

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 258**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2009 E 09777309 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2318039**

54 Título: **Proteína de unión al antígeno de Goodpasture y su detección**

30 Prioridad:

**22.07.2008 US 82741 P**

**31.07.2008 US 85211 P**

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

**07.05.2015**

73 Titular/es:

**FIBROSTATIN, SOCIEDAD LIMITADA (100.0%)**

**C/ Conde de Altea 8-7°**

**46005 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**REVERT, FERNANDO y**

**SAUS, JUAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 535 258 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

Proteína de unión al antígeno de Goodpasture y su detección

5 **Referencia cruzada**

Esta solicitud reivindica el beneficio para las Solicitudes de Patente Provisionales con los N<sup>os</sup> de Serie 61/082741 expedida el 22 de julio de 2008 y 61/085211 expedida el 31 de julio de 2008.

10 **Antecedentes de la invención**

La conformación del dominio no colagenoso (NC1) de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno IV de la membrana basal [ $\alpha 3$ (IV)NC1] depende en parte de la fosforilación. La proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) (documentos WO 00/50607; WO 02/061430) es una nueva proteína quinasa no convencional que cataliza la isomerización conformacional del dominio  $\alpha 3$ (IV)NC1 durante su ensamblaje supramolecular, dando como resultado la producción y estabilización de los múltiples conformadores de  $\alpha 3$ (IV)NC1 en las membranas basales. Se han asociado los niveles elevados de GPBP con la producción de conformadores no tolerantes de  $\alpha 3$ (IV)NC1, que llevan a cabo la respuesta autoinmunitaria que media la enfermedad de Goodpasture ("GP"). En los pacientes de GP, los autoanticuerpos contra el dominio C terminal no colagenoso (NC1) de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno de tipo IV ("antígeno de Goodpasture" o "antígeno GP") causa una glomerulonefritis progresiva rápidamente y a menudo hemorragia pulmonar, las dos manifestaciones clínicas cardinales del síndrome de GP.

La identificación de GPBP proporcionó métodos para la identificación de compuestos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, cáncer, trastornos mediados por el plegamiento defectuoso de las proteínas y la apoptosis aberrante, y también proporcionó agentes terapéuticos potenciales para estos trastornos. Por lo tanto, la identificación de nuevas isoformas de GPBP podría ser ventajosa en al menos estos campos.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona el uso de una molécula de unión a GPBP de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, métodos para detectar GPBP en la circulación de acuerdo con las reivindicaciones 7-8 y un método para aislar isoformas nativas de GPBP de acuerdo con la reivindicación 9. Se divulgan otros aspectos de la solicitud:

En un primer aspecto, la presente solicitud divulga polipéptidos aislados con una pureza del 90 % o mayor, que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 (91 kD GPBP).

En un segundo aspecto, la presente solicitud divulga polipéptidos recombinantes sustancialmente purificados que comprenden la fórmula general X-SEC ID N<sup>o</sup>: 2, donde X es un polipéptido detectable. El polipéptido detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en polipéptidos fluorescentes y miembros polipeptídicos de un par de unión. En otro aspecto, la solicitud divulgada proporciona ácidos nucleicos sustancialmente purificados que codifican los polipéptidos de este segundo aspecto de la solicitud.

En un tercer aspecto, la presente solicitud divulga ácidos nucleicos sustancialmente purificados que codifican un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 (GPBP de 91 kD). Los ácidos nucleicos sustancialmente purificados pueden consistir en el ácido nucleico de SEC ID N<sup>o</sup>: 1, o un producto de ARNm del mismo.

En un cuarto aspecto, la presente solicitud divulga vectores de expresión recombinante que comprenden el ácido nucleico sustancialmente purificado de cualquier aspecto de la solicitud.

En un quinto aspecto, la presente solicitud divulga células hospedadoras transfectadas con un vector de expresión recombinante de la solicitud.

En un sexto aspecto, la presente solicitud divulga un polipéptido sustancialmente purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N<sup>o</sup>: 4 (GPBP de 77 kD), donde el polipéptido de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 o SEC ID N<sup>o</sup>: 4 comprende una o más modificaciones post-traduccionales (MTP) que implican directa y/o indirectamente a los restos de aminoácidos de 305-344 GGPDYEEGPNLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (SEC ID N<sup>o</sup>: 10) (numeración basada en la posición dentro de la GPBP de 77 kD). Una o más de las MTP puede comprender MTP covalentes. Una o más de las MTP puede comprender las MTP covalentes dentro de los aminoácidos de 305-344 (SEC ID N<sup>o</sup>: 10). Una o más de las MTP puede implicar directa o indirectamente a los restos 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N<sup>o</sup>: 5). Una o más de las MTP puede comprender una o más de las MTP covalentes dentro de los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N<sup>o</sup>: 5). El polipéptido sustancialmente purificado puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N<sup>o</sup>: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N<sup>o</sup>: 4 (GPBP de 77 kD).

En un séptimo aspecto, la presente solicitud divulga polipéptidos sustancialmente purificados que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD), donde el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 comprende una o más MTP que implican directa y/o indirectamente a los restos de 371-396, PYSRSSMSIDLVSASDDVHRFSSQ (SEC ID N°: 9) (numeración basada en las posiciones dentro de la GPBP de 77 kD). Una o más de las MTP puede comprender MTP covalentes. Una o más de las MTP puede comprender MTP covalentes dentro de los aminoácidos de 371-396 (SEC ID N°: 9). Una o más de las MTP puede implicar directa o indirectamente a los restos de 388-392 (DDVHR, SEC ID N°: 6). Una o más de las MTP puede comprender una o más de las MTP covalentes dentro de los restos de 388-392 (SEC ID N°: 6). El polipéptido puede comprender adicionalmente una o más de las MTP que implican directa y/o indirectamente a los restos de aminoácidos de 305-344 GGPDYEEGPNLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (SEC ID N°: 10) (numeración basada en la posición dentro de la GPBP de 77 kD); preferentemente una o más de las MTP comprende MTP covalentes, e incluso más preferentemente una o más de las MTP comprende las MTP covalentes dentro de los aminoácidos de 305-344 (SEC ID N°: 10). Una o más de las MTP puede implicar directa o indirectamente a los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N°: 5). Una o más de las MTP puede comprender una o más de las MTP covalentes dentro de los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N°: 5). El polipéptido sustancialmente purificado puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD).

En un octavo aspecto, la presente solicitud divulga anticuerpos monoclonales sustancialmente purificados que se unen selectivamente a un polipéptido del sexto o del séptimo aspecto de la solicitud.

En un noveno aspecto, la presente solicitud divulga anticuerpos monoclonales sustancialmente purificados que se unen específicamente al polipéptido de SEC ID N°: 2 y no al polipéptido de SEC ID N°: 4. El anticuerpo monoclonal puede unirse a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos DGWKGRLPSPLVLLPRSARC (SEC ID N°: 7).

En un décimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para detectar la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) en la circulación, que comprenden:

- (a) poner en contacto una muestra de plasma con una molécula de unión a GPBP en condiciones que promuevan la unión selectiva de la molécula de unión a GPBP a la GPBP;
- (b) retirar las moléculas de unión a GPBP no unidas; y
- (c) detectar la formación de complejos entre la molécula de unión a GPBP y la GPBP en la muestra de plasma.

En un undécimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para detectar la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) en la orina, que comprenden:

- (a) poner en contacto una muestra de orina con una molécula de unión a GPBP en condiciones que promuevan la unión selectiva de la molécula de unión a GPBP a la GPBP;
- (b) retirar las moléculas de unión a GPBP no unidas; y
- (c) detectar la formación de complejos entre la molécula de unión a GPBP y la GPBP en la muestra de orina.

En un duodécimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar la GPBP nativa de 77 kD, que comprenden:

- (a) someter a una muestra de plasma a una precipitación con sulfato de amonio;
- (b) llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico (CII) en la muestra de suero precipitada con sulfato de amonio;
- (c) identificar las fracciones de la CII que contienen la GPBP nativa de 77 kD;
- (d) someter a las fracciones de la CII que contienen a la GPBP de 77 kD nativa a cromatografía de filtración en gel (CFG); y
- (e) identificar las fracciones de la CFG que contienen la GPBP nativa de 77 kD.

En un decimotercer aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar la GPBP nativa de 91 kD, que comprenden:

- (a) someter a una muestra de orina a precipitación con sales;
- (b) llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico (CII) doble en la muestra de proteína precipitada con sales; y
- (c) identificar las fracciones de la CII que contienen a la GPBP nativa de 91 kD.

En un decimocuarto aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar isoformas nativas de GPBP, que comprenden:

- (a) pasar una muestra de plasma o una muestra de orina a través de una columna de inmunoafinidad que contiene moléculas de unión a GPBP que se unen selectivamente a la GPBP nativa;
- (b) lavar la proteína no unida de la muestra de plasma o de orina de la columna de inmunoafinidad; y

(c) eluir las isoformas nativas de GPBP de la columna.

Estos métodos pueden usarse, por ejemplo, para purificar sustancialmente la GPBP nativa de 77 kD y la GPBP de nativa 91 kD de plasma y orina, respectivamente, tal como se divulga en más detalle en los ejemplos a continuación.

5 Las moléculas de unión a GPBP pueden comprender anticuerpos para GPBP. Los anticuerpos pueden comprender los nuevos anticuerpos monoclonales de la presente solicitud. La etapa de elución puede comprender el uso de un tampón de elución desnaturalizante.

### Descripción de las figuras

10 **Figura 1. COL4A3BP codifica polipéptidos de 77-, 91- y 120-kDa.** En **A**, se analizó la GPBP etiquetada con FLAG o la GPBP $\Delta$ 26/CERT (10-20 ng) mediante transferencia de Western con los anticuerpos indicados. En **B**, se analizaron los extractos celulares (50  $\mu$ g) tal como se hizo en A. En **C**, se analizaron los extractos (10  $\mu$ g) de las células control (-) o las células que expresaban pc-n4' tal como se hizo en A. En **D**, se analizaron los extractos (50  $\mu$ g) de las células no transfectadas (-) o de las células transfectadas con el plásmido que expresaba el ARNpi indicado tal como se hizo en A. Se usó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como un control de carga y de la especificidad del ARNpi. La reactividad del AcMo e26 con los polipéptidos nativos o recombinantes se suprimió totalmente cuando se usó el GPBPpep1 (20 mM) como péptido bloqueante de anticuerpo (no mostrado). En estas y en las siguientes Figuras, los *números* y las *barras* o las *flechas* indican el tamaño en kDa y las posiciones de los patrones de PM o de los polipéptidos reactivos, respectivamente. Los resultados mostrados en esta y en las siguientes Figuras son representativos de al menos dos experimentos independientes.

25 **Figura 2. Los polipéptidos de GPBP de 91- y 120-kDa son los productos de la iniciación de la traducción no canónica del ARNm.** En **A**, se usó una representación esquemática de los ADNc para construir los plásmidos indicados. En **B**, se analizaron los extractos celulares (10  $\mu$ g) (*ex vivo*) o de las mezclas individuales de transcripción/traducción (*in vitro*) que expresaban las construcciones de plásmidos indicadas mediante transferencia de Western usando el AcMo e26 (*ex vivo*) o mediante fluorografía (*in vitro*). Se usaron los lisados de las células no transfectadas (*ex vivo*) o mezclas sin plásmido (*in vitro*) como Control. En **C**, se indican las secuencias de las fases de lectura abierta del extremo N terminal (ORF, fase de lectura abierta) de la GPBP en el código de una letra (SEC ID N°: 15) y la secuencia de nucleótidos de ARNm correspondiente (SEC ID N°: 14) en *letra mayúscula*. Las *letras grises* y *negras* también indican la UTR-5' (región no traducida 5') y las ATR (regiones alternativas traducidas), respectivamente. Los codones y los restos para la iniciación de la traducción canónica y no canónica están en *recuadros*. La secuencia peptídica a la que se dirige el Ac 24 está resaltada en *gris*. Los números negativos a la *derecha* denotan la posición del codón o el resto del sitio de iniciación de la traducción canónica (AUG o Met, +1). En **D**, se analizaron los extractos (10  $\mu$ g) de las células que no expresaban (Control) o que expresaban las construcciones de plásmidos indicadas sin (-) o con un codón de terminación en las posiciones indicadas mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados. En **E**, se analizaron los extractos celulares parcialmente purificados (50  $\mu$ g) mediante transferencia de Western usando las especies reactivas indicadas y un Ac 20 de F(ab) $_2$  no reactivo (Cont).

