ. Ed. Arthritis and Allied conditions. A textbook of
rheumatology. 14th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2001: 226-284.
13. Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, et al. Matrix Biol. 17:585-601, 1998.
- 20 14. Katrib.A, McNeil HP, Youssef PP: Inflamm. Res. 51: 170-175, 2002.
15. Harris ED Jr., Cytokines, Lymphokines, Growth Factors, and Chemokines. In: Rheumatoid Arthritis. Philadelphia:
W.B. Saunders Company, 1997: 105-125.
16. Jasser, M.Z., Mitchell P.G. and Cheung, H.S.: induction of stomelysin-1 and collagenases synthesis in
fibrochondrocytes by TNF-alpha. Matrix Biology 14: 241, 1994.
- 25 17. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, Dayer JM. Arthritis Rheum. 41 (10):1748-59,
1998
18. Y. Yamamura, R. Gupta, Y. Morit, X. He, R. Pai, J. Endres, A. Freiberg, K. Chung and D.A. Fox. J. Immunol. 166
(2001), pp. 2270-2275
19. Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Perez de Ayala C, Martin-Mola E. J. Immunol. 173:1463-1476,
30 2004
20. Cho ML, Yoon CH, Hwang CY. Arthritis Rheum. 50:776-784, 2004
21. Bombara MP, Webb DL, Conrad P. J. Leukocyte Biol. 54: 399-406,1993.
22. McInnes IB, Leung BP, Liew FY. Arthritis Res. 2(5):374-8.34, 2000.
23. FU H, Subramanian RR, Masters SC:Annu Rev Pharmacol Toxicol 40:617-647, 2000.
- 35 24. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG: N Engl J Med 335:924-30, 1996
25. Wilker E, Yaffe MB: J Mol Cell Cardiol 37: 633-642, 2004.
26. Moore et al. 1967.
27. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H (1987) FEBS Lett. 219:79-82.
28. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Akahashi Y (1988).. Proc Natl Acad Sci USA,
40 85:7084-8.
29. Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Atiken A 1990. Eur J Biochem 191:421-429.
30. Craparo A, Freund R, Gustafson T (1997). J Biol Chem 272:11663-69.
31. Yaffe MB (2002). FEBS Lett 513(1):53-57.
32. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. Mol Cell 1:3-
45 11, 1997.
33. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Nature 401:616-620, 1999.
34. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH (2000). J. Biol. Chem. 275:23106-23112.
35. Boston PF, Jackson P, Thompson RJ. J. Neurochem. 38, 1475-82, 1982.
36. Katz AB, Taichman, LB. J Invest Dermatol 112:818-821, 1999.
- 50 37. Ghahary A, Karimi-Busheri F, Marcoux Y, Li Y, Tredget EE, Kilani RT, Li L, Zheng J, Karami A, Keller B, Weinfeld
M. J. Invest. Dermatol. 122(5): 1188-1197, 2004.
38. Ghaffari A, Li Y, Karami A, Ghaffari M, Tredget EE, Ghahary A. J. Cell. Biochem. Jan. 2006.
39. Jamal O.S., Ann Rheum Dis 57, 1998, 550-558.
- 55 SEC. ID N°:1
proteína 14-3-3 beta
Nomenclatura alternativa:
Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma beta
YWHAB
- 60 PROTEÍNA CEREBRAL 14-3-3, ISOFORMA BETA
14-3-3-BETA

MTMDKSELVQAKLAEQAERYDDMAAAMKAVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSW
RVISSIEQKTERNEKKQQMGKEYREKIEAELQDICNDVLELLDKYLIPNATQPESKVFYLYK
MKGDFRYLSEVASGDNKQTTVSNSQQAYQEAFFEISKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYFEI
LNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLNEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSENQGDGEGDAG

SEC. ID N°: 2

Proteína 14-3-3 gama

5 Nomenclatura alternativa:

Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma gama
YWHAG

MVDPEQLVQKARLAEQAEGYDDMAAAMKNVTELNEPLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWR
VISSIEQKTSADGNEKIEVMRAYREKVEKELEAVCQDVLSLVDNYLYKNCSETQYERKDLY
LKMKGDIYRYLAEVATGEKRGDVVESSEKAYSEREISKEHMQPTHPIRLGLALNYSVFYFE
IQNAPEQACHLAKTEFEDAIAELDTLNEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDDHDGEGEG
NN

10 SEC. ID N°: 3

Proteína 14-3-3 eta

Nomenclatura alternativa:

Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma eta
YWHAH

15 proteína cerebral 14-3-3, isoforma eta

proteína de activación de la tirosina 3 monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa 1;
YWHA1

MGDREQLLQRRARLAEQAERYDDMASAMKAVTELNEPLSNEDRNLLSVAYKNVVGARRSSWR
VISSIEQKTMADGNEKKLEKVKAYREKIEKELETVCNDVLSLLDKFLIKNCNDFQYESKVF
YLKMKGDIYRYLAEVASGEKKNSVVEASEAAYKEAFESKEQMPTHPIRLGLALNFSVFY
YEIQNAPEQACLLAKQAFDDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDEEAGE

20 SEC. ID. N°: 4

Proteína 14-3-3 epsilon

Nomenclatura alternativa:

Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma epsilon
YWHAE

25 Isoforma epsilon

MDDREDLVYQAKLAEQAERYDEMVESMKKVAGMDVELTVEERNLLSVAYKNVIGARRASWR
IISIEQKEENKGGEDKLKMIREYRQMVETELKLICCDILDVLDKHLIPAANTGESKVFYF
KMKGDYHRYLAEFATGNDRKEAAENSLVAYKAASDIAMTELPPTHPIRLGLALNFSVFYFE
ILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDMQGDGEEQNK
EALQDVEDENQ

30 SEC. ID. N°: 5

Proteína 14-3-3 sigma

Nomenclatura alternativa:

Estratifina

MERASLIQKAKLAEQAERYEDMAAFMKGAVEKGEELSCEERNLLSVAYKNVVGQRAAWRV
LSSIEQKSNEEGSEEKGPEVREYREKVETELQGVCDTVLGLLDShLIKEAGDAESRVFYLK
MKGdYYRYLAEVATGDDKKRIIDSARSAYQEAMDISKKEMPPTNPIRLGLALNFSVFHYEI
ANSPEEAI SLAKTTFDEAMADLHTLSEDSYKDSTLIMQLLRDNLTlWTADNAGEEGGEAPQ
EPQ

SEC. ID N°: 6

Proteína 14-3-3 tau

5 Nomenclatura alternativa:

Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma tau
YWHAQ

PROTEÍNA 14-3-3, LINFOCITO T

14-3-3-DSEDA

10 HS1

MEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGRRSAWRV
ISSIEQKTDTSDDKLQLIKDYREKVESELRSICTTVLELLDKYLIANATNPESKVFYLKMK
GDYFRYLAEVACGDDRKTIDNSQGAYQEAFDISKKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILN
NPELACTLAKTAFDEAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTlWTSDSAGEECDAAEGAE
N

SEC. ID N°: 7

Proteína 14-3-3 dseda

15 Nomenclatura alternativa:

Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptofano 5-monooxigenasa, isoforma dseda
YWHAZ

Proteína cerebral 14-3-3

20 Isoforma dseda

MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRV
VSSIEQKTEGAEEKQOMAREYREKIETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLKMK
GDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQEAFEISKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYIEILN
SPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTlWTSDTQGDEAEAGEGGE
N

25 SEC. ID N°:8

ADN c 14-3-3 beta (NM_139323) 3015 nt

GCGGAAGTGGAGCTACCGCCACCGCCGCCGCGATTCCGGAGCCGGGGTAGTCGCCGCCGC
 CGCCGCCGCTGCAGCCACTGCAGGCACCGCTGCCGCCGCTGAGTAGTGGGCTTAGGAAGG
 AAGAGGTCATCTCGCTCGGAGCTTCGCTCGGAAGGGTCTTTGTTCCCTGCAGCCCTCCAC
 GGAATGACAAATGGATAAAAGTGAGCTGGTACAGAAAGCCAAACTCGCTGAGCAGGCTGAG
 CGATATGATGATATGGCTGCAGCCATGAAGGCAGTCACAGAACAGGGGCATGAACTCTCCA
 ACGAAGAGAGAAATCTGCTCTCTGTTGCCTACAAGAATGTGGTAGGCGCCCGCCGCTCTTC
 CTGGCGTGTCTATCTCCAGCATTGAGCAGAAAACAGAGAGGAATGAGAAGAAGCAGCAGATG
 GGCAAAGAGTACCGTGAGAAGATAGAGGCAGAACTGCAGGACATCTGCAATGATGTTCTGG
 AGCTGTTGGACAAATATCTTATTCCCAATGCTACACAACCAGAAAGTAAGGTGTTCTACTT
 GAAATGAAAGGAGATTATTTTAGGTATCTTTCTGAAGTGGCATCTGGAGACAACAAACAA
 ACCACTGTGTGCAACTCCAGCAGGCTTACCAGGAAGCATTGAAATTAGTAAGAAAGAAA
 TGCAGCCTACACACCCAATTTCGTCTTGGTCTGGCACTAAATTTCTCAGTCTTTTACTATGA
 GATTCTAAACTCTCCTGAAAAGGCCTGTAGCCTGGCAAAAACGGCATTGATGAAGCAATT
 GCTGAATTGGATACGCTGAATGAAGAGTCTTATAAAGACAGCACTCTGATCATGCAGTTAC
 TTAGGGACAATCTCACTCTGTGGACATCGGAAAACAGGGAGACGAAGGAGACGCTGGGGA
 GGGAGAGAACTAATGTTTCTCGTGCTTTGTGATCTGTTTCACTGTCTGTACCTCAAC
 ATATATCCCTTGTGCGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAATCGTACGTCGACTTT
 CGATTTTTTACAGCCTCAGCCTAGGAAAAATGGTTCATGGGATAAACAGCTGGTATTTGTA
 TCTAAAACTCAGATTGGTCACATAAAATGCCACGGCATTCCGAAGTTTTGATTTTGATTAAC
 ATTGACAGGATTACTGTGTGTTAATTTTTTAAAACTGAACACTGTGATTATGGGGTTTT
 GTAATTTAGCAGAACTCTTACTGGTAGAAAAATAGACCTGAATTATGTGTAACTTTTTG
 AAGGTTTAATCTGATATCAAAATAATCATTGAAATACAATTCCATTGTAAAGTTGTACAGA
 AAGTTATAGAGATTATATTGTGATGCTGGAACCTGGAGTGAGACACACATCATTGGCATT
 TGAGTTGAATGGTAATTCACAGTAATGCTGCCGTTGTTTCGGGACTTAAAGACACTTGACCT
 GTTTGGGCTGTTGCCACTTAAAAGTTCATGACCACAAATGTCCACAGTGTCTTCCTCTGAG
 GAAACTCGAATCCTGAAATGGAAATCTTTGTGGCAGATAACTGGCTTATGACACCTTGAA
 AAGTTCAAGTGCTCATATAACACACCACACTGAACCCCTTTCCTACAGCAATATGTTTAC
 TATGTTACCAATTTGCAACTTGTGCTTCAATAGTGGAATCTACTTTCATTGTTAACTGTA
 GCTAAAGAAAAAAGCCGTGTGTTTTATGAATGACCTTATCTGTTTCCTGGATAATACCTT
 TAAGAATAATGTCCTGAGTCAGGCGTGGTGGTGCCTGCATCTAGTCCCAACTATTTGGGAG
 GCTGAGGCAGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTTAAAGCTGCAGTGCCCTGTGGTTGCAC
 CTGTGAATAACTGCACTCCAGCCTGGGCAACATAGCGAGACCTCATCTCCAAAAAGAAAA

CAAAAAACAAAAAAGGAATGATGTTCTGTAGAGATGGCCTTTCACCTTGAGGAGTACTCAG
TTTTTCAGGTTCTTCCTAGCTCGGGGCTTTTAAATTTTGAAATCTAAACATTCTTTCCCACC
ATCCTTTTTGACTGTTGACCTTGGTTTTCTCTTCTAAGTTTCTGTCCCTCTGCTTCCTTAC
TTTTTTTTCTTTTTGAATTCTATCTTTATCTGTCTTTTGTTCACTTTTTAATGCTATATAT
GGGCAGGGGTGAGAGACATTACTGAGCACCTTGGTGAGCAAGCCTGGCTTTAAAGATTGGA
GAAGAGCTTCTGGCACCAGAACCCTGTCTTCCTCCAGTTCTCAACACGGTGTTGCTCTTCA
GTCATACCGGAATCTGAATCAAAAAAGTATTTTTTAAATATCCATGATTTCTCCCTGTATTG
AGGCTAGCCCTGATCATGCTTTTTGTGCCTGTCACCAGGTCTCCCAAGTGCACTCATCCAG
GTCAGTGCTCAGATGTGTTTAAGGAGACCCCTATATTAGGGAAGTTGCGTGAACACTGCAG
TGGGGAGAATTGAGAATAGTCAGGCCCTATCAGTCTCACAGAATCACCCCTCTACCTTTGAT
ATTCCACTTAGCTGTAGAGTCCATCTGTTTGTCCATCTGCTGAAATGAGAAAAGAAAAATT
TATGCACTGATTTAAAACAAACCAAAAAAAGAAAAAACAACAAAAAATCCCTCCTT
TCTAGCTGAACAAAAATGTGCAGTTAATACTTGGCGCTTGAAAATGCAGTAGTGAATGTGG
AACCAAGCCTGTCTGTATATCTGGTAGCTCTTTTCTTGCTTTGTTTTTTCTTACCAGTATT
CTGCCTAACGTTTGTCTTCTGTGATGGTTATATTGCCTAGCAAGCACACCCGTGGTTGTGAA
AATAGTATAGCAAAAAAGAAAAATCCCCGTTATTGATGTACTAGATTTGTGTATGTCTTT
TAAACAGTTCTAGTTTCACCTTACACAGAATAATCAGGAAAAGTGTAATAATTCAAAAGTG
AAATAAAAATTTTATCAGTTAAAAAA

SEC. ID N°: 9

ADN c 14-3-3 gamma (NM_012479) 3747 nt

5

CAGCAGCCGCAGCCGCCTCGCGCCCGGTCCCGCGGTGCGAGCTCCAGCCGCCTCCTCCGCG
CAGCCGCCGCCTCAGCTGCTCGCTCTGTGGGTGCGTCTCTCCGGCACTTGGGCTCCAGTC
GCGCCCTCCAAGCCCTTCAGGCCGCCCCAGTGTCTCCTCCTTCTCCGGCCAGACCCAGCC
CCGCGAAGATGGTGGACCGCGAGCAACTGGTGAGAAAGCCCGGTGGCCGAGCAGGCCGA
GCGCTACGACGACATGGCCGCGGCCATGAAGAACGTGACAGAGCTGAATGAGCCACTGTGCG
AATGAGGAACGAAACCTTCTGTCTGTGGCCTACAAGAACGTTGTGGGGGCACGCCGCTCTT
CCTGGAGGGTCATCAGTAGCATTGAGCAGAAGACATCTGCAGACGGCAATGAGAAGAAGAT
TGAGATGGTCCGTGCGTACCGGGAGAAGATAGAGAAGGAGTTGGAGGCTGTGTGCCAGGAT
GTGCTGAGCCTGCTGGATAACTACCTGATCAAGAATTGCAGCGAGACCCAGTACGAGAGCA
AAGTGTCTACCTGAAGATGAAAGGGGACTACTACCGCTACCTGGCTGAAGTGGCCACCGG
AGAGAAAAGGGCGACGGTGGTGGAGTCTCCGAGAAGGCCTACAGCGAAGCCACGAGATC