40 **Figura 3. Las isoformas de 91- y 120-kDa son polipéptidos insolubles unidos a la membrana.** En **A**, se incubaron las células intactas con anticuerpos  $\alpha$ GPBP-Alexa Fluor 647 ( $\alpha$ GPBP-AF647) en presencia de GPBPpep1 o una cantidad equimolar de un péptido no relevante (Peptcont) y Rodamina 123 para la tinción mitocondrial de las células vivas, y se analizaron mediante microscopía confocal. *Barra de escala*, 25 mM. En **B**, se separaron y se incubaron las células con solución de bloqueo en ausencia (control) o presencia de anticuerpos  $\alpha$ GPBP biotinilados ( $\alpha$ GPBP). El anticuerpo unido a la superficie celular se detectó con streptavidina-FITC y citometría de flujo. Como control, se incubaron cultivos paralelos con los mismos anticuerpos en presencia de GPBPpep1 ( $\alpha$ GPBP+GPBPpep1) o una cantidad equimolar de un péptido no relevante ( $\alpha$ GPBP+Peptcont) y se analizaron de modo similar. En **C**, se analizaron cantidades similares (10  $\mu$ g) de las fracciones celulares indicadas mediante transferencia de Western usando anticuerpos para las proteínas indicadas. Se usaron como marcadores de compartimentos celulares: piruvato deshidrogenasa (PDH) para las mitocondrias; catepsina D para los lisosomas; proteína priónica (PrP) para los microsomas; y el factor nuclear de kappa B (p65) para núcleo y citosol. Para la detección de GPBP y GPBP $\Delta$ 26/CERT, se usaron los AcMo e26 y 14, respectivamente. Dado que no se detectó la expresión de la GPBP de 77-kDa en el citosol, la reactividad del AcMo 14 en este compartimiento puede atribuirse a GPBP $\Delta$ 26/CERT.

55 **Figura 4. La isoforma de GPBP de 77-kDa interactúa con el colágeno del tipo IV en células cultivadas.** En **A**, se reticularon células HEK 293 o HEK 293-FLAG- $\alpha$ 3 (IV), se lisaron y se extrajo  $\alpha$ FLAG. Se hizo una reticulación inversa con cincuenta microgramos de lisado celular (entrada) o los materiales inmunoprecipitados correspondientes a FLAG (IP con  $\alpha$ FLAG) y se analizaron mediante tinción de azul de Coomassie o transferencia de Western con  $\alpha$ GPBP. Los polipéptidos específicos principales de los inmunoprecipitados de FLAG (flechas) se escindieron y se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI/TOF/TOF. En **B**, se transfectaron las células HEK 293 (-) o HEK 293-FLAG- $\alpha$ 3 (IV) con pcDNA3 (-) o con pc-n4' (+), se reticularon, se procesaron y se analizaron tal como se hizo en A mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados.

**Figura 5. Exportación de la GPBP de 77-kDa al compartimiento extracelular.** En **A**, se transfectaron células HeLa con las construcciones de los plásmidos indicados, y las proteínas indicadas se visualizaron mediante inmunofluorescencia indirecta convencional. Se tiñó el ADN con 4'-6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización nuclear. Aumentos originales 400 x. En **B** y en **C**, se analizaron los extractos (10 µg) de las células que expresaban las construcciones de los plásmidos indicados (lisados) o los inmunoprecipitados de FLAG de los correspondientes medios de cultivo (medio de las IP) mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados.

**Figura 6. La GPBP de 91-kDa regula la secreción de la GPBP de 77-kDa en células cultivadas.** En **A**, se analizaron los extractos (10 µg) de dos clones independientes que expresaban (c8) o que no expresaban (c19) la GPBP de 91 kDa recombinante mediante transferencia de Western con los anticuerpos AcMo 14, que reaccionan poco con la contraparte nativa de 91 kDa (**Fig. 1B**). En **B**, se transfectaron los mismos clones con pc-FLAG-GPBP, y se analizaron los extractos celulares (lisados) o inmunoprecipitados de FLAG de los medios de cultivo correspondiente (medio de las IP) mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados. Se obtuvieron conclusiones similares cuando se ensayó el c14, un clon independiente de HEK 293 que expresa niveles de GPBP de 91 kDa recombinante similares a los de c8 (no mostrado).

**Figura 7. GPBP $\Delta$ 26/CERT pero no GPBP es sensible al tratamiento celular con esfingomielinasa.** En **A**, se transfectaron células HeLa con las construcciones de los plásmidos indicadas y se trataron con (+) o sin (-) esfingomielinasa, se lisaron, se inmunoprecipitaron con FLAG, y se analizaron mediante transferencia de Western con anticuerpos  $\alpha$ FLAG (bSMasa). Los inmunoprecipitados de las células no tratadas se incubaron con (+) o sin (-) fosfatasa y se analizaron de modo similar ( $\lambda$ PPasa). Se usaron geles con un gradiente de 8-12 % y una electroforesis exhaustiva para separar las versiones fosforiladas y desfosforiladas de GPBP $\Delta$ 26/CERT y se estimó su abundancia relativa mediante transferencia de Western y densitometría. En **B**, las mismas células, tal como se hizo en **A**, se fijaron por metanol/acetona, se tiñeron doblemente con anticuerpo anti-FLAG-FITC (verde) y DAPI (azul) y se analizaron mediante inmunofluorescencia directa. Aumentos originales 400 x.

**Figura 8. Los niveles de la GPBP de 77-kDa en la circulación están regulados positivamente en los pacientes de Goodpasture y en los modelos animales de glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario.** En **A**, se analizó el material aislado mediante la cromatografía de inmunoafinidad a partir de la plasmáfesis de un paciente de Goodpasture mediante transferencia de Western en presencia ( $\alpha$ GPBP) o ausencia (Control) de anticuerpos específicos para GPBP. En **B**, está la gráfica que representa la curva patrón obtenida a partir de un ELISA realizado tal como hizo en Material y Métodos usando GPBP recombinante. En **C** y **D** están las gráficas de dispersión de la intensidad de fluorescencia (I.F.), en unidades arbitrarias (U.A.), medida mediante un ELISA similar. Los sueros de los donantes sanos (Control), pacientes de Goodpasture (GP) y de ratones NZW de las edades indicadas se diluyeron 1:10. La fluorescencia en ausencia de sueros se consideró el fondo y se le restó a cada valor individual. En ambas series,  $P < 0,001$ . Las barras indican la media de cada una de las series y el valor medio de las muestras individuales se representó mediante un círculo. En **A-D**,  $\alpha$ GPBP<sub>r</sub> fue el anticuerpo de captura y  $\alpha$ GPBP<sub>ab</sub> el de detección.

**Figura 9. El sitio de unión del AcMo 14 se mapea en el motivo FFAT de GPBP.** En **A**, indicada en el código de una letra, está la estructura primaria del motivo FFAT y la región flanqueante en GPBP (restos de 316-333) (SEC ID N°: 8) y la región homóloga en GPBP <sub>$\Delta$ FFAT</sub> (SEC ID N°: 29) donde los guiones indican los restos eliminados dentro del motivo FFAT (en recuadros). En **B**, se analizaron los extractos celulares (10 µg) que expresaban las proteínas indicadas mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados.

**Figura 10. La expresión recombinante de GPBP induce la acumulación de polipéptidos de GPBP en el citosol.** Las células se transfectaron con las construcciones de los plásmidos indicados, se recogieron un día después de la transfección, se sometieron a fraccionamiento tal como se indica en Material y Métodos en el Ejemplo 1 y se analizaron mediante transferencia de Western tal como se hizo en la Fig.3C usando los anticuerpos indicados. Las flechas y los números indican la posición y el  $P_r$  en kDa de los distintos polipéptidos de GPBP. El polipéptido de GPBP de 120-kDa se encontró principalmente en la fracción lisosomal y en cantidades más limitadas en la fracción microsomal, sugiriendo adicionalmente que éste representa una versión covalentemente modificada derivada de aquel de 91-kDa generado en la ruta secretora. Las observaciones adicionales incluyen la reactividad comparativamente más baja que muestra el AcMo e26 hacia el polipéptido de 91-kDa que reside en el citosol (compara la reactividad del AcMo e26 con la del AcMo 14 cuando el polipéptido reside en el citosol o los microsomas-150.000 x g).

**Figura 11. La GPBP de 77-kDa extracelular no reacciona significativamente con el AcMo e26.** Se lisaron las células transfectadas con pc-FLAG-GPBP y los medios de cultivo correspondientes se sometieron a inmunoprecipitación con FLAG. Se analizaron cantidades similares de extractos celulares (lisado) o inmunoprecipitados (medio de las IP) mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados.

**Figura 12: Análisis de transferencia de Western de la GPBP aislada de las muestras de plasma usando técnicas químicas.** Se analizó la GPBP parcialmente purificada de aproximadamente 1,25 ml de plasma humano

(véase el ejemplo 2) mediante transferencia de Western en condiciones reductoras usando un AcMo n27 marcado con HRP. Las flechas y los números indicaron la posición y el  $P_r$  estimado para los polipéptidos reactivos.

5 **Figura 13. La GPBP se aisló de la orina de un donante control usando cromatografía de inmunoafinidad.** Se cargaron doscientos cincuenta mililitros de orina de un donante control (anteriormente aclarada mediante centrifugación y neutralizada con Tris), en una columna de 1 ml de Sefarosa 4B-conjugada con 200  $\mu$ g de anticuerpos policlonales anti-GPBP de conejo. Se lavó la columna con 30 ml de TBS y el material unido se eluyó con tampón de elución suave Immunopure™ (Pierce). El material eluido se dializó contra TBS y se analizó adicionalmente mediante transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP (10  $\alpha$ GPBPch) e IgY anti-pollo marcada con HRP (anticuerpo secundario). La especificidad del anticuerpo se confirmó mediante la tinción de una línea control cargada con el mismo material con anticuerpo secundario (Cont). Las barras y los números o las flechas y los números indican la posición y el tamaño (kDa) de los patrones de PM (izquierda) o polipéptidos de GPBP (derecha), respectivamente.

15 **Figura 14. ELISA indirecto para detectar GPBP en muestras de orina.** Se recubrieron placas de ELISA durante toda la noche a 4 °C con GPBP recombinante diluida en orina y muestras de orina de siete donantes (1-7). Se bloquearon las placas con BSA al 3 % en PBS y se realizó la inmunodetección con anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP ( $\alpha$ GPBPch) e IgY anti-pollo marcada con HRP (anticuerpo secundario). Se usó el reactivo Amplex UltraRed (Invitrogen) para revelar la placa. En **A**, se representa la gráfica de dispersión en una escala log-log de las concentraciones indicadas de GPBP frente a la intensidad de fluorescencia (I.F.) expresada en unidades arbitrarias (U.A.). En **B**, se representa la línea progresión lineal calculada con las concentraciones indicadas y sus valores de I.F. respectivos representados gráficamente en una escala lineal, que se usaron para determinar la concentración de GPBP en la muestra en D. En **C**, se representan los datos brutos obtenidos analizando las muestras de donantes con: anticuerpo secundario (Cont), IgY de pollo no específica y anticuerpo secundario (IgY), o con  $\alpha$ GPBPch y anticuerpo secundario ( $\alpha$ GPBPch). En **D**, la tabla muestra los datos transformados correspondientes usando la curva obtenida en **B**.  
20  
25

**Figura 15. Desalinización y cromatografía de intercambio iónico de las muestras de orina.** Se llevaron cuatrocientos mililitros de orina aclarada mediante centrifugación a NaCl 0,85 M durante toda la noche a 4 °C, y se sometieron a centrifugación a 10.000 x g durante 30 min a 4 °C. Una muestra del sobrenadante, (Sob con NaCl 0,85 M) se almacenó a 4 °C para incluirse en el análisis posterior. El sedimento resultante se disolvió en Tris 50 mM a pH 7,5, se dializó contra el mismo tampón, se extrajo con 0,7 ml de resina de CM y el material no unido se extrajo adicionalmente con 0,5 ml de resina DEAE. La resina CM se eluyó con NaCl 1 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (CM NaCl 1 M), y la resina DEAE se eluyó posteriormente con NaCl 0,35 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (DEAE NaCl 0,35 M) y NaCl 1 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (DEAE NaCl 1 M). Se analizaron cantidades equivalentes de cada muestra incluyendo el sobrenadante de la extracción con DEAE (Sob CM/DEAE) mediante transferencia de Western con anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP e IgY anti-pollo marcada con HRP ( $\alpha$ GPBPch). Los polipéptidos reactivos no específicos se identificaron tiñendo en un análisis en paralelo usando solamente IgY anti-pollo marcada con HRP (Cont). Las barras y los números o flechas y los números indican la posición y el tamaño (kDa) de los patrones de PM (izquierda) o polipéptidos que reaccionan específicamente con los anticuerpos anti-GPBP y que se detectaron solamente en el Sob CM/DEAE (derecha), respectivamente.  
30  
35  
40

**Figura 16. Análisis de transferencia de Western de la FLAG-GPBP intracelular y extracelular producida en células HEK 293 usando anticuerpos monoclonales N1-N28 individuales.** En la composición superior, se sometieron 10  $\mu$ g de extracto de proteína total de las células HEK 293 que expresaban FLAG-GPBP recombinante a análisis de transferencia de Western usando los anticuerpos N1-N28 (1-28). Se observó un polipéptido principal de ~77-kDa que representaba el polipéptido de GPBP recombinante de longitud completa y la presencia variable de polipéptidos derivados de menor  $P_r$  (45-77 kDa). En la composición inferior, se ensayaron los mismos anticuerpos contra la GPBP recombinante extracelular (polipéptido de 77-kDa) purificada mediante inmunoprecipitación con FLAG de medio del cultivo de las células HEK 293 que expresan FLAG-GPBP (Revert *et al.* 2008 *J. Biol Chem*, 283:30246-55). Se detectó un polipéptido principal de ~77 kDa que representaba el polipéptido FLAG-GPBP de longitud completa junto con un polipéptido no específico de menor  $P_r$  (Conj), que reaccionó con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón) y que se sospecha que representa productos derivados del anticuerpo de inmunoprecipitación (IgG de ratón anti-FLAG) (no mostrado). A menos que se indique lo contrario, en esta y en las transferencias de Western posteriores, 1-28 es N1-N28, y para el revelado se usaron HRP anti-ratón y quimioluminiscencia.  
45  
50  
55