AGCAAAGAGCACATGCAGCCCACCCACCCCATCCGATTAGGCCTGGCTCTTAACTACTCCG
 TCTTCTACTATGAGATCCAGAACGCCCCAGAGCAAGCGTGCCACTTGGCCAAGACCGCGTT
 CGACGACGCCATCGCCGAGCTTGACACCCTCAACGAGGACTCCTACAAGGACTCCACGCTC
 ATCATGCAGCTCCTCCGCGACAACCTCACGCTCTGGACGAGCGACCAGCAGGACGACGATG
 GCGGCGAAGGCAACAATTAAGGCCCCAGGGGAAGTGGCAGCGCACGCGGATGCTACTACTG
 CAGTCTTTATTTTTCCTATGAGTTGGGGTTCGGGTGGGGGAGGGAAAGGGAGGGATGAC
 CTTCCAGGGAGAAACCCACGACCTGTCTGTCTTTGATCGCCTCTTTGACATTTTTGCCA
 AAATACCACTAGTGGAAGTCAGGCTAGCTGTGCTGGTATTGGAATAGCAGCCTCACACTG
 GCGTCTGGAAGTCTGTAGATTATGCAAGTGGAGCTGTCTGTCTCTAATTTAACTTATT
 GCTAGATAATAGGGTTTTTCAGATGAAAAGAAAACCTTAAAGAGGAATGGCCCTCATTAGTA
 AGTTCTGTGGTTCAGTAAGGATTTTTATGTACATACGCTCTCGTCTCTCGTTTTGGGTAC
 TTTCTATCTCATCTGTCTCGGCTCTGCATGTTTTCCAGGGTGTAGCCTACAGACATGGAAC
 AGTGTAATCCAGACTGACAGACTTAGAACCTGAGGTCTCATTATCCTTATGGTTTTAGG
 CCTTGCCAGTTTTCCGAAGTCTCTGATTAGTTGACAGTATTAACACTAAATTGCAGTTTAC
 AGTATTTCTACATTACAGCCATATGTAACATCAAGCCATCGATTGTGTACTTTTCCTTTGC
 TAGTTGTTTGGGCTTTAACATCCTTATTCAGCCTTATCCAGGTGGTTTTGCTGTTGATCG
 GTCTCCTAGGCTAAATGAGAATGAAAGCGACTTCAGGTTTTTGGTTCATAGGTGCTCGGCA
 GGTGGCTGTGGGATTTTTTTTTTTTTTGGTCTCTTTTCTCTTAACGTAAATCCACCACC
 AAAATTATTAATCCTCTTGAGAGAAACGTGAAACGCCACAAAAATAGAGAAAATTCAGGTC
 TGTATGTATGATCGTGTGGTATTTTCAGAGAACATCCCGCTTCTGAAGCTGCTGCAGC
 TCCCTCCTCAGGGATCACACTGCCGTCAACCACTCTGCACTGGGGCGTTTCCTACTGCGCC
 TCGTGCTGGCGGACGCAGCTGGGTGCAGAAGCTGTGGGGTCGGAGAGGCGTTTGGAGAAGG
 TCTGTGGTGCAAGTGTGTGAAAATTCAGGTGCTAGAAGCCTACTGGTAGAAAAACCCAAAAG
 GAAGAGCTATATCCTTAACATTCTGTCCAATTTCCGGAGCCTTGTCAGTGTGTGAGTTTT
 TCCTCCCCGAAGACACTCCTTCCCCAAGTAATTGTAGGAAGATAAAAAACTGTTACCAGA
 TAACAAACACTGAACTCCTATTTGACCAGAACTTTTTCTCTCGAGATAGTTTTTTCTTTT
 TAATGAAAAAAGCATAGGAATTGGAGATTGGCTTGTCTCACGCAGCCAGTGCACATTTGGA
 ATTGACGGAAACAACGTTGCTATTTCCACCCATTTGTTTTCCGGCAGCCTTAAGGCCCTCAT
 TCTCATTTCCGGGTGAATCTGTCTATCTGTGAACGTGGCCCGCATGTGCATTCTTTTTTTTA
 TATATATAAAGTCAGTGACGAGGAACTCCCGAGACGTGTAATGACACCACACTTGTTTTCT
 TTGTTTCTTTGTTTTATTTAGGCAAGAAGAGGTGTGAGTAATTGAGGAAAACTGACAGAT
 GCTTTTGCTAATACCAAAATTGAGCTTACAATTAGGAACTGAGTATGTGTAACAGGATACA

GGTGACAGTGAAGATAGAAGAACCACGATGACCACAGACTCAATGTGCTCTGTAACATCGC
ACAGTTTACCCAGCATGACTTTCCCTTAGGAGGCCCCCTCCTCACGCTAGAGTAAAAGTCCC
AGTTAAGTGAAGCCTACCAGAAGAACTAGTAGAAGAAGCTTTGCCGCTTTTGTGCCTCTCA
CAGGCGCCTAAAGTCATTGCCATGGGAGGAAGACGATTTGGGGGGGAGGGGGGGGGCAGG
GTAGGTGGGGCTTTCCCTAATTTATCTTCATGTCCAGTGAGCAGTGTTGCGTTTTTCCTTG
TAGCATTTGGAAATGATTTACTGGAATTACAAAACCTATTTTTCCTTTAAATTTTCACTTT
GGCTCTGGCTGCTTTTTAGGAATAATGCAAGATAAAAATCACACCTGAGGGCTGAAAACGGA
GAGGGAATGGGAGACTTGATATTTAAGCAGCTTGAATGGTTTTTCTTTTCTTTATTTTTAA
AGAAATGCACTTGCCTATGATACTGTCTCTCCAGTGAAATGATTACTCCTCCATTACTCTA
TTGATACAATATTGTGCATGCTAGTGTTGTATTTCTATACAGTAGCTTGAAATTGATTAAC
TTATACTGTAGGTGTTATGTATTCCTATGACAAAAAAATTAAGTCTTCAAATTTTTTAA
GGTTTTTTTTTTTTTAATTTAATTTTTCCCTTTTGGGGGTAAAGTTTGCTCTACCAAATAGTG
ATTGTAACAAATTGATCTGTTTTGGATGTTGCTATAGTGACATGCAGTTATATATTTTGTT
TTTAAAGGGGGGGAGCAAAAGAAACACCAGTGTTAGCTTAATCTTAATGTCTGGTGTTTG
TCATGGTGAAATTATACTATTACAGTGTTGGAGAACAACAAATATGTTCTCTGAATGAGC
CTTTGTGCTTTTTGTGATGTTATGCAGTGAACCTATTTTAAAGGTCTAATCAGTGATTATTT
TTCCAGCTCCGTGTTTCTCTAAGGAATTATTTACACACGGACCATCTTTAGCAGTTTCCT
CAGTGATGGAATATCATGAATGTGAGTCATTATGTAGCTGTCTGACATTGAGCAAATAAAC
TTACAGATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEC. ID N°: 10
ADNc 14-3-3 epsilon (NM_006761) 1810 nt

CGGATTGAGGCGCCGCCATTTTTGCTGCCCCGACGCGGAGCGAGAGGCTGAGAGAGTCGGA
 GAACTATCCGCTTCCATCCGTGCGCAGACCCTGCCGGAGCCGCTGCCGCTATGGATGAT
 CGAGAGGATCTGGTGTACCAGGCGAAGCTGGCCGAGCAGGCTGAGCGATACGACGAAATGG
 TGGAGTCAATGAAGAAAGTAGCAGGGATGGATGTGGAGCTGACAGTTGAAGAAAGAAACCT
 CCTATCTGTTGCATATAAGAATGTGATTGGAGCTAGAAGAGCCTCCTGGAGAATAATCAGC
 AGCATTGAACAGAAAGAAGAAAAAAGGGAGGAGAAGACAAGCTAAAAATGATTGGGAAT
 ATCGGCAAATGGTTGAGACTGAGCTAAAGTTAATCTGTTGTGACATTCTGGATGTACTGGA
 CAAACACCTCATTCAGCAGCTAACTGGCGAGTCCAAGGTTTTCTATTATAAAATGAAA
 GGGGACTACCACAGGTATCTGGCAGAATTTGCCACAGGAAACGACAGGAAGGAGGCTGCGG
 AGAACAGCCTAGTGGCTTATAAAGCTGCTAGTGATATTGCAATGACAGAACTTCCACCAAC
 GCATCCTATTGCTTAGGTCTTGCTCTCAATTTTTCCGTATTCTACTACGAAATTCTTAAT
 TCCCCTGACCGTGCTGCAGGTTGGCAAAAGCAGCTTTTGATGATGCAATTGCAGAACTGG
 ATACGCTGAGTGAAGAAAGCTATAAGGACTCTACACTTATCATGCAGTTGTTACGTGATAA
 TCTGACACTATGGACTTCAGACATGCAGGGTGACGGTGAAGAGCAGAATAAAGAAGCGCTG
 CAGGACGTGGAAGACGAAATCAGTGAGACATAAGCCAACAAGAGAAACCATCTCTGACCA
 CCCCCTCCTCCCATCCCACCCTTTGGAAACTCCCCATTGTCACTGAGAACCACCAAATCT
 GACTTTTACATTTGGTCTCAGAATTTAGGTTCCCTGCCCTGTTGGTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTAAACAGTTTTCAAAGTTCTTAAAGGCAAGAGTGAATTTCTGTGGATTTTACTGGTCC
 CAGCTTTTAGGTTCTTAAAGACACTAACAGGACTACATAGAGGCTTTTTCAGCATTACTGT
 GTCGTCTCCGTGCCAGATGTGGCAAGATCACCATTAGCAAATGGAAATTACATTTGAAAGC
 CATTAGACTTATAGGTGATGCAAGCATCTAAGAGAGAGGTTAATCACACTATAGAGGCATA
 AGTGGTATCAGTTTTCATTTTTCTAATTGTTTAAACTGTGTTTTATACCAGTGTGTGCAAG
 TAATTGGGTGTTAGCTTGAGATGGTTAAAGGTGGTTTGGGGAGGGACTTCGTTGTAATGGT
 TTTGCTGTAAAAAATGTTTCCAACCTCCGCTGAAATGTTGCTGAAAAGCATGGTGCTGGTAA
 CAGTTCAACAATCCGTGGCTGCTCATTCTTGCCCTACTTTACTCTCCCACTGAAGCAGGTTA
 GCGTTGAAGGTGGTATGGAAAAGCCTGCATGCCTGTTCAATTCTTTTGTCTTCTCCTTC
 CCCCTCCCCCTACCTCCTTCCCCTCACTCCTCCCCTCCTTCGCTCGCTCAACCTCTTTTGT
 TCAGTATGTGTAACCTTGAAGCTAATTTGTACTACTGGATATCTGACTGGAGCCACAGATAC
 AGAATCTGTATTGTTCTTACTGAAACACAGCATGGAATTAACATTAAACTTAAATAAAAAA
 AACCTAAATTAAAAA

SEC. ID N°: 11

ADNc 14-3-3 eta (NM_003405) 1807 nt

GCGGCCGCGTCTCCTCCCTCGGCGTTGTCCGCGGCGGAGCCACAGCGCGGGGGCGAGCC
 AGCGAGAGGGCGCGAGCGGCGGCGCTGCCTGCAGCCTGCAGCCTGCAGCCTCCGGCCGGCC
 GCGGAGCCAGTGC GCGTGC GCGGCGGCGGCCCTCCGAGCGACCGGGGAGCGGACTGACCGG
 CGGGAGGGCTAGCGAGCCAGCGGTGTGAGGCGCGAGGCGAGGCCGAGCCGCGAGCGACATG
 GGGGACCGGGAGCAGCTGCTGCAGCGGGCGCGGCTGGCCGAGCAGGCGGAGCGCTACGACG
 ACATGGCCTCCGCTATGAAGGCGGTGACAGAGCTGAATGAACCTCTCTCCAATGAAGATCG
 AAATCTCCTCTCTGTGGCCTACAAGAATGTGGTTGGTGCCAGGCGATCTTCTTGAGGGTCT
 ATTAGCAGCATTTAGCAGAAAACCATGGCTGATGGAAACGAAAAGAAATTTGGAGAAAGTTA
 AAGCTTACCGGGAGAAGATTGAGAAGGAGCTGGAGACAGTTTGCAATGATGTCCTGTCTCT
 GCTTGACAAGTTCCCTGATCAAGAACTGCAATGATTTCCAGTATGAGAGCAAGGTGTTTTAC
 CTGAAAATGAAGGGTGATTACTACCGCTACTTAGCAGAGGTGCTTCTGGGGAGAAGAAAA
 ACAGTGTGGTGAAGCTTCTGAAGCTGCCTACAAGGAAGCCTTTGAAATCAGCAAAGAGCA
 GATGCAACCCACGCATCCCATCCGGCTGGGCCTGGCCCTCAACTTCTCCGTGTTCTACTAT
 GAGATCCAGAAATGCACCTGAGCAAGCCTGCCTCTTAGCCAAACAAGCCTTCGATGATGCCA
 TAGCTGAGCTGGACACACTAAACGAGGATTCCTATAAGGACTCCACGCTGATCATGCAGTT
 GCTGCGAGACAACCTCACCTCTGGACGAGCGACCAGCAGGATGAAGAAGCAGGAGAAGGC
 AACTGAAGATCCTTCAGGTCCCCTGGCCCTTCTTCAACCCACACCCCCATCATCACCGAT
 TCTTCCTTGCCACAATCACTAAATATCTAGTGCTAAACCTATCTGTATTGGCAGCACAGCT
 ACTCAGATCTGCACTCCTGTCTCTTGGGAAGCAGTTTCAGATAAATCATGGGCATTGCTGG
 ACTGATGGTTGCTTTGAGCCACAGGAGCTCCCTTTTTGAATTGTGTGGAGAAGTGTGTTT
 TGATGAGGCATTTTACTATGCCTGTTGATCTATGGGAAATCTAGGCGAAAGTAATGGGGAA
 GATTAGAAAGAATTAGCCAACAGGCTACAGTTGATATTTAAAAGATCCATTTAAAACAAG
 CTGATAGTGTTCGTTAAGCAGTACATCTTGTGCATGCAAAAATGAATTCACCCCTCCAC
 CTCTTTCTTCAATTAATGGAAAACGTGTTAAGGGAAGCTGATACAGAGAGACAACCTTGCTCC
 TTTCCATCAGCTTTATAATAAACTGTTTAACGTGAGGTTTCAGTAGCTCCTTGGTTTTGCG
 TCTTTAAATTATGACGTGCACAAACCTTCTTTTCAATGCAATGCATCTGAAAGTTTTGATA
 CTTGTAACCTTTTTTTTTTTTTTTGGTTGCAATTGTTTAAGAATCATGGATTTATTTTTTGTA
 ACTCTTTGGCTATTTGCTCTTGTGTATCTGACAGCGCCATGTGTGTCAGCCCATGTCAATC
 AAGATGGGTGATTATGAAATGCCAGACTTCTAAAATAAATGTTTTGGAATTCAATGGGTAA
 ATAAATGCTGCTTTGGGGATATTAAAAA

5 SEC. ID N°: 12
 ADNc 14-3-3 tau (NM_006826) 2166 nt

GTGGTGGGACTCGCGTCGCGGCCGCGGAGACGTGAAGCTCTCGAGGCTCCTCCCGCTGCGG
 GTCGGCGCTCGCCCTCGCTCTCCTCGCCCTCCGCCCCGGCCCCGCGCCCGCCATG
 GAGAAGACTGAGCTGATCCAGAAGGCCAAGCTGGCCGAGCAGGCCGAGCGCTACGACGACA
 TGGCCACCTGCATGAAGGCAGTGACCGAGCAGGGCGCCGAGCTGTCCAACGAGGAGCGCAA
 CCTGCTCTCCGTGGCCTACAAGAACGTGGTTCGGGGGCGCAGGTCCGCCTGGAGGGTCATC
 TCTAGCATCGAGCAGAAGACCGACACCTCCGACAAGAAGTTGCAGCTGATTAAGGACTATC