**Figura 17. Análisis de transferencia de Western de extractos de células HEK 293 usando anticuerpos monoclonales de N1-N27.** Se analizaron cincuenta  $\mu$ g de extractos de células HEK 293 mediante transferencia de Western usando los anticuerpos indicados. Los anticuerpos reconocieron cuatro polipéptidos relacionados con GPBP distintos: el polipéptido de canónico de 77 kDa, un fragmento de 45 kDa, una banda de 88 kDa, y un polipéptido de 91 kDa al que también se dirige el AcMo e26. El polipéptido identificado por la flecha fue reconocido por el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón marcada con HRP) y por lo tanto no representa un producto de GPBP. El origen del polipéptido de 88 kDa es desconocido aunque su  $P_r$  sugiere que éste representa una versión fosforilada del polipéptido canónico de 77 kDa.  
60  
65

**Figura 18. Clonación de mutantes de delección de GPBP.** En **A**, en la estructura primaria de GPBP (SEC ID N°: 4) se indica el extremo C terminal (flechas dobladas) de los trece mutantes de delección de ADNc del extremo 3' terminal de FLAG-GPBP (1-13), obtenidos mediante procedimientos de PCR y ADN recombinante convencionales. En **B**, se muestra la secuencia de GPBP que abarca las regiones C terminales de los mutantes de delección 7 (recuadro superior) y 8 (recuadro inferior). En cada línea, se indica el número del último resto.  $\Delta 1$  es un mutante de delección de FLAG-GPBP que carece de los restos de 285-304 y de modo similar los mutantes  $\Delta 2$  - $\Delta 4$  carecen de los restos de 305-324, 325-344 y 345-364, respectivamente (SEC ID N°: 30-33). Un péptido que representaba la secuencia en *negrita* (SEC ID N°: 8) compitió de modo eficaz con la unión del AcMo 14 a GPBP y una secuencia mutante de GPBP que contenía la secuencia Ala Ala Val en lugar de los restos *subrayados* reaccionó de modo fallido con el AcMo 14. En **C**, se analizaron los extractos de proteína de las células HEK 293 transfectadas con los pcDNA3-FLAG-GPBP $\Delta 1$  ( $\Delta 1$ )-pcDNA3-FLAG GPBP $\Delta 4$  ( $\Delta 4$ ) individuales, mediante SDS-PAGE y transferencia de Western con los anticuerpos indicados. Se obtuvieron resultados similares para los anticuerpos restantes incluidos en la **Tabla 1** bajo la región 7-8: N4, N7, N9, N11, N14, N25, N27, N28 (similar a N22); y N2, N3, N5, N10, N12, N13 (similar a N8). El anticuerpo N16 no se mapeó.

La **Figura 19** muestra la secuencia de la GPBP de 91 kD (SEC ID N°: 2).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de una molécula de unión a GPBP de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, métodos para detectar la GPBP en la circulación de acuerdo con las reivindicaciones 7-8 y un método para aislar las isoformas nativas de GPBP de acuerdo con la reivindicación 9. Los aspectos, características y definiciones descritas a continuación se refieren, en la medida de lo aplicable, al uso y a los métodos reivindicados.

Dentro de esta solicitud, a menos que se declare lo contrario, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en una cualquiera de las referencias bien conocidas tales como: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods In Enzymology, Volumen 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, *et al.* 1990. Academic Press, San Diego, CA), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2<sup>a</sup> Ed. (R.L Freshney. 1987. Liss, Inc. Nueva York, NY), *Gene Transfer and Expression Protocols*, páginas 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ), y el catálogo de Ambion de 1998 (Ambion, Austin, TX).

Tal como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Y" tal como se usa en el presente documento se usa indistintamente junto con "o" a menos que se declare expresamente lo contrario.

Tal como se usa en esta solicitud, la expresión "proteína nativa" significa que la proteína se produce de modo natural por la célula, incluyendo cualquier modificación post-traducciona (MTP), e incluye la proteína no desnaturizada o la proteína desnaturizada (tal como, por ejemplo, la proteína producida de modo natural sustancialmente purificada y sometida a uno o más agentes desnaturizantes para, por ejemplo, correrla en un gel de SDS-PAGE).

Tal como se usa en esta solicitud, "polipéptido sustancialmente purificado" significa que el polipéptido se ha separado de sus ambientes celulares *in vivo*. Se prefiere adicionalmente que los polipéptidos aislados también estén sustancialmente libres de agentes del gel, tales como poliacrilamida, agarosa y reactivos de cromatografía.

A menos que el contexto indique claramente lo contrario, las realizaciones divulgadas para un aspecto de la invención pueden usarse también en otros aspectos de la invención, y en combinación con las realizaciones divulgadas en otros aspectos de la invención.

En un primer aspecto, la presente solicitud divulga polipéptidos aislados con una pureza del 90 % o mayor, que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD). Los inventores han determinado que la secuencia hipotética de la GPBP de 91 kD propuesta anteriormente en el documento WO 2004/070025 es incorrecta, y han aislado ahora una secuencia de proteína nativa de 91 kD y determinado su secuencia de aminoácidos correcta, la cual se muestra en SEC ID N°: 2. La **Figura 19** muestra la secuencia de la GPBP de 91 kD, y en forma *negrita*, *cursiva* y *subrayada*, y desde el extremo N hasta el C terminal, los restos de aminoácidos que comprenden los epítomos del Ac 24, AcMo 14 y AcMo e26, respectivamente. El primer resto (Met) de la GPBP canónica de 77 kDa (SEC ID N°: 4) se destaca en *negrita* y está en un recuadro dentro de la figura. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la GPBP de 91 kDa y 77 kDa es idéntica desde el resto "Met" destacado hasta el final de la proteína. Tal como se observa a continuación, los inventores han obtenido pruebas convincentes de que el ARNm de GPBP experimenta la iniciación de la traducción canónica (AUG) y no canónica (ACG) para generar dos polipéptidos principales de 77- y 91-kDa, respectivamente. Los resultados de este estudio también confirman que ambos productos entran en la ruta secretora. Sin embargo, mientras que el de 77-kDa alcanza el compartimento extracelular y existe en una forma soluble inmunoprecipitable, el de 91-kDa permanece principalmente insoluble, asociado con las membranas celulares y probablemente alcanza el lado externo de la membrana plasmática. Las

pruebas confirman que la isoforma de GPBP de 120 kDa es un producto derivado covalentemente de la GPBP de 91 kDa (es decir: las únicas diferencias son modificaciones post-traduccionales) y por lo tanto comparte la secuencia de aminoácidos del polipéptido de 91 kDa. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, la expresión "GPBP de 91 kDa" incluye al péptido de 91 kDa y las modificaciones post-traduccionales del mismo, incluyendo, pero sin limitación a la GPBP de 120-kDa y agregados de GPBP de 91 kDa y 120 kDa. La presente solicitud divulga pruebas adicionales de la existencia de GPBP de 91 kDa en forma soluble en el plasma y la orina revelando que la GPBP de 91 kDa puede liberarse de las membranas celulares. Los polipéptidos de este aspecto de la solicitud pueden usarse, por ejemplo, para producir anticuerpos contra la GPBP de 91 kDa, y como dianas para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de GPBP, haciéndolos útiles en la terapia de varios trastornos, incluyendo el síndrome de Goodpasture.

Por lo tanto, estos datos confirman la noción de que la iniciación alternativa de la traducción del ARNm es una estrategia para dirigir a GPBP a múltiples localizaciones incluyendo la ruta secretora, la membrana plasmática y el compartimiento extracelular.

Los polipéptidos pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos específicos para la detección de distintas isoformas nativas de GPBP presentes en suero o en orina, que pueden usarse por lo tanto como, por ejemplo, agentes diagnósticos para trastornos autoinmunitarios y otros. Los polipéptidos pueden usarse también, por ejemplo, como herramientas para identificar compuestos candidatos para inhibir diversos tipos específicos isoformas nativas de GPBP y también para identificar compuestos candidatos para tratar, por ejemplo, los trastornos de autoinmunidad y mediados por plegamiento defectuoso de proteínas, tal como se explica en más detalle a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, "pureza del 90 % o mayor" significa que las proteínas contaminantes no constituyen más del 10 % del polipéptido aislado; en diversos significados preferentes, no más del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o 0,5 % del polipéptido aislado (por ejemplo, polipéptidos aislados con una pureza del 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % o mayor que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2). Los polipéptidos aislados pueden estar también sustancialmente libres de agentes del gel, tales como poli(acrilamida) y agarosa. Los polipéptidos aislados pueden estar presentes en solución, congelados o como un polvo desecado. Los polipéptidos aislados de este primer aspecto pueden marcarse opcionalmente con un indicador detectable no polipeptídico, que incluye pero sin limitación a los indicadores fluorescentes o indicadores radiactivos.

En un segundo aspecto, la presente divulgación divulga polipéptidos recombinantes sustancialmente purificados que comprenden o consisten en la fórmula general X-SEC ID N°: 2, donde X es un polipéptido detectable. En este aspecto, la secuencia de aminoácidos correcta para la GPBP de 91 kD (SEC ID N°: 2) se expresa como una proteína de fusión con un polipéptido detectable. Los polipéptidos de este aspecto de la solicitud pueden usarse, por ejemplo, para rastrear a la GPBP de 91 kD en las células, y como una diana detectable para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de GPBP, haciendo de estos, agentes terapéuticos útiles para diversos trastornos, incluyendo el síndrome de Goodpasture. Tal como se usa en este aspecto, un "polipéptido recombinante" significa que el polipéptido detectable no deriva de GPBP o se expresa a partir del ARNm de GPBP, y por lo tanto fusiona un péptido detectable heterólogo con el polipéptido de GPBP de 91 kD correcto. Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido detectable" es cualquier péptido heterólogo que pueda detectarse, permitiendo por lo tanto la detección del polipéptido recombinante. El polipéptido detectable puede comprender una proteína fluorescente. Puede usarse cualquier proteína fluorescente conocida en la técnica. Por ejemplo, las proteínas verdes fluorescentes de cnidarios, que actúan como aceptores de la transferencia energética en bioluminiscencia, son proteínas fluorescentes adecuadas para el uso en los indicadores fluorescentes. Una proteína verde fluorescente ("GFP") es una proteína que emite luz verde, y una proteína azul fluorescente ("BFP") es una proteína que emite luz azul. Las GFP se han aislado de las medusas del noroeste del Pacífico, *Aequorea victoria*, el pensamiento de mar, *Renilla reniformis* y *Phialidium gregarium*. Véase, Ward, W. W., *et al.*, Photochem. Photobiol. 35:803 808 (1982); y Levine, L. D., *et al.*, Comp. Biochem. Physiol., 72B:77 85 (1982). Se ha modificado una variedad de GFP relacionadas con *Aequorea* que tienen espectros de excitación y emisión útiles modificando la secuencia de aminoácidos de una GFP de origen natural de *Aequorea victoria*. Véase, Prasher, D. C., *et al.*, Gene, 111:229 233 (1992); Helm, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EEUU, 91:12501 04 (1994); documento de EEUU con N° de Serie 08/337,915, expedida el 10 de noviembre de 1994; la Solicitud Internacional PCT/US95/14692, expedida el 10 de noviembre de 1995; y documento de EEUU con N° de Serie 08/706,408, expedido el 30 de agosto de 1996. El ADNc de la GFP puede concatenarse con aquellos que codifiquen muchas otras proteínas; las fusiones resultantes generalmente son fluorescentes y retienen las características bioquímicas de las proteínas acompañantes. Véase, Cubitt, A. B., *et al.*, Trends Biochem. Sci. 20:448 455 (1995). Los estudios de mutagénesis han producido mutantes de GFP con longitudes de onda de excitación o emisión desplazadas. Véase, Helm, R. & Tsien, R. Y. Current Biol. 6:178 182 (1996). Los pares adecuados, por ejemplo un mutante P4-3 de GFP desplazado hacia el azul (Y66H/Y145F) y un mutante verde mejorado S65T pueden servir respectivamente como un donante y un aceptor para la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Véase, Tsien, R. Y., *et al.*, Trends Cell Biol. 3:242 245 (1993).

El polipéptido detectable puede comprender un epítipo distinto a GPBP para el cual existen anticuerpos comercialmente disponibles, que incluyen pero sin limitación los de FLAG (Sigma Chemical, San Luis, MO), myc (9E10) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 6-His (Invitrogen; Novagen, Madison, WI), glutatión S-transferasa (GST) (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), y HA (hemaglutinina) (Boehringer Mannheim Biochemicals).