GGGAGAAAGTGGAGTCCGAGCTGAGATCCATCTGCACCACGGTGCTGGAATTGTTGGATAA
 ATATTTAATAGCCAATGCAACTAATCCAGAGAGTAAGGTCTTCTATCTGAAAATGAAGGGT
 GATTACTTCCGGTACCTTGCTGAAGTTGCGTGTGGTGATGATCGAAAACAAACGATAGATA
 ATTCCCAAGGAGCTTACCAAGAGGCATTTGATATAAGCAAGAAAGAGATGCAACCCACACA
 CCCAATCCGCTGGGGCTTGCTCTTAACTTTTCTGTATTTTACTATGAGATTCTTAATAAC
 CCAGAGCTTGCCTGCACGCTGGCTAAAAACGGCTTTTGATGAGGCCATTGCTGAACTTGATA
 CACTGAATGAAGACTCATACAAAGACAGCACCCCTCATCATGCAGTTGCTTAGAGACAACCT
 AACACTTTGGACATCAGACAGTGCAGGAGAAGAATGTGATGCGGCAGAAGGGGCTGAAAAAC
 TAAATCCATACAGGGTGTCTCCTTCTTCCCTTCAAGAAACCTTTTACACATCTCCATTC
 CTTATTCCACTTGGATTTCCTATAGCAAAGAAACCCATTCATGTGTATGGAATCAACTGTT
 TATAGTCTTTTCACACTGCAGCTTTGGGAAAACCTTCATTCTTGATTTGTGTTTGTCTTGG
 CCTTCCTGGTGTGCAGTACTGCTGTAGAAAAGTATTAATAGCTTCATTTTATATAAACATA
 AGTAACTCCCAAACACTTATGTAGAGGACTAAAAATGTATCTGGTATTTAAGTAATCTGAA
 CCAGTTCTGCAAGTGACTGTGTTTTGTATTACTGTGAAAATAAGAAAATGTAGTTAATTAC
 AATTTAAAGAGTATTCCACATAACTTCTTAATTTCTACATTCCCTCCCTTACTCTTCGGGG
 GTTTCCTTTCAGTAAGCAACTTTTCCATGCTCTTAATGTATTCTTTTGTAGTAGGAATCCG
 GAAGTATTAGATTGAATGGAAAAGCACTTGCCATCTCTGTCTAGGGGTACAAATTGAAAT
 GGCTCCTGTATCACATACGGAGGTCTTGTGTATCTGTGGCAACAGGGAGTTTCTTTATTCA
 CTCTTTATTTGCTGCTGTTTAAAGTTGCCAACCTCCCCTCCCAATAAAAATTTCACTTACACC
 TCCTGCCTTTGTAGTTCTGGTATTCACTTTACTATGTGATAGAAGTAGCATGTTGCTGCCA
 GAATACAAGCATTGCTTTTGGCAAATTAAAGTGCATGTCATTTCTTAATACACTAGAAAAGG
 GGAAATAAATTAAAGTACACAAGTCCAAGTCTAAAACCTTTAGTACTTTTCCATGCAGATTT
 GTGCACATGTGAGAGGGTGTCCAGTTTGTCTAGTGATTGTTATTTAGAGAGTTGGACCACT
 ATTGTGTGTTGCTAATCATTGACTGTAGTCCCAAAAAGCCTTGTAAGAAATGTTATGCCCT
 ATGTAACAGCAGAGTAACATAAAATAAAAGTACATTTTATAAACCATTTACTATGGCTTTG
 TAACAATTGCATACCCATATTTTAAGGGACAGGTGAATTTACTACTTTCTAAAGTTTATTG
 ATACTTCCCTTTTATGTAAAATGTAGTAGTGATACCTATATTTCCACATTGTGCATTGTGA
 CAACTTGTCTAGGGATGCCTGGAAGTGATAAAATTGGACTGCATTTCTTAGAGTGTTTTT
 ACTATAGATCAGTCTCATGGGCCATCTCTTCCTCAGATGTAAATGATATCTGGTTAAGTGT
 TATATGGAATAAAGTGGACATTTTAAAACTA

SEC. ID N°: 13

ADNc 14-3-3 sigma (NM_006142) 1336 nt

GAGAGACACAGAGTCCGGCATTGGTCCCAGGCAGCAGTTAGCCCCGCCGCCCGCCTGTGTGT
 CCCCAGAGCCATGGAGAGAGCCAGTCTGATCCAGAAGGCCAAGCTGGCAGAGCAGGCCGAA
 CGCTATGAGGACATGGCAGCCTTCATGAAAGGCGCCGTGGAGAAGGGCGAGGAGCTCTCCT
 GCGAAGAGCGAAAACCTGCTCTCAGTAGCCTATAAGAACGTGGTGGGCGGCCAGAGGGCTGC
 CTGGAGGGGTGCTGTCCAGTATTGAGCAGAAAAGCAACGAGGAGGGCTCGGAGGAGAAGGGG
 CCCGAGGTGCGTGAGTACCGGGAGAAGGTGGAGACTGAGCTCCAGGGCGTGTGCGACACCG
 TGCTGGGCCTGCTGGACAGCCACCTCATCAAGGAGGCCGGGGACGCCGAGAGCCGGGTCTT
 CTACCTGAAGATGAAGGGTGACTIONACTACCGCTACCTGGCCGAGGTGGCCACCGGTGACGAC
 AAGAAGCGCATCATTGACTCAGCCCCGTGACCTACCAGGAGGCCATGGACATCAGCAAGA
 AGGAGATGCCGCCACCAACCCCATCCGCTGGGCCTGGCCCTGAACTTTTCCGTCTTCCA
 CTACGAGATCGCCAACAGCCCCGAGGAGGCCATCTCTCTGGCCAAGACCACTTTTCGACGAG
 GCCATGGCTGATCTGCACACCCTCAGCGAGGACTCCTACAAAGACAGCACCCCTCATCATGC
 AGCTGCTGCGAGACAACCTGACACTGTGGACGGCCGACAACGCCGGGGAAGAGGGGGGCGA
 GGCTCCCCAGGAGCCCCAGAGCTGAGTGTGCCCCGCCACCGCCCCGCCCTGCCCCCTCCAG
 TCCCCACCCCTGCCGAGAGGACTAGTATGGGGTGGGAGGCCCCACCTTCTCCCCTAGGCG
 CTGTTCTTGCTCCAAAGGGCTCCGTGGAGAGGGACTGGCAGAGCTGAGGCCACCTGGGGCT
 GGGGATCCCCTCTTCTTGACGCTGTTGAGCGCACCTAACCACTGGTCATGCCCCACCCC
 TGCTCTCCGCACCCGCTTCTCTCCGACCCCAGGACCAGGCTACTTCTCCCCTCCTCTTGCC
 TCCCTCCTGCCCCTGCTGCCTCTGATCGTAGGAATTGAGGAGTGTCCCGCCTTGTGGCTGA
 GAACTGGACAGTGGCAGGGGCTGGAGATGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGTGCGCGCGCGCCAGTGCAAGACCGAGATTGAGGGAAAGCATGTCTGCTGGGTGTGACCA
 TGTTTTCTCTCAATAAAGTTCCCCTGTGACACTCAAAAAAAAAAAAAA

SEC. ID N°: 14
 ADNc 14-3-3 zeta (NM_145690) 2876 nt

5

GCCTGTGAGCAGCGAGATCCAGGGACAGAGTCTCAGCCTCGCCGCTGCTGCCGCCGCCGCC
 GCCCAGAGACTGCTGAGCCCGTCCGTCCGCCGCCACCACCCACTCCGGACACAGAACATCC
 AGTCATGGATAAAAATGAGCTGGTTTCTCAGAAGGCCAACTGGCCGAGCAGGCTGAGCGATAT