El polipéptido aislado puede comprender preferentemente de manera adicional una secuencia enlazadora entre el polipéptido detectable y el polipéptido de SEC ID N°: 2. El enlazador no es una porción de GPBP ni está codificado por un ARNm de GPBP. Dicho enlazador puede ser de cualquier longitud deseable, y preferentemente es de entre 1 y 20 aminoácidos, si está presente; más preferentemente entre 1 y 15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, o 1-2 aminoácidos, si está presente. El enlazador puede usarse, por ejemplo, para posicionar óptimamente el polipéptido detectable y la secuencia de GPBP de 91 kD y para incluir la secuencia específica para el sitio de reconocimiento de proteasas para permitir la retirada del polipéptido detectable. El polipéptido detectable también puede comprender cualquier resto adicional necesario para la expresión, tal como un resto de metionina en el extremo N terminal o secuencias peptídicas para suministrar al polipéptido a los distintos compartimentos celulares y extracelulares.

Los polipéptidos sustancialmente purificados de la solicitud pueden hacerse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, pero preferentemente se hacen por medios recombinantes basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede clonarse una región codificante de interés tal como se divulga en el presente documento en un vector de expresión recombinante, que después puede usarse para transfectar una célula hospedadora para la producción de proteína recombinante por las células hospedadoras.

En un tercer aspecto, la presente solicitud divulga ácidos nucleicos sustancialmente purificados que codifican un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD). La secuencia de ácidos nucleicos sustancialmente purificada puede comprender ARN o ADN. Tal como se usa en el presente documento, "ácidos nucleicos sustancialmente purificados" son aquellos que se han retirado de sus secuencias de ácidos nucleicos circundantes normales en el genoma o en las secuencias de ADNc. Dichas secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente purificadas pueden comprender secuencias adicionales útiles para promover expresión y/o purificación de la proteína codificada, incluyendo pero sin limitación las secuencias de poliA, secuencias de Kozak modificadas y secuencias que codifican etiquetas epitópicas, señales de exportación y señales secretoras, señales de localización nuclear, y señales de localización en la membrana plasmática. La región codificante del ácido nucleico sustancialmente purificado puede consistir en el ácido nucleico de SEC ID N°: 1, o un producto del ARNm del mismo. La presente solicitud divulga ácidos nucleicos sustancialmente purificados que codifican el polipéptido de cualquiera de las realizaciones de los polipéptidos sustancialmente purificados que comprenden o consisten en la fórmula general X-SEC ID N°: 2, tal como se explica en el segundo aspecto de la solicitud.

En un cuarto aspecto, la presente solicitud divulga vectores de expresión recombinante que comprenden el ácido nucleico sustancialmente purificado de cualquier aspecto de la solicitud ligado operativamente a un promotor. "Vector de expresión recombinante" incluye vectores que están ligados operativamente a una región codificante de ácidos nucleicos o un gen para cualquier promotor capaz de efectuar la expresión de un producto génico. La secuencia promotora usada para dirigir la expresión de las secuencias de ácido nucleico divulgadas en un sistema de mamíferos puede ser constitutiva (dirigida por cualquiera de una variedad de promotores, que incluyen pero sin limitación, las de CMV, SV40, VRS, actina, EF) o inducible (dirigida por cualquiera de una serie de promotores inducibles que incluyen, pero sin limitación a los respondedores tetraciclina, ecdisona, esteroides). La construcción de vectores de expresión para el uso en la transfección de células procariotas también es bien conocida en la técnica, y por lo tanto puede llevarse a cabo por medio de técnicas convencionales. (Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis, en: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Gene Transfer and Expression Protocols*, páginas 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ), y el catálogo de Ambion de 1998 (Ambion, Austin, TJ). El vector de expresión debe ser replicable en los organismos hospedadores bien como un episoma o mediante la integración dentro del ADN cromosómico del hospedador. El vector de expresión puede comprender un plásmido. Sin embargo, pueden usarse otros vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes, tales como vectores virales.

En un quinto aspecto, la presente solicitud divulga células hospedadoras que se han transfectado con los vectores de expresión recombinante divulgados en el presente documento, donde las células hospedadoras pueden ser bien procariotas o eucariotas. Las células pueden transfectarse de modo transitorio o estable. Dicha transfección de vectores de expresión en células procariotas y eucariotas puede llevarse a cabo por medio de cualquier técnica conocida en la materia, incluyendo pero sin limitación a las transformaciones bacterianas convencionales, la co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, o la transfección mediada por liposomas, mediada por DEAE dextrano, mediada por policones o mediada por virus. (Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, *et al*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2ª edición (RI Freshney 1987. LLSS, Inc. Nueva York, NY).

En un sexto aspecto, la presente solicitud divulga un polipéptido sustancialmente purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD), donde el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 comprende una o más modificaciones post-traduccionales (MTP) que implican directa o indirectamente los restos de aminoácidos de 305-344 GGPDYEEGPNLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (SEC ID N°: 10) (numeración basada en la posición dentro de la GPBP de 77 kD). Tal como se divulga en los ejemplos a continuación, los inventores proporcionan la primera purificación de la GPBP nativa de 77 y 91 kD y han determinado que los anticuerpos monoclonales

existentes que se unen a las versiones recombinantes de 77 kD y 91 kD de GPBP no se unen a las versiones nativas purificadas, verificando que existen diferencias estructurales entre las formas nativas y recombinantes de la GPBP de 77 kD y entre las formas recombinantes y nativas de la GPBP de 91 kD. Los polipéptidos de este aspecto de la solicitud pueden usarse, por ejemplo, para producir anticuerpos contra formas nativas de GPBP, y como dianas para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la GPBP nativa haciendo de estos, agentes terapéuticos útiles para diversos trastornos, incluyendo el síndrome de Goodpasture. Una o más de las MTP puede comprender las MTP covalentes. Una o más de las MTP puede comprender las MTP covalentes dentro de los aminoácidos de 305-344 (SEC ID N°: 10). Una o más de las MTP puede implicar directa o indirectamente a los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N°: 5). Una o más de las MTP puede comprender las MTP covalentes dentro de los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N°: 5) (numeración basada en la posición dentro del GPBP de 77 kD GPBP). Una o más de las MTP puede comprender una o más de las MTP presentes en el resto 320, 321 y/o 327; más preferentemente, una o más de las MTP presente en estos restos comprende MTP covalentes. El polipéptido sustancialmente purificado preferentemente posee una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "modificación post-traducciona" (MTP) significa una modificación en la estructura de una proteína después de su traducción. La MTP puede comprender la adición de un grupo funcional, que incluye pero sin limitación la carboxilación, metilación, citrulinación, fosforilación, glucosilación y formación de isoaspartilos atípicos. La MTP puede comprender una isomerización, que conduce a un cambio conformacional.

Tal como se usa en el presente documento, "directamente" significa que la MTP ocurre dentro de restos especificados, mientras que "indirectamente" significa que la MTP ocurre fuera de los restos especificados, pero da como resultado un cambio estructural dentro de los restos mencionados.

Puede usarse cualquier método adecuado para hacer el péptido covalentemente modificado de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 basándose en las enseñanzas de la presente divulgación, incluyendo el aislamiento a partir de las fuentes naturales de GPBP tal como se divulga en el presente documento, y la producción recombinante de GPBP seguida de la modificación covalente adecuada dentro de la región relevante de restos de aminoácidos, usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

En un séptimo aspecto, la presente solicitud divulga polipéptidos sustancialmente purificados que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD), donde el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 comprende una o más MTP que implican directa y/o indirectamente a los restos de 371-396 PYSRSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQ (SEC ID N°: 9) (numeración basada en las posiciones dentro de la GPBP de 77 kD). Tal como se divulga en los ejemplos a continuación, los inventores proporcionan la primera purificación de la GPBP nativa de 77 kD y 91 kD y han determinado que los anticuerpos monoclonales existentes que se unen a la versión recombinante de la GPBP de 77 y 91 kD no se unen a las versiones nativas de GPBP de 77 kD y 91 kD purificadas, verificando que existen diferencias estructurales entre las formas recombinantes y nativas de la GPBP de 77 y 91 kD. Los polipéptidos de este aspecto de la divulgación pueden usarse, por ejemplo, para producir anticuerpos contra la GPBP nativa, y como dianas para la identificación de compuestos que interfieren con la actividad de la GPBP nativa, haciendo de estos, agentes terapéuticos útiles para diversos trastornos, incluyendo el síndrome de Goodpasture. Una o más de las MTP puede comprender MTP covalentes. Una o más de las MTP pueden implicar directa o indirectamente a los restos de 388-392 (DDVHR, SEC ID N°: 6). Una o más de las MTP pueden comprender una o más de las MTP covalentes dentro de los restos de 388-392 (SEC ID N°: 6) El polipéptido puede comprender adicionalmente una o más MTP que implica directamente o indirectamente los restos de 320-327 (EEFFDAVE, SEC ID N°: 5). Una o más de las MTP dentro de los restos de 320-327 puede ser las MTP covalentes. El polipéptido sustancialmente purificado puede poseer una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 (GPBP de 91 kD) o SEC ID N°: 4 (GPBP de 77 kD). Puede usarse cualquier método adecuado para hacer el polipéptido covalentemente modificado de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, incluyendo el aislamiento a partir de las fuentes naturales de GPBP tal como se divulga en el presente documento, y la producción recombinante de GPBP seguida de la modificación covalente adecuada dentro de la región relevante de restos de aminoácidos, usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

En un octavo aspecto, la presente solicitud divulga anticuerpos monoclonales sustancialmente purificados que se unen selectivamente a los polipéptidos sustancialmente purificados del sexto o el séptimo aspecto de la solicitud. Tal como se divulga anteriormente, los inventores han aislado por primera vez las especies nativas de GPBP de 77 y 91 kD que cuando se purifican sustancialmente no se unen a los anticuerpos monoclonales específicos para GPBP existentes. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales existentes no detectan GPBP en muestras de plasma u orina en ELISA, ni estos pueden usarse para la purificación de la GPBP del plasma o de la orina. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de la solicitud son útiles, por ejemplo, en ensayos basados en ELISA para la detección de GPBP en orina o plasma, y para la purificación de GPBP de plasma o suero. Los inventores demuestran adicionalmente en el presente documento que estas especies de la GPBP nativa de 77 kD y la GPBP nativa de 91 kD se modifican post-traduccionalmente, y que al menos parte de estas MTP rinden GPBP nativa sustancialmente purificada no reactiva para los anticuerpos monoclonales existentes para GPBP. Los anticuerpos

monoclonales ejemplares de acuerdo con este aspecto de la solicitud se proporcionan en los ejemplos a continuación.

Los "anticuerpos monoclonales" de la solicitud pueden ser cualquier tipo de anticuerpo monoclonal, que incluyen pero sin limitación anticuerpos monoclonales convencionales, monoclonales humanizados, monoclonales quiméricos y fragmentos de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente purificado" significa que los anticuerpos monoclonales de la enumeración constituyen hasta el 80 % de los anticuerpos en una muestra sustancialmente purificada; más preferentemente al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más.

Tal como se usa en el presente documento, "que se une selectivamente" significa que el anticuerpo de GPBP se une preferentemente al epítipo de la GPBP nativa, en oposición a una o más moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos, tal como se entiende por los expertos en la materia.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse obteniendo células de bazo del animal [Véase Kohler y Milstein, Nature 256, 495-497 (1975)]. En un ejemplo, los anticuerpos monoclonales (AcMo) de interés se preparan inmunizando ratones consanguíneos con la GPBP nativa de 77 kD, la GPBP nativa de 91 kD, o un fragmento antigénico de las mismas, que incluye, pero sin limitación, uno o más epítipos que comprenden o consisten en los péptidos que contienen las MTP de EEEFFDAVE (SEC ID N°: 5), DDVHR (SEC ID N°: 6), LINEEEFFDAVEAALDRQ (SEC ID N°: 8), PYSRSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQ (SEC ID N°: 9), y GGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (SEC ID N°: 10). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales pueden unirse a uno o más epítipos que comprenden una o más MTP, seleccionadas del grupo que consiste en las MTP que contienen EEEFFDAVE (SEC ID N°: 5), DDVHR (SEC ID N°: 6), LINEEEFFDAVEAALDRQ (SEC ID N°: 8), PYSRSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQ (SEC ID N°: 9), y GGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK (SEC ID N°: 10). Una o más de las MTP pueden ser MTP covalentes. Los anticuerpos monoclonales pueden unirse a un epítipo que comprende una o más MTP (preferentemente MTP covalentes) presentes en el resto 320, 321, y/o 327 (numeración basada en la GPBP de 77 kD).

Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse por la ruta IP o SC con una cantidad y a intervalos suficientes para provocar una respuesta inmunitaria. Los ratones reciben una inmunización inicial en el día 0 y descansan durante aproximadamente 3 a aproximadamente 30 semanas. A los ratones inmunizados se les da una o más inmunizaciones de refuerzo por la vía intravenosa (IV). Los linfocitos de los ratones positivos para los anticuerpos se obtienen retirando los bazos de los ratones inmunizados mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Las células de hibridoma se producen mezclando los linfocitos esplénicos con un compañero de fusión apropiado en condiciones que permitan la formación de hibridomas estables. Las células productoras de anticuerpo y las células de fusión acompañantes se fusionan en polietilenglicol a concentraciones de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %. Las células de hibridoma fusionadas se seleccionan mediante crecimiento en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con hipoxantina, timidina y aminopterina mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los fluidos sobrenadantes se recogen de los pocillos positivos para el crecimiento y se exploran para la producción de anticuerpo mediante un inmunoensayo tal como un radioinmunoensayo en fase sólida. Las células de hibridoma de los pocillos positivos para el anticuerpo se clonan mediante una técnica tal como la técnica del agar blando de MacPherson, Soft Agar Techniques, en Tissue Culture Methods and Applications Kruse y Paterson, Eds., Academic Press, 1973.

"Anticuerpos monoclonales humanizados" significan anticuerpos monoclonales derivados de un anticuerpo monoclonal no humano, tal como un anticuerpo monoclonal de ratón. Como alternativa, pueden derivarse anticuerpos monoclonales humanizados de anticuerpos quiméricos que retienen, o retienen sustancialmente, las propiedades de unión antigénica de los anticuerpos monoclonales no humanos parentales, pero que muestran inmunogenicidad alterada en comparación con el anticuerpo monoclonal parental cuando se administran a humanos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales quiméricos pueden comprender fragmentos de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones constantes humanas y variables de ratón. Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden prepararse usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero sin limitación (1) el injerto de regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo monoclonal no humano en una región marco conservada humana y una región constante ("humanización"), y (2) trasplante de los dominios variables del anticuerpo monoclonal no humano, pero "cubriéndolos" con una superficie similar a la humana mediante el reemplazamiento de los restos de superficie ("chapado"). Estos métodos se divulgan, por ejemplo, en, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Set, EEUU, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Vexhoefer *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Moiec. Immunol. 31(3):169-217 (1994); y Kettieborough, C. A. *et al.*, Protein Eng. 4(7):773-83 (1991).

Los anticuerpos monoclonales pueden fragmentarse usando técnicas convencionales, y los fragmentos se exploran para su utilidad del mismo modo que para los anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los

puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab pueden obtenerse tratando un anticuerpo de IgG con papaína; Los fragmentos F(ab') pueden obtenerse con digestión con pepsina de un anticuerpo de IgG. Un fragmento F(ab') también puede producirse mediante unión al Fab', descrita a continuación por medio de un enlace tioéter o un puente disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando el puente disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento Fab' puede obtenerse tratando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con un agente reductor, tal como ditiotreitól. Los péptidos de los fragmentos anticuerpo también pueden generarse mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans *et al*, J. Immunol Meth 184: 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> puede incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación de la transcripción para rendir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncado.

Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos monoclonales incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste esencialmente en los dominios VL, VH, CL y CH I; (ii) fragmentos F(ab)<sub>2</sub> y F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al*, (1989) Nature 341: 544-546), que consiste esencialmente en un dominio VH; y (vi) una o más de las CDR aisladas o un parátipo funcional.

Para generar una respuesta de anticuerpo, se formulan típicamente los inmunógenos con un transportador farmacéuticamente aceptable para la administración parenteral. Dichos adyuvantes aceptables incluyen, pero sin limitación, el adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, precipitado de aluminio, emulsión de agua en aceite que contiene *Corynebacterium parvum* y ARNt. La formulación de dichas composiciones, incluyendo la concentración del polipéptido y la selección del vehículo y otros componentes, está dentro de la experiencia de la técnica.

En un noveno aspecto, la presente solicitud divulga anticuerpos monoclonales sustancialmente purificados que se unen específicamente al polipéptido de SEC ID N°: 2 y no al polipéptido de SEC ID N°: 4. Dichos anticuerpos monoclonales de la solicitud son útiles, por ejemplo, para distinguir la GPBP 91 kD de la GPBP de 77 kD en ensayos que incluyen, pero sin limitación, ensayos basados en ELISA para la detección de GPBP en orina o plasma. Dichos anticuerpos monoclonales pueden generarse usando métodos anteriormente divulgados y el uso de los inmunógenos peptídicos presentes en el polipéptido de SEC ID N°: 2 pero no presentes en SEC ID N°: 4. Dichos inmunógenos pueden ser de cualquier longitud adecuada para generar una respuesta de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse contra un inmunógeno que comprende o consiste en DGWKGRPLSPVLVLLPRSARC (SEC ID N°: 7). Por lo tanto, en este caso, el anticuerpo monoclonal se une a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos DGWKGRPLSPVLVLLPRSARC (SEC ID N°: 7). Se divulga a continuación un ejemplo de dicho anticuerpo, Ac24.

En un aspecto adicional, la presente solicitud divulga células de hibridoma aisladas que expresan los anticuerpos monoclonales de los aspectos octavo y noveno de la solicitud.

La solicitud también divulga métodos para hacer los anticuerpos de la solicitud, tal como se divulga anteriormente y a continuación.

En un décimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para detectar la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) en la circulación, que comprenden

- (a) poner en contacto una muestra de plasma con una molécula de unión a GPBP que se une a GPBP en condiciones que promuevan la unión selectiva de la molécula de unión a GPBP a la GPBP;
- (b) retirar las moléculas de unión a GPBP no unidas; y
- (c) detectar la formación de complejos entre la molécula de unión a GPBP y la GPBP en la muestra de plasma.

Una "muestra de plasma" significa el plasma sanguíneo, el componente líquido de la sangre, y se prepara, por ejemplo, mediante centrifugación de sangre completa para retirar las células sanguíneas. Tal como se usa en el presente documento, una muestra de plasma también incluye una muestra de suero sanguíneo, de la que se han eliminado los factores de coagulación sanguínea.

En un undécimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para detectar la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) en orina, que comprende

- (a) poner en contacto una muestra de orina con una molécula de unión a GPBP que se une a la GPBP en condiciones que promuevan la unión selectiva de la molécula de unión a GPBP a la GPBP;
- (b) retirar la molécula de unión a GPBP no unida; y
- (c) detectar la formación de complejos entre la molécula de unión a GPBP y la GPBP en la muestra de orina.

Las muestras de orina se obtienen fácilmente, y la determinación de los analitos en orina es bien conocida en la técnica.

5 Una "molécula de unión a GPBP" es una molécula de péptido o de ácido nucleico que se une selectivamente a GPBP, en oposición a una o más otras moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos, etc. La realizaciones ejemplares de dichas moléculas de unión a GPBP incluyen pero sin limitación anticuerpos, aptámeros o sustratos. Tal como se usa en el presente documento, un "sustrato de GPBP" es una diana de la actividad biológica de GPBP que se une a GPBP, o un fragmento de la misma que retiene la actividad de unión a GPBP. Dichos sustratos de GPBP incluyen, pero sin limitación, I-20 (SEC ID N°: 16), proteínas que de interacción con GPBP (GIP) (SEC ID N°: 10 17-21), proteína básica de la mielina (MBP) y derivados de la misma (SEC ID N°: 22-25), proteína priónica (PrP) (SEC ID N°: 26), dominio en NC1 de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno de tipo IV ( $\alpha 3$ (IV) NC1) (SEC ID N°: 27), y péptido beta de la enfermedad de Alzheimer ( $A\beta_{1-42}$ ) (SEC ID N°: 28). Pueden encontrarse referencias ejemplares que demuestran la unión a GPBP de estos sustratos en las Patentes de EEUU N° 6.579.969; 7.147.855; y 7.326.768.

15 Tal como se divulga en los ejemplos a continuación, los inventores han descubierto formas de GPBP en la circulación y en la orina, incluyendo las isoformas de GPBP de 160-, 91-, 77-, 70-, 66-, 60-, 58-, 56-, 53-, 50-, 46-, 35 y 34 kD, y diversos agregados de las mismas. Por lo tanto, en los aspectos décimo y undécimo, el término "GPBP" se refiere a todas las isoformas de GPBP reactivas con anticuerpos selectivos de GPBP, que incluyen pero sin limitación a la GPBP de 77 kD y la GPBP de 91 kD, así como las isoformas de mayor y menor peso molecular de 20 160-, 60-, 58-, 56- 53- 50-46- 35 y 34 kD, y agregados de las mismas.

La "muestra de plasma" o "muestra de orina" pueden obtenerse de cualquier sujeto adecuado, preferentemente un mamífero, que incluye pero sin limitación a un ser humano, perro, gato, caballo o animal de granja (vaca, oveja, etc.). La muestra de plasma o de orina puede obtenerse de un sujeto humano, tal como un sujeto humano que se 25 sospecha que tiene una afección autoinmunitaria que incluye, pero sin limitación, síndrome de Goodpasture y/o glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario. Tal como se divulga en el presente documento, los inventores han aislado la GPBP nativa de 77 kD de la circulación del plasma humano y han observado niveles aumentados en pacientes de Goodpasture y en modelos animales para glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario, demostrando que la secreción de GPBP ocurre *in vivo* y revelando la utilidad clínica de la determinación serológica y 30 urinaria de GPBP.

El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo selectivo para GPBP, bien sea policlonal, monoclonal, o monoclonal humanizado tal como se describe anteriormente, aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales. Pueden usarse 35 los anticuerpos de acuerdo con los aspectos octavo y noveno de la solicitud. Los métodos de los aspectos décimo y undécimo de la solicitud pueden comprender analizar una isoforma específica de GPBP, tal como la GPBP de 77 kD o la GPBP de 91 kD; en estos casos, pueden utilizarse anticuerpos selectivos para la GPBP de 77 kD o selectivos para la GPBP de 91 kD, que incluyen pero sin limitación los anticuerpos selectivos divulgados en el presente documento. Los anticuerpos para el uso en los métodos de los aspectos décimo y undécimo de la solicitud son preferentemente los que se unen a las isoformas nativas de GPBP, tales como los que se divulgan en el presente 40 documento.

Las condiciones adecuadas para promover la unión de moléculas de unión a GPBP, tales como anticuerpos, aptámeros o sustratos, a la GPBP de las muestras de plasma u orina pueden determinarse por los expertos en la materia basándose en las enseñanzas del presente documento y los ejemplos proporcionados a continuación. Por 45 ejemplo, la unión antígeno-anticuerpo a menudo depende de interacciones hidrófobas (los denominados enlaces hidrófobos); por lo tanto, las altas concentraciones de sal, tales como en el rango molar pueden usarse para reducir la unión no específica y aumentar la unión específica de antígeno-anticuerpo. Opcionalmente, pueden incluirse etapas adicionales para promover la selectividad y especificidad, que incluyen pero sin limitación una o más de las etapas de lavado para retirar las proteínas de suero no unidas o unidas débilmente; los inhibidores de la unión no 50 específica para reducir la unión de las proteínas de alta concentración en suero, muestras control conocidas por contener isoformas de GPBP y/o controles negativos conocidos por no unirse unen a las isoformas de GPBP, y/o inclusión de muestras de suero u orina conocidas por no poseer GPBP (por ejemplo: con GPBP eliminada).

Estos aspectos décimo y undécimo de la presente solicitud pueden usarse para ensayar la presencia de GPBP en la 55 muestra de plasma o de orina mediante técnicas convencionales que incluyen, pero sin limitación ELISA, inmunofluorescencia y cromatografía (por ejemplo, ensayos de flujo lateral donde el anticuerpo se inmoviliza en una superficie y las proteínas de plasma o de la orina se marcan y se les permite fluir a lo largo de la superficie en condiciones adecuadas para permitir la unión del anticuerpo a la GPBP en el plasma o en la orina). Pueden usarse esferas funcionales (tecnología de Becton Dickinson) acopladas a citometría de flujo; esta técnica es un método 60 emergente para medir los niveles de proteínas en fluidos biológicos o extractos celulares/tisulares. Específicamente, se recubren esferas hechas de una matriz fluorescente con uno o más anticuerpos específicos de GPBP, se mezclan con la muestra de plasma y se incuban adicionalmente con un anticuerpo de detección marcado con una ficoeritrina. Finalmente, se analizan las esferas mediante un programa de citometría de flujo que selecciona las esferas de acuerdo con la emisión fluorescente de la matriz y la medición del nivel del analito a través de la emisión 65 de ficoeritrina. Existen hasta treinta tipos distintos de esferas que pueden detectarse simultáneamente y discriminarse por el citómetro. Este método acopla la alta sensibilidad y el rendimiento con la versatilidad dado que

un tipo específico de esfera recubierto con un anticuerpo de GPBP puede mezclarse con un tipo distinto de esfera recubierto con péptidos de unión para otro analito (es decir, autoanticuerpos) y medirse simultáneamente. La medición de diversos analitos podría potenciar el potencial de la determinación de GPBP. Las técnicas pueden determinar solamente la presencia o la ausencia de la isoforma o isoformas de GPBP. Como alternativa, las técnicas

5 pueden ser cuantitativas, y proporcionar información relacionada con la cantidad relativa de la proteína o péptido de interés en la muestra. Para propósitos cuantitativos, se prefieren los ELISA.