GATGACATGGCAGCCTGCATGAAGTCTGTAAGTCTGAGCAAGGAGCTGAATTATCCAATGAGG
 AGAGGAATCTTCTCTCAGTTGCTTATAAAAAATGTTGTAGGAGCCCGTAGGTCATCTTGGAG
 GGTCTCTCAAGTATTGAACAAAAGACGGAAGGTGCTGAGAAAAAACAGCAGATGGCTCGA
 GAATACAGAGAGAAAAATTGAGACGGAGCTAAGAGATATCTGCAATGATGTACTGTCTCTTT
 TGGAAAAGTTCTTGATCCCCAATGCTTCACAAGCAGAGAGCAAAGTCTTCTATTTGAAAAAT
 GAAAGGAGATTACTACCGTTACTTGGCTGAGGTTGCCGCTGGTGATGACAAGAAAGGGATT
 GTCGATCAGTCACAACAAGCATAACCAAGAAGCTTTTGAAATCAGCAAAAAGGAAATGCAAC
 CAACACATCCTATCAGACTGGGTCTGGCCCTTAACCTCTCTGTGTTCTATTATGAGATTCT
 GAACTCCCCAGAGAAAGCCTGCTCTCTTGCAAAGACAGCTTTTGATGAAGCCATTGCTGAA
 CTTGATACATTAAGTGAAGAGTCATACAAAGACAGCACGCTAATAATGCAATTACTGAGAG
 ACAACTTGACATTGTGGACATCGGATACCCAAGGAGACGAAGCTGAAGCAGGAGAAGGAGG
 GGAAAATTAACCGGCCTTCCAACCTTTGTCTGCCTCATTCTAAAATTTACACAGTAGACCA
 TTTGTCTATCCATGCTGTCCACAAATAGTTTTTTGTGTTTACGATTTATGACAGGTTTATGTT
 ACTTCTATTTGAATTTCTATATTTCCCATGTGGTTTTTATGTTTAATATTAGGGGAGTAGA
 GCCAGTTAACATTTAGGGAGTTATCTGTTTTTCATCTTGAGGTGGCCAATATGGGGATGTGG
 AATTTTTTATACAAGTTATAAGTGTGTTGGCATAGTACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAAAAAG
 GGCCAGTGTA AAACTGCTTCCATGTCTAAGCAAAGAAAAGTGCCTACATACTGGTTTTGTCC
 TGGCGGGGAATAAAAAGGGATCATTGGTTCCAGTCACAGGTGTAGTAATTGTGGGTACTTTA
 AGGTTTGGAGCACTTACAAGGCTGTGGTAGAATCATACCCCATGGATACCACATATTAAAC
 CATGTATATCTGTGGAATACTCAATGTGTACACCTTTGACTACAGCTGCAGAAGTGTTCCT
 TTAGACAAAAGTTGTGACCCATTTTACTCTGGATAAGGGCAGAAAACGGTTCACATTCCATTA
 TTTGTAAAGTTACCTGCTGTTAGCTTTCATTATTTTTTGCTACACTCATTTTATTTGTATTT
 AAATGTTTTTAGGCAACCTAAGAACAAATGTAAAAGTAAAGATGCAGGAAAAATGAATTGCT
 TGGTATTCATTACTTCATGTATATCAAGCACAGCAGTAAAAACAAAACCCATGTATTTAAC
 TTTTTTTTAGGATTTTTTGCTTTTGTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATACTTGCCTAACAT
 GCATGTGCTGTAAAAATAGTTAACAGGGAAATAACTTGAGATGATGGCTAGCTTTGTTTAA
 TGTCTTATGAAATTTTCATGAACAATCCAAGCATAATTGTTAAGAACACGTGTATTAAATT
 CATGTAAGTGGAATAAAAGTTTTATGAATGGACTTTTCAACTACTTTCTCTACAGCTTTTC
 ATGTAAATTAGTCTTGGTTCTGAAACTTCTCTAAAGGAAATTGTACATTTTTTTGAAATTTA
 TTCCTTATTCCCTCTTGGCAGCTAATGGGCTCTTACCAAGTTTAAACACAAAATTTATCAT
 AACAAAAATACTACTAATACTACTGTTTCCATGTCCCATGATCCCCTCTCTTCCCTCCC
 CACCCTGAAAAAAATGAGTTCCTATTTTTTCTGGGAGAGGGGGGGATTGATTAGAAAAAAA

TGTAGTGTGTTCCATTTAAAATTTTGGCATATGGCATTTCCTAACTTAGGAAGCCACAATG
 TTCTTGGCCCATCATGACATTGGGTAGCATTAAGTGTAAAGTTTGTGCTTCCAAATCACTT
 TTTGGTTTTTAAGAATTTCTTGATACTCTTATAGCCTGCCTTCAATTTTGATCCTTTATTC
 TTTCTATTTGTCAGGTGCACAAGATTACCTTCCTGTTTTAGCCTTCTGTCTTGTCAACCAAC
 CATTCTTACTTGGTGGCCATGTACTTGGAAAAAGGCCGCATGATCTTTCTGGCTCCACTCA
 GTGTCTAAGGCACCCTGCTTCCTTTGCTTGCATCCCACAGACTATTTCCCTCATCCTATTT
 ACTGCAGCAAATCTCTCCTTAGTTGATGAGACTGTGTTTATCTCCCTTTAAAACCCTACCT
 ATCCTGAATGGTCTGTCAATTGTCTGCCTTTAAAATCCTTCCTCTTCTCCTCCTCTATTC
 TCTAAATAATGATGGGGCTAAGTTATACCCAAAGCTCACTTTACAAAATATTTCTCAGTA
 CTTTGCAGAAAACACCAAACAAAAATGCCATTTTAAAAAAGGTGTATTTTTCTTTTAGAA
 TGTAAGCTCCTCAAGAGCAGGGACAATGTTTTCTGTATGTTCTATTGTGCCTAGTACACTG
 TAAATGCTCAATAAATATTGATGATGGGAGGCAGTGAGTCTTGATGATAAGGGTGAGAAAC
 TGAAATCCC

REIVINDICACIONES

1. Un método de prueba *in vitro* que comprende:

5 en una muestra de suero o líquido sinovial obtenida de un sujeto mamífero que tiene, o corre riesgo de tener una artritis, determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de una proteína 14-3-3 eta en la muestra, en la que 14-3-3 eta está presente en mayores niveles en el suero o el líquido sinovial de los pacientes con artritis en comparación con los pacientes normales.

10 2. Un método de diagnóstico *in vitro* que comprende determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de una proteína 14-3-3 eta en el líquido sinovial o el suero de un sujeto mamífero y evaluar el estado de una enfermedad artrítica basándose al menos en parte en la presencia, la ausencia o la cantidad de la proteína, donde 14-3-3 eta está presente en mayores niveles en el suero o el líquido sinovial de los pacientes con artritis en comparación con los pacientes normales.

15 3. Un método para evaluar *in vitro* la eficacia de un medicamento para la artritis, que comprende:

20 determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de una proteína 14-3-3 eta en el líquido sinovial o el suero de un sujeto mamífero sometido a una tanda de tratamiento con el medicamento; y evaluar la eficacia del medicamento basándose al menos en parte en la presencia, la ausencia o la cantidad de la proteína, donde eta 14-3-3 está presente en mayores niveles en el suero o el líquido sinovial de los pacientes con artritis en comparación con los pacientes normales.

25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el sujeto es un ser humano.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la artritis es artritis reumatoide.

30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sujeto está recibiendo un tratamiento para la artritis.

7. El método de la reivindicación 6, donde el tratamiento es un tratamiento anti-TNF.

8. El método de la reivindicación 6, donde el tratamiento es una terapia modificadora de la enfermedad para artritis.

35 9. El uso de un compuesto que se une a la proteína 14-3-3 eta para diagnosticar el estado de una enfermedad artrítica en un sujeto mamífero, donde el uso es *in vitro*.

40 10. El uso de un compuesto que se une a la proteína 14-3-3 eta para seguir la evolución del estado de una enfermedad artrítica en un sujeto mamífero, donde el uso es *in vitro*.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde el compuesto es un anticuerpo.

45 12. El uso de un juego compuesto por un anticuerpo específico para la isoforma eta de las proteínas 14-3-3 para usar en la detección de una proteína 14-3-3 eta en una muestra de un paciente según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 donde el juego comprende además el uso de un anticuerpo que se une a las metaloproteinasas de matriz (MMP).