La detección de formación de inmunocomplejos puede llevarse a cabo mediante técnicas de detección convencionales. Por ejemplo, la detección de inmunocomplejos puede llevarse a cabo usando anticuerpos marcados

10 o anticuerpos secundarios. Dichos métodos, incluyendo la elección del indicador, son conocidos para los expertos ordinariamente en la materia. (Harlow y Lane, anteriormente mencionado). Como alternativa, los anticuerpos pueden acoplarse a una sustancia detectable. El término "acoplado" se usa para referirse a que la sustancia detectable está físicamente unida al anticuerpo. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas

15 adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa. Los ejemplos de grupos prostéticos de complejos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol. Los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

Tal como se observa anteriormente, los inventores han observado niveles aumentados en pacientes de Goodpasture y en modelos animales para glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario, demostrando que la secreción de GPBP ocurre *in vivo* y revelando la utilidad clínica de la determinación serológica de GPBP. Por lo tanto, los métodos de este aspecto de la solicitud pueden usarse, por ejemplo, para detectar un trastorno mediado por GPBP

25 en un sujeto, incluyendo pero sin limitación a un trastorno mediado por anticuerpos (incluyendo pero sin limitación una glomerulonefritis seleccionada del grupo que consiste en nefropatía de IgA, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Goodpasture), inflamación, trastorno mediado por estrés del RE, y cáncer resistente a fármacos. En estos casos, los métodos comprenderían la comparación de los niveles de GPBP detectados en una muestra de ensayo de suero o de orina con un control, tal como un control de una muestra ensayo de suero o de orina conocida por tener niveles "normales" de GPBP o valores normales anteriormente determinados de GPBP en suero u orina del sujeto del cual se obtiene el suero. El control puede proporcionar una curva patrón usando GPBP recombinante o un valor de referencia. En la comparación de la cantidad de GPBP en la muestra de suero o de orina con respecto a un control, un aumento (preferentemente un aumento estadísticamente significativo usando técnicas de análisis estadístico convencionales) en GPBP en la muestra de suero o de orina con respecto al control indica la presencia

30 de uno o más de los trastornos observados anteriormente, o un riesgo aumentado de desarrollar uno o más de los trastornos, los cuales se correlacionan con expresión aumentada de GPBP.

Se ha divulgado anteriormente que la expresión aumentada de GPBP induce nefropatía de IgA, glomerulonefritis relacionada con el complejo inmunitario; que la expresión aumentada de GPBP está íntimamente implicada en la patogénesis del síndrome de Goodpasture; y que la expresión aumentada de GPBP media la resistencia de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos que inducen el plegamiento defectuoso de las proteínas y la muerte celular mediada por estrés del RE. Los métodos de la presente solicitud, por lo tanto, proporcionan métodos para diagnosticar estos trastornos mediante ensayos serológicos o urinarios para la presencia de GPBP. Por lo tanto, los métodos identifican bien individuos que tienen o que tienen riesgo de estar afectados con uno o más de los trastornos mediados por anticuerpos (que incluyen pero sin limitación una glomerulonefritis seleccionada del grupo que consiste en nefropatía de IgA, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Goodpasture), inflamación, un trastorno mediado por estrés del RE, y cáncer resistente a fármacos. Los métodos pueden usarse para ensayar en pacientes de cáncer bien antes o después de la iniciación de un régimen de quimioterapia; esos pacientes que se ensayan positivamente para los niveles aumentados en suero de GPBP tienen un riesgo aumentado de tener un tumor resistente a fármacos o de que su tumor desarrolle resistencia a fármacos, y un médico que los atiende puede evaluar apropiadamente las opciones de tratamiento a la luz de lo mismo. Además, dichos pacientes pueden someterse a ensayos periódicos para los niveles en suero u orina de GPBP para controlar el riesgo potencial de desarrollar un tumor resistente a fármacos. De modo similar, los pacientes de los que se piensa que tienen riesgo de desarrollar, o que se sospecha que han desarrollado ya, una glomerulonefritis seleccionada del grupo que consiste

40 en nefropatía de IgA, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Goodpasture, pueden someterse a ensayo para determinar los niveles de GPBP en suero u orina.

GPBP es una molécula de la circulación y de la MBG (membrana basal glomerular) un componente principal de la barrera de filtración glomerular; por lo tanto, la acumulación de GPBP en el glomérulo podía ser el resultado de la producción local pero también del secuestro de la GPBP de la circulación producida en otra parte, y podría también reflejarse la GPBP aumentada en la orina. La sobreproducción local podría explicar la glomerulonefritis primaria mediada por anticuerpos mientras que los niveles en circulación aumentados pueden inducir formas secundarias de esta patología y quizá son responsables de la recurrencia de la enfermedad después del trasplante renal. Por consiguiente, la cuantificación de los niveles de la GPBP en la circulación o en la orina es útil en la discriminación primaria de la glomerulonefritis mediada por anticuerpos primaria y la secundaria y en el control clínico del trasplante renal.

60

65

Combinando la determinación de GPBP con el análisis de otros analitos, los métodos permiten que se realice el diagnóstico o pronóstico diferencial de los trastornos anteriores. En un ejemplo no limitante, se ha descubierto que parte de los pacientes de nefropatía de IgA producen autoanticuerpos anti-membrana basal. Estos anticuerpos de la circulación reconocen el dominio NC1 del colágeno de tipo IV. La determinación del título de estos anticuerpos podría ayudar a controlar la progresión de la enfermedad o también a distinguir distintos pacientes de nefropatía de IgA o a realizar el pronóstico en estos pacientes. Mediante la medición de los autoanticuerpos anti-ADNmc, anti-nucleosoma y los niveles de GPBP se puede diagnosticar el lupus eritematoso sistémico pero también distinguir entre la nefropatía de IgA primaria y la nefropatía de IgA secundaria y el lupus eritematoso sistémico. Cualquier determinación usada para diagnosticar las enfermedades primarias enumeradas en Donadio y Grande (2002) N Engl J Med 347, 738-748 asociadas con la deposición glomerular de IgA, puede usarse en conjunción con los métodos de la invención para la detección en plasma u orina de la GPBP para el diagnóstico diferencial en pacientes de nefropatía secundaria de IgA.

Un valor normal de GPBP como una referencia para una curva patrón está entre ~ 1 ng/ml-10 ng/ml en plasma y de aproximadamente 0,2 ng/ml a 1,5 ng/ml en la orina, mientras que en los pacientes de Goodpasture excede los normales en al menos 2 veces; o en al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, o más los valores normales.

En un duodécimo aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar isoformas nativas de GPBP, que comprenden:

- (a) someter a una muestra de plasma a precipitación con sulfato de amonio;
- (b) llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico (CII) en la muestra de suero precipitada con sulfato de amonio;
- (c) identificar las fracciones de la CII que contienen isoformas nativas de GPBP;
- (d) someter a las fracciones de la CII que contienen isoformas nativas de GPBP a cromatografía de filtración en gel (CFG); y
- (e) identificar las fracciones de la CFG que contienen isoformas nativas de GPBP.

Estos métodos pueden usarse, por ejemplo, para purificar sustancialmente la GPBP nativa de 77 kD del plasma, tal como se divulga en más detalle en los ejemplos a continuación.

En un decimotercer aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar isoformas nativas de GPBP, que comprenden:

- (a) someter a una muestra de orina a precipitación con sales;
- (b) llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico (CII) doble en la muestra de proteínas precipitada con sales; y
- (c) identificar las fracciones de la CII que contienen isoformas nativas de GPBP.

Tal como se usa en el presente documento, "cromatografía de intercambio iónico doble" significa llevar a cabo dos etapas de cromatografía de intercambio iónico sucesivas y distintas antes de la etapa (c). Las realizaciones ejemplares de las técnicas de CII se conocen bien en la materia, e incluyen las que se divulgan en los ejemplos a continuación.

La GPBP de la orina, tal como se divulga en más detalle en los ejemplos a continuación.

En un decimocuarto aspecto, la presente solicitud divulga métodos para aislar las isoformas nativas de GPBP, que comprenden:

- (a) pasar una muestra de plasma o de orina a través de una columna de afinidad que comprende una molécula de unión a GPBP que se une selectivamente a la GPBP nativa;
- (b) lavar la proteína no unida de la muestra de plasma o de orina de la columna de afinidad; y
- (c) eluir las isoformas nativas de GPBP de la columna.

Estos métodos pueden usarse, por ejemplo, para purificar sustancialmente la GPBP nativa de 77 kD y la GPBP nativa de 91 kD de plasma y orina, tal como se divulga en más detalle en los ejemplos a continuación. La molécula de unión a GPBP puede comprender anticuerpos de GPBP. Los anticuerpos pueden comprender los nuevos anticuerpos monoclonales de la presente solicitud. La etapa de elución puede comprender el uso de un tampón de elución desnaturalizante.

Los detalles de los métodos de purificación del aspecto duodécimo, decimotercero y decimocuarto de la solicitud se proporcionan en los ejemplos a continuación.

## Ejemplo 1

### Sumario

5 La proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) es una Ser/Thr quinasa no convencional para el colágeno de tipo IV de la membrana basal. Más recientemente, se ha mostrado que la GPBP es una proteína extracelular que cuando se sobreexpresa induce la desorganización del colágeno de tipo IV y el depósito de complejos inmunitarios en la membrana basal glomerular (Ref. 4). En el presente documento se ha mostrado que las células expresan al menos dos isoformas de GPBP que son el resultado de la iniciación de la traducción canónica del ARNm (77-kDa) y no canónica (91-kDa). El polipéptido de 77 kDa interactuó con el colágeno de tipo IV y se localizó como una forma soluble en el compartimiento extracelular. Los polipéptidos de 91- y de 120-kDa derivados se asociaron con las membranas celulares y regularon los niveles del polipéptido de 77 kDa en el compartimiento extracelular. El motivo FFAT y el resto 26 de la región rica en serina se requirieron para la exportación del polipéptido de 77 kDa. Y la eliminación del resto 26 de la región rica en serina rindió la isoforma de GPBP anteriormente reconocida (GPBP  $\Delta$ 26/CERT) que fue citosólica y al contrario que GPBP, sensible a tratamiento celular con esfingomielinasa. Estos datos y los anteriores implican a *COL4A3BP* en un programa compartimental para la secreción de proteínas (es decir, colágeno de tipo IV), que incluye: 1) la fosforilación y la regulación molecular/supramolecular de la organización de la proteína (GPBP); y 2) el tráfico de ceramidas dentro de los orgánulos y la regulación del transporte de carga de proteínas en la membrana plasmática (GPBP  $\Delta$ 26/CERT). Finalmente, se ha aislado la GPBP de 77-kDa de la circulación a partir de plasma humano y se han observado niveles aumentados en pacientes de Goodpasture y en modelos animales para glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario, demostrando que la secreción de GPBP ocurre *in vivo* y revelando la utilidad clínica de la determinación serológica de GPBP.

### Introducción

25 La proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) fosforila el dominio no colagenoso-1 (NC1) de la cadena  $\alpha$ 3 del colágeno de tipo IV [ $\alpha$ 3(IV)NC1] (1). Este dominio es una estructura esencial en la organización molecular y supramolecular del colágeno de la membrana basal glomerular (MBG) y también la diana de los autoanticuerpos que median la glomerulonefritis en la enfermedad de Goodpasture (2). La expresión aumentada de GPBP se ha asociado con la patogénesis autoinmunitaria incluyendo la enfermedad de Goodpasture (3) y con la inducción de la desorganización del colágeno de la MBG y el depósito de anticuerpos de IgA (4). Estas observaciones sugieren que GPBP regula la organización del colágeno de la MBG e induce glomerulonefritis mediada por anticuerpos basados en colágeno de tipo IV cuando su expresión está anormalmente elevada (3, 4). *COL4A3BP* también codifica a GPBP $\Delta$ 26, una variante alternativa de corte y empalme de GPBP más abundante y menos activa que carece del resto 26 de la región rica en serina, que aparentemente no está regulada en esas condiciones patológicas (3).

La GPBP contiene múltiples elementos estructurales incluyendo un dominio de homología con pleckstrina (PH) en el extremo N terminal, una región Ser-Xaa-Yaa, una señal de localización nuclear bipartita, un dominio súper-enrollado, dos fenilalaninas en un motivo de rastreo ácido (FFAT) y un dominio esteroideogénico agudo regulatorio relacionado con la transferencia lipídica (START) en el extremo C terminal. Las características estructurales adicionales incluyen motivos para la auto-interacción y la fosforilación (1, 3, 5, 6). Los dominios PH comprenden una variedad de estructuras poco conservadas presentes solamente en eucariotas que se han propuesto como mediadores del direccionamiento de las proteínas a las membranas celulares a través de la interacción con fosfoinosítidos (7). Una variedad de proteínas incluyen varias proteínas quinasa que contienen dominios PH (8). Los motivos FFAT dirigen proteínas al RE a través de la interacción con el dominio citosólico transmembrana de las proteínas asociadas a proteínas vesiculares asociadas a la membrana (VAP) (9), de las que se ha propuesto que juegan un papel en el mantenimiento de la homeostasis del plegamiento de las proteínas en el retículo endoplasmático (RE) y en la regulación del transporte de carga de proteínas de la membrana plasmática (10, 11). Los dominios START unen lípidos que incluyen ceramida, fosfolípidos y esteroides, y son módulos presentes en una variedad de proteínas con funciones fisiológicas y patológicas distintas (12, 13).

Informes recientes han implicado al motivo FFAT y al dominio PH en la unión de los polipéptidos de GPBP al RE y al aparato de Golgi, respectivamente. Se ha postulado que la unión a estos orgánulos permite que el dominio START capture ceramidas del RE y las suministre al aparato de Golgi. Basándose en estas observaciones, los polipéptidos de GPBP se han descrito como transportadores citosólicos no vesiculares de ceramidas y se han renombrado como, CERT<sub>L</sub> (GPBP) y CERT (GPBP $\Delta$ 26) (5, 14). Sin embargo, las conclusiones de estos autores se han hecho en ausencia de datos precisos relacionados con la distribución intracelular de las proteínas nativas e ignorando completamente las pruebas inmunológicas que demuestran la expresión predominante de la GPBP en asociación con las membranas basales (3). Informes más recientes han mostrado que el transporte de ceramidas dependiente de CERT es crítico para el reclutamiento de la fosfolipasa A2 $\alpha$  así como para el reclutamiento y la activación de la proteína quinasa D en la red *trans* del Golgi, regulando finalmente de ese modo la producción de prostaglandinas y la exocitosis de proteínas, respectivamente (6, 15).

Las pruebas inmunohistoquímicas sugieren que GPBP es principalmente extracelular, aunque tiene potencial de localizarse en diversos sitios intracelulares (3, 4). La distribución de las proteínas es altamente informativa con

respecto a la función de la proteína; por lo tanto, fueron necesarios estudios adicionales para entender la función biológica de GPBP. En el presente documento se demuestra que la traducción del ARNm para la GPBP generó varios polipéptidos, ninguno de los cuales se expresaron significativamente en el citosol. Por el contrario, el estudio actual proporciona la prueba de que GPBP entra en la ruta secretora e interactúa con el colágeno de tipo IV. Además, se muestra que la eliminación del resto 26 de la región rica en serina mediante el corte y empalme alternativo de los exones localiza la proteína en el citosol, revelando que GPBP $\Delta$ 26/CERT representa una versión soluble intracelular de GPBP. Los presentes datos sugieren que el corte y empalme alternativo de exones y la iniciación de la traducción son estrategias para dirigir los productos de *COL4A3BP* a distintas localizaciones donde se espera que coordinen un programa biológico de multi-compartimental. Diversas líneas de investigación confirman que esta última incluye la fosforilación y la regulación de la organización del colágeno de la membrana basal (GPBP) (1, 3, 4) y el transporte de ceramidas entre los orgánulos que regula el transporte vesicular de carga de proteínas en la membrana plasmática (GPBP $\Delta$ 26/CERT) (6, 14). Finalmente, se muestra que la GPBP de 77-kDa es un componente serológico que puede usarse como un marcador clínico de la glomerulonefritis mediada por anticuerpo (es decir, enfermedad de Goodpasture y glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario).

## Material y métodos

*Procesamiento de las muestras de suero* - Se obtuvieron las muestras de sangre de ratones y de seres humanos de acuerdo con las guías institucionales para estudios en humanos y experimentación animal. Se usaron sueros de ratones New Zealand White (NZW, ratones blancos de Nueva Zelanda) que se caracterizaron anteriormente (4) y que representan a los jóvenes sanos (4 meses) y ancianos que experimentan una inmunidad de IgA mediada por complejo (7 meses). La plasmaféresis en seres humanos y los sueros del control o de los pacientes de Goodpasture se obtuvieron siguiendo procedimientos convencionales.

*Anticuerpos y proteínas recombinantes* - Usando isoformas truncadas recombinantes de GPBP y péptidos sintéticos, se mapeó el epítipo del anticuerpo monoclonal 14 (AcMo 14) de ratón específico para GPBP/GPBP $\Delta$ 26 (1) para el motivo FFAT (Fig. 9). Se planteó el anticuerpo AcMo E26 contra los 26 restos característicos de GPBP (GPBP<sub>pep1</sub>) y por lo tanto, no reaccionó con GPBP $\Delta$ 26/CERT (Fig. 1A). Los fragmentos monoclonales humanos F(ab)<sub>2</sub> se aislaron de bibliotecas de expresión recombinante de F(ab)<sub>2</sub> usando un péptido sintético que representaba la región alternativa traducida (ATR) de GPBP (Fig. 2C) (Antibodies by Design, MorphoSys AG). Los fragmentos de F(ab)<sub>2</sub> reactivos se caracterizaron adicionalmente usando transferencia de Western y proteínas recombinantes que expresaban las ATR predichas (no mostrado). El fragmento F(ab)<sub>2</sub> más reactivo (Ac 24) se usó para caracterizar los polipéptidos nativos de GPBP y el fragmento de F(ab)<sub>2</sub> menos reactivo (Ac 20) se usó como control negativo en estos estudios. Los anticuerpos policlonales de pollo inmunopurificados específicos para GPBP anteriormente notificados ( $\alpha$ GPBP) (4) se biotinilaron para el uso en citometría de flujo o se marcaron con Alexa Fluor 647 (Invitrogen) para inmunofluorescencia directa. Los anticuerpos policlonales específicos para GPBP y GPBP $\Delta$ 26/CERT se produjeron bien en conejos inmunizados con GST-FLAG-GPBP (1) siguiendo procedimientos convencionales ( $\alpha$ GPBP<sub>r</sub>) o en pollos inmunizados con un péptido sintético específico y se adquirieron en Abcam ( $\alpha$ GPBP<sub>ab</sub>). Los anticuerpos específicos en  $\alpha$ GPBP<sub>r</sub> se purificaron por afinidad usando FLAG-GPBP recombinante (véase a continuación) unida a Sefarosa-CNBr (Sigma). Para la detección de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se usó un anticuerpo monoclonal proporcionado por Erwin Knecht. Los anticuerpos policlonales específicos para la calregulina, p65 o catepsina D fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc y los específicos para la piruvato deshidrogenasa (PDH) fueron de Molecular Probes. Los anticuerpos monoclonales específicos para PrP (clon 3F4) o para golgina-97 fueron de Clontech y Molecular Probes, respectivamente. Para detectar FLAG, se usó FLAG/M2 o FLAG/M2-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma) para el análisis de transferencia de Western y los anticuerpos de pollo ( $\alpha$ FLAG) o anticuerpos de cabra ( $\alpha$ FLAG-FITC) para la inmunofluorescencia (Abcam). El Alexa Fluor® 488-estreptavidina fue de Molecular Probes y los anticuerpos secundarios fueron de Promega (conjugados anti-ratón y anti-conejo HRP), Jackson ImmunoResearch (F(ab)<sub>2</sub> HRP anti-humano) y Sigma (HRP anti-pollo y otros conjugados con FITC y TRITC). Los FLAG-GPBP y FLAG-GPBP $\Delta$ 26 recombinantes se expresaron en *Pichia pastoris* y se purificaron por afinidad tal como se describe anteriormente (1, 3).

*Construcciones de los plásmidos* - Se ha notificado la producción de pc-n4', una construcción derivada de pcDNA3 (Invitrogen) que expresaba un ADNc que contenía la región no traducida 5' (UTR) y la secuencia codificante del ARNm de GPBP (1). Los plásmidos derivados de pc-n4' incluyeron pc-GPBP-Met, un mutante de delección desprovisto de la UTR 5', y pc-n4'-Mmut, una construcción donde la iniciación de la traducción canónica AUG (Met) se sustituyó por GGA (Gly). La producción de pc-FLAG-GPBP, que expresa la secuencia de FLAG fusionada con la región codificante de GPBP, se notificó anteriormente (1) y se usó para obtener pc-FLAG-GPBP $\Delta$ FFAT, que portaba una delección en el motivo FFAT (Fig. 9). El pc-FLAG-GPBP $\Delta$ 26 expresa la secuencia de FLAG fusionada con la región codificante de GPBP $\Delta$ 26 y se ha producido de modo similar a pc-FLAG-GPBP. Para determinar el sitio de iniciación que representaba la ATR, se produjeron mutantes pc-n4' y pc-n4'-Mmut introduciendo codones de terminación en diversas posiciones en la fase de lectura abierta (ORF) aguas arriba de la posición iMET. Se empleó el p*Silencer*<sup>TM</sup> 2.1-U6 higo (Ambio) para la expresión transitoria del ARNm pequeño de interferencia (ARN<sub>pi</sub>) específico para GPBP o para GPBP/GPBP $\Delta$ 26. Las construcciones derivadas correspondientes y las secuencias de ADNc diana fueron: pSi-GPBP/GPBP $\Delta$ 26-2, ACAGAGTATGGCTGCAGAG (SEC ID N°: 11); pSi-GPBP/GPBP $\Delta$ 26-3, GTACTTTGATGCCTGTGCT (SEC ID N°: 12); pSi-GPBP-1, GCCCTATAGTCGCTCTTCC (SEC ID N°: 13). La

selección de la secuencia diana y la construcción del plásmido se basaron en las recomendaciones del fabricante. La eficacia de los plásmidos que expresaban el ARNpi se evaluó en un sistema celular de expresión recombinante (no mostrado). El plásmido control de estos estudios (pSi-control) se diseñó para dirigirse al ARNm de la proteína de verde fluorescente, una proteína que no se expresa en células humanas. Todos los mutantes se produjeron mediante mutagénesis basada en PCR convencional y la fidelidad de todos los ADNc clonados se confirmó mediante secuenciación de los nucleótidos.

*Cultivo celular y transfección* – Las células HEK-293 o HeLa crecieron con medio Eagle modificado de Dulbecco o Medio Eagle Mínimo Esencial respectivamente, complementado con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 % (v/v) y penicilina (100 U/ml)/sulfato de estreptomicina (0,1 mg/ml), a 37 °C en un ambiente humidificado con el 5 % de CO<sub>2</sub>. A menos que se indique lo contrario las células usadas en los estudios fueron células HEK 293.

Las transfecciones se realizaron durante 16-24 h usando el sistema de transfección de mamíferos ProFection-fosfato de calcio (Promega) o Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para los estudios de inmunofluorescencia, se sembraron las células en cubreobjetos recubiertos de poli-L-lisina en placas de 24 pocillos. Donde las células HEK 293 indicadas se transfectaron con pc-n4'-Mmut y se seleccionaron con G418 (Invitrogen) durante 15 días. Las células resistentes se clonaron adicionalmente mediante dilución límite y se determinó la expresión de la GPBP de 91-kDa en una serie de clones individuales mediante análisis de transferencia de Western de los extractos celulares (véase a continuación). Los clones que expresaban niveles elevados (c8, c14) o reducidos (c19) de la de 91-kDa se usaron en los estudios funcionales.

*Transcripción y traducción in vitro* - Se usó el sistema TNT®-T7 acoplado a lisado de reticulocitos (Promega) para realizar la transcripción/traducción *in vitro* de ~ 1 µg del plásmido, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para evaluar la síntesis de proteínas, se añadió [<sup>35</sup>S] metionina a las mezclas y los polipéptidos marcados se identificaron mediante SDS-PAGE y fluorografía. Brevemente, después se fijaron los geles de electroforesis 1 h con metanol al 45 % y ácido acético al 7,5 %. Posteriormente, los geles se trataron dos veces con dimetilsulfóxido durante 30 minutos y con el 22,5 % de 2,5-difeniloxazol en dimetilsulfóxido durante 30 minutos adicionales. Finalmente, los geles se equilibraron con agua, se secaron y se expusieron a -70 °C.

*Extractos celulares y fraccionamiento celular* – Para obtener extractos celulares, los cultivos en crecimiento se enjuagaron con fosfato salino tamponado (PBS) enfriado en hielo y se homogeneizaron en un lecho de hielo con Tris-HCl 25 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-10 al 0,5 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y 10 µg/ml de leupeptina. Las mezclas se aclararon mediante centrifugación a 500 x g durante 10 min, se determinó la concentración de proteínas se y se almacenaron a -70 °C.

Para el fraccionamiento subcelular, los cultivos al 90 % de confluencia se recogieron en PBS y se sometieron a centrifugación (500 x g durante 10 min). Los sedimentos celulares se dispersaron en sacarosa 250 mM, PBS 10 mM a pH 7,5 que contenía 10 µg/ml de leupeptina, PMSF 1 mM y se rompieron con una homogeneización de Dounce (20 golpes) usando un mortero de vidrio. Los homogenizados celulares se aclararon progresivamente mediante centrifugación secuencial para obtener las distintas fracciones celulares. Los núcleos y las células que no se habían roto se recogieron mediante centrifugación a 500 x g durante 10 min. El sobrenadante se aclaró adicionalmente mediante centrifugación a 7.000 x g durante 10 min para obtener la fracción mitocondrial/lisosomal. Finalmente, el sobrenadante se aclaró mediante centrifugación a 150.000 x g durante 1 h para obtener la fracción microsomal que contiene fragmentos de membranas celulares, es decir, retículo endoplasmático, membrana plasmática y vesículas secretoras (sedimento) y la fracción citosólica (sobrenadante). Todas las etapas se realizaron de 0-4 °C y se determinaron las concentraciones de proteínas usando un reactivo para ensayos de proteínas (Bio-Rad).