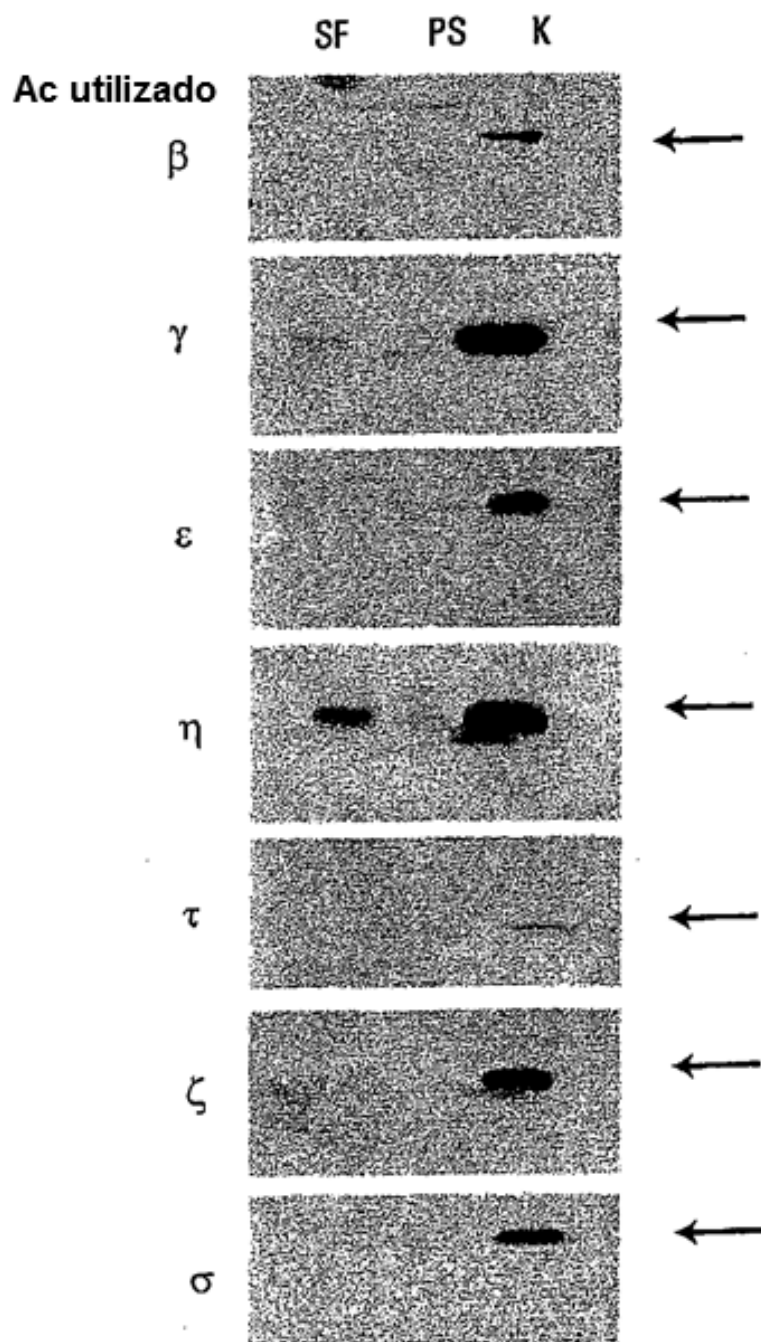


FIG. 1

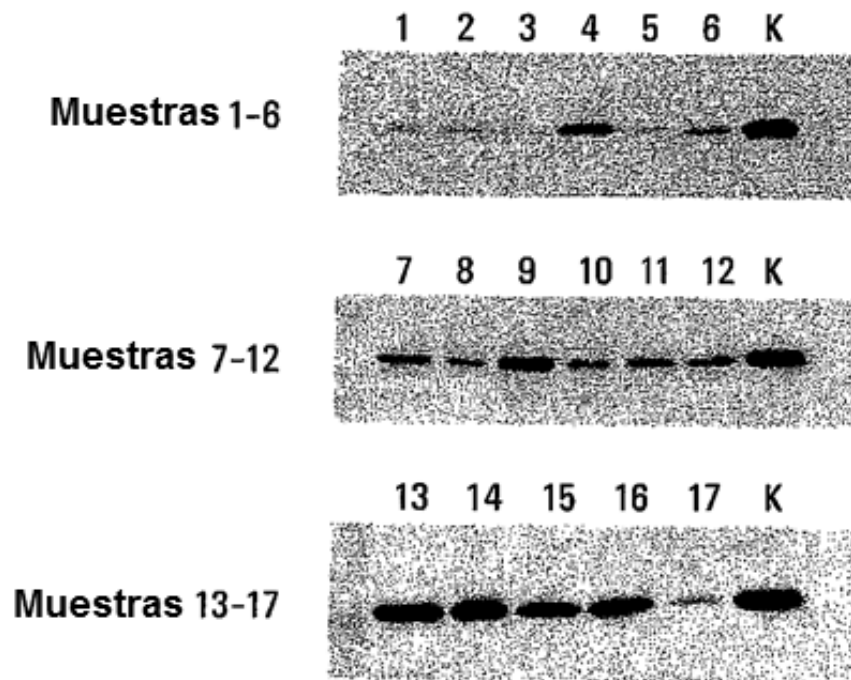


FIG. 2

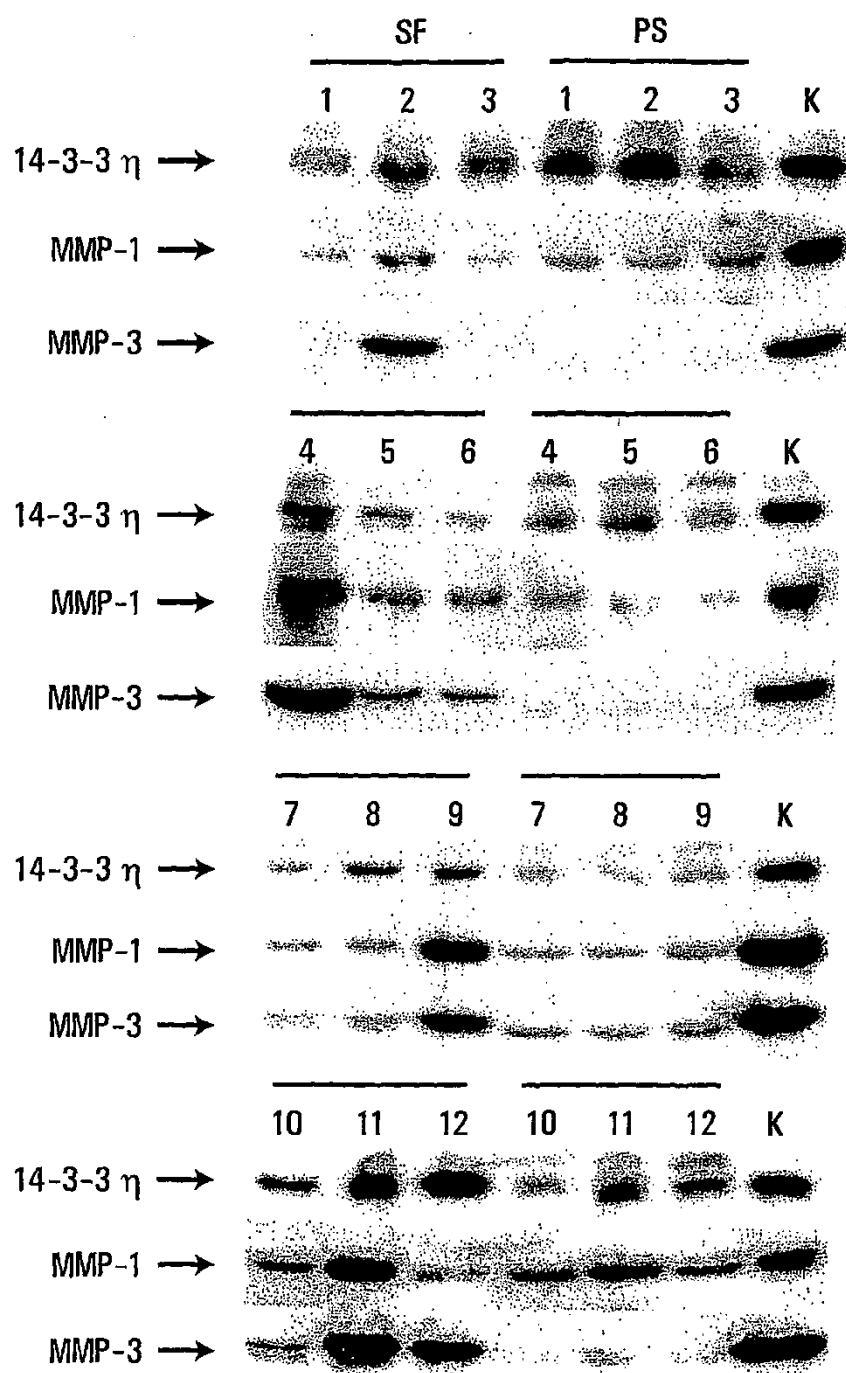


FIG. 3

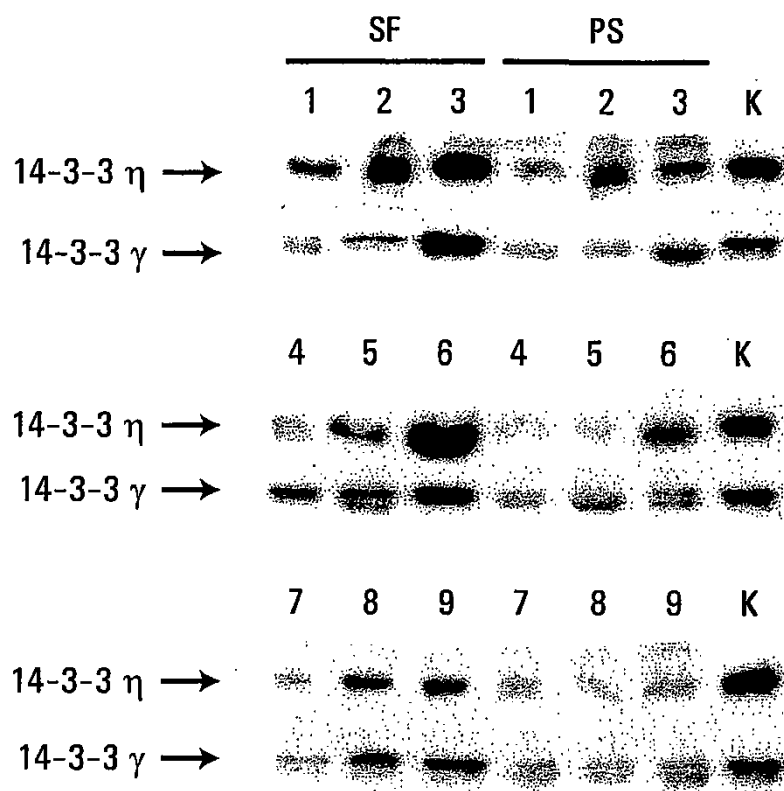


FIG. 4

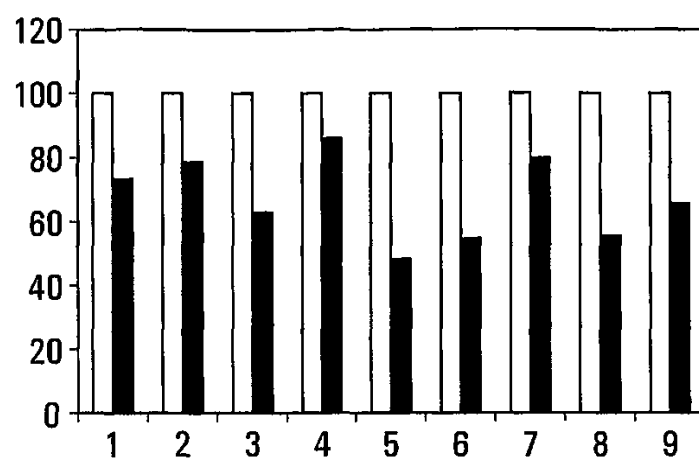


FIG. 5

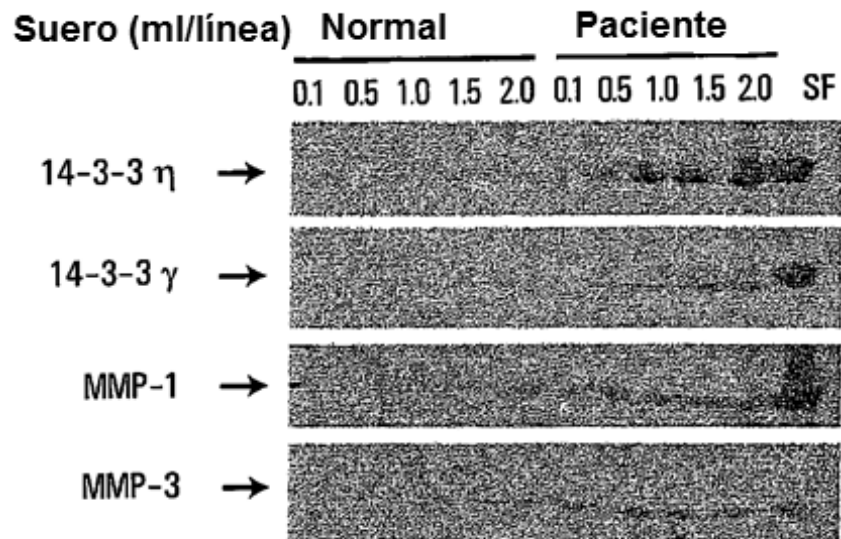


FIG. 6A

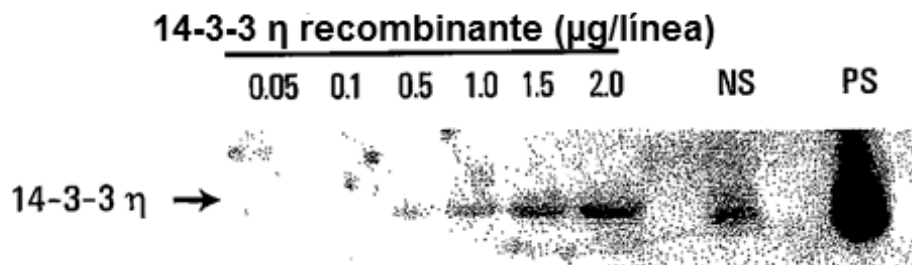


FIG. 6B

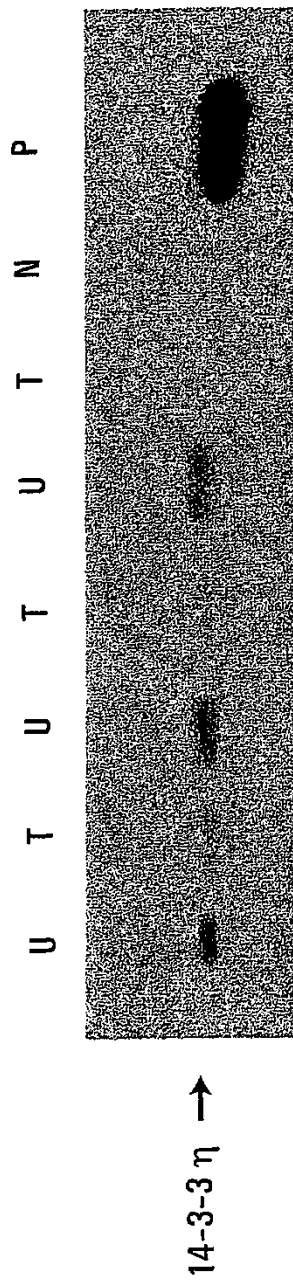


FIG. 7