Para algunos fines, el sobrenadante de 500 x g se cargó en una columna de recursos-Q FPLC, y el material unido se eluyó en un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en Tris-HCl 10 mM a pH 8. Las fracciones de NaCl de 0,55-0,6 M que contenían la mayor parte de la GPBP celular se precipitaron con etanol y se usaron como GPBP parcialmente purificada para el análisis de transferencia de Western.

*Reticulación ex vivo, tratamiento con esfingomielinasa e inmunoprecipitación con FLAG* - Para la reticulación *ex vivo*, se usaron células HEK 293-FLAG-α3(IV) que expresaban un dominio α3 (IV) NC1 humano exportable (BM40-FLAG-α3(IV) NC1) que se obtuvo esencialmente tal como se notifica anteriormente (1, 16). Las células crecieron hasta el 70-90 % de confluencia bien en placas de 150 mm (GPBP nativa) o en placas de seis pocillos (GPBP recombinante). Se realizó la reticulación 48 horas después de la transfección o cuando las células alcanzaron la confluencia indicada. Brevemente, se llevaron las células a TA enjuagando con PBS y se incubaron durante 10 min con medio de cultivo que contenía formaldehído al 1 %. La reacción de reticulación se extinguió con Gly-HCl 125 Mm en PBS (pH 7,4) durante 10 min a TA. Las células se llevaron a 4 °C enjuagando con PBS enfriado en hielo y un procedimiento continuo a 4 °C. Las células se lisaron con 1 o 5 ml (seis pocillos o placa de 150 mm) de tampón de extracción [Tris-HCl 16 mM a pH 7,5, NaCl 160 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, Triton X-10 al 1,1 %, SDS al 0,01 %, 10 µg/ml de leupeptina, PMSF 1 mM] durante 30 min, se centrifugaron a 500 x g durante 10 min para retirar los residuos celulares y los sobrenadantes se extrajeron durante toda la noche con 50 o 250 µl (placas de seis pocillos o de 150 mm) de una suspensión con αFLAG-gel de afinidad al 50 % usando

agitación suave. Las esferas se recogieron mediante centrifugación y se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de extracción y una vez con solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM). Las proteínas se eluyeron dos veces con 25 o 125  $\mu$ l (placas de seis pocillos o de 150 mm) de una solución de 100  $\mu$ g/ml de péptido FLAG en TBS a TA. Las muestras eluidas se llevaron a ebullición con tampón de electroforesis de la muestra (2X) durante 15 min para invertir la reticulación y se analizaron adicionalmente por SDS-PAGE y bien en una tinción de azul de Coomassie o una transferencia de Western.

Cuando estaba indicado, las células HeLa transfectadas con PC-FLAG-GPBP o pc-FLAG-GPBP $\Delta$ 26 se trataron con o sin esfingomielinasa de *Bacillus cereus* (Sigma) tal como se describe anteriormente (5) y las células se fijaron bien con metanol/acetona y se analizaron por inmunofluorescencia directa (véase a continuación) o se lisaron en Tris-HCl 10 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaF 50 mM y ortovanadato de sodio 1 mM, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina, PMSF 1 mM, se aclararon mediante centrifugación (500 x g durante 10 min) y se usaron para la inmunoprecipitación con FLAG (véase lo anterior). Los materiales inmunoprecipitados de las células no tratadas se dividieron y se trató una mitad con 5 U/ $\mu$ l de  $\lambda$ PPasa (New England Biolabs) a 30 °C durante 30 min siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron adicionalmente mediante transferencia de Western usando anticuerpos anti-FLAG.

Para algunos experimentos, las células crecieron en placas de 150 mm, se transfectaron con 20  $\mu$ g de construcciones de los plásmidos que codifican las proteínas etiquetadas con FLAG y se cultivaron durante dos días más en medio reciente. Se usaron veinte mililitros de medio para la inmunoprecipitación con FLAG esencialmente tal como se indica anteriormente.

*Citometría de flujo* – Las células se despegaron suavemente y se dispersaron en medio de cultivo. Los sitios de unión del anticuerpo no específicos de la superficie celular se bloquearon con fluido de ascitis de ratón que contenía AcMo no relevantes (solución de bloqueo). Las células se incubaron posteriormente en solución de bloqueo en presencia o ausencia de  $\alpha$ GPBP biotinilado con o sin péptido bloqueante (GPBP<sub>pep1</sub>) o un péptido sintético no relevante. Las células se incubaron con Alexa Fluor® 488-estreptavidina en solución de bloqueo y se sometieron adicionalmente a un análisis en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter) para medir la emisión de fluorescencia. La integridad celular se evaluó midiendo la dispersión frontal y lateral, usando células recientes no tratadas como referencia. Todas las incubaciones fueron a TA durante 1 h.

*Inmunofluorescencia directa e indirecta con células fijadas* – Las células se transfectaron y se fijaron con metanol-acetona (1/1) que se enfrió a -20 °C durante 10 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con solución de bloqueo (suero de conejo diluido 1:2 en PBS) durante 30 min a TA, se incubaron con los anticuerpos primarios (20  $\mu$ g/ml en solución de bloqueo) durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda, seguido por la incubación del anticuerpo secundario (1:200 en solución de bloqueo) durante 1 h a TA. Las células se tiñeron con DAPI (1,25  $\mu$ g/ml) en fluido de montaje (DAKO) y se visualizaron en un microscopio Axioskop-2 plus (Carl Zeiss) combinado con una cámara Spot y un programa informático v2.2 (Diagnostic Instruments). Para algunos experimentos las células se transfectaron, se fijaron, se incubaron con  $\alpha$ FLAG-FITC y se visualizaron tal como se indica anteriormente. Las células no transfectadas se usaron como controles negativos.

*Inmunofluorescencia directa de células vivas* - Las células se cultivaron en placas de micro-pocillos con el fondo de vidrio (MatTek Corp) y cuando éstas alcanzaron ~50 % de confluencia, los medios se desecharon y se reemplazaron por medio reciente que contenía 10  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ GPBP-Alexa Fluor 647 con un exceso de GPBP<sub>pep1</sub> o cantidades equimolares de un péptido sintético no relacionado junto con Rodamina 123 (Invitrogen) para la tinción mitocondrial de las células vivas. El análisis de la fluorescencia de las células vivas se realizó con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2. Las células se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado con el 5 % de CO<sub>2</sub> en todas las etapas.

*Espectrometría de masas* – Las bandas individuales de proteínas se escindieron de un gel teñido con azul de Coomassie, se destiñeron, se digirieron en el gel con tripsina y se centrifugaron. Se secó un microlitro del sobrenadante y se resuspendió con 1  $\mu$ l de solución de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, de Sigma), se aplicó a la misma placa, se secó y se introdujo en el espectrómetro de masas. Los péptidos digeridos con tripsina se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI/TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems). Los datos recogidos se analizaron con el programa informático GPS (Applied Biosystems) y la identificación de proteínas se llevó a cabo usando el motor de búsqueda MASCOT v 2.0 (Matrix Science).

*Aislamiento de la GPBP de la circulación de plasma humano* – Se aplicaron diez mililitros de la plasmaféresis de pacientes de Goodpasture a una columna de Sefarosa-CNBr (Sigma) (lecho de 1 ml) que contenía 5 mg de  $\alpha$ GPBP<sub>Pr</sub> covalentemente unida. La columna se lavó con 20 ml de TBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (TBST) y se eluyó con tampón de elución Gentle-Immupure (Pierce). El material eluido se dializó contra TBS, se concentró con un Microcon YM-3 (Millipore) y se analizó adicionalmente mediante transferencia de Western usando  $\alpha$ GPBP<sub>Ab</sub>.

*Estimación de los niveles de GPBP en la circulación* – Se recubrieron pocillos individuales de placas de microtitulación con  $\alpha$ GPBP<sub>Pr</sub> (2  $\mu$ g/ml en TBS) durante toda la noche y se incubaron adicionalmente con tampón de

bloqueo (BSA al 3 % en PBS) durante 2 h. La GPBP recombinante y las muestras de suero se diluyeron en suero bovino fetal y se incubaron por duplicado durante 2 h. Las placas se incubaron después durante 1 h cada una con  $\alpha$ GPBPab (1:5.000 en TBS) y con conjugado anti-pollo-HRP (1:20.000 en TBS). Todas las etapas excepto la de recubrimiento (4 °C) se hicieron a TA y los pocillos se lavaron exhaustivamente con TBST entre las etapas. Finalmente, se hizo la detección usando el reactivo Amplex UltraRed (Invitrogen) con una excitación/emisión máxima ~ 568/581 nm en un lector de placas de microtitulación Víctor 2 (PerkinElmer). Se encontró un intervalo lineal de la curva patrón entre 0,5 y 10 ng/ml de la GPBP recombinante. Se usó el ensayo de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre las series. Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo. Para los cálculos, se usó el programa informático Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

*Análisis de SDS-PAGE y transferencia de Western* – Se realizaron en condiciones reductoras siguiendo procedimientos convencionales y usando quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección de los anticuerpos.

## Resultados

*COL4A3BP codifica polipéptidos de 77-, 91- y 120-kDa* – Para identificar GPBP y GPBP $\Delta$ 26, se usaron dos anticuerpos monoclonales distintos: el AcMo 14 anteriormente notificado por reconocer la GPBP y GPBP $\Delta$ 26 (1), y el AcMo e26, como un nuevo anticuerpo monoclonal planteado contra el resto 26 de la región rica en serina exclusivo para GPBP (**Fig 1A**). Usando mutantes de delección de GPBP y péptidos sintéticos, se mapeó el epítipo del AcMo 14 para el motivo FFAT y, por lo tanto, este anticuerpo no reaccionó con un mutante de GPBP que carecía del motivo FFAT (GPBP $\Delta$ FFAT) (**Fig. 9**).

El análisis de transferencia de Western de los extractos celulares reveló que el AcMo 14 principalmente reconocía un solo polipéptido con un peso molecular aparente ( $P_r$ ) de ~ 77-kDa<sup>(1)</sup> mientras que el AcMo e26 reaccionaba con dos polipéptidos de ~ 91- y 120-kDa de  $P_r$  (Fig. 1B). También se observó una reactividad menor y variable hacia los polipéptidos de ~ 77-, 60-, 50- y 32-kDa con el AcMo e26 y contra los polipéptidos de ~ 91- y 120-kDa con el AcMo 14 (no mostrado). Se descubrieron especies moleculares reactivas similares en una serie de células humanas cultivadas que incluían las células HEK 293 (Fig. 1B), fibroblastos humanos, células HeLa, hTERT-RPE y hTERT-BJ1 (no mostrado).

Para caracterizar adicionalmente los productos de *COL4A3BP*, se comparó la expresión de los ARNm nativos y recombinantes (Fig. 1C). Para estos fines, se usó pc-n4', una construcción que porta la UTR5' y la secuencia codificante de *COL4A3BP* (1, 17), en ensayos de expresión génica transitoria en células cultivadas. La expresión de pc-n4' rindió tres polipéptidos de ~ 77-, 91- y 120-kDa que se detectaron mediante el AcMo e26. Por el contrario, solamente los polipéptidos de ~ 77- y 91-kDa fueron significativamente reactivos con el AcMo 14. Sorprendentemente, el polipéptido reactivo más prominente para el AcMo e26 en los lisados recombinantes (77-kDa), que representaba el producto del ARNm anteriormente notificado (1), no tuvo una contraparte nativa significativa. También se observó que el AcMo 14 reaccionó comparativamente más fuertemente con el polipéptido recombinante de 91- que con el de 120-kDa.

Para determinar adicionalmente el origen de los polipéptidos nativos, se usaron ARN pequeños de interferencia (ARNpi) específicos para *COL4A3BP* (figura 1D). La expresión de los tres polipéptidos nativos se redujo cuando se expresaban estos ARNpi; sin embargo, el ARNpi específico tanto para GPBP como para GPBP $\Delta$ 26/CERT fue más eficaz en la reducción de la expresión del polipéptido de 77-kDa mientras que el ARNpi específico de GPBP redujo más eficazmente la expresión de polipéptidos de 91- y 120-kDa (comparación de pSi-GPBP/GPBP $\Delta$ 26-3 y pSiGPBP-1). Colectivamente, estos datos sugirieron que los productos celulares principales de *COL4A3BP* incluían GPBP $\Delta$ 26/CERT (77-kDa) y las isoformas anteriormente no reconocidas de 91- y 120-kDa, portando probablemente ésta última un motivo FFAT modificado que impidió la unión consistente del AcMo 14. La reducción en los niveles celulares del polipéptido de 77-kDa cuando se usaban ARNpi específicos de GPBP requiere investigación adicional dado que este polipéptido no mostraba reactividad significativa con el AcMo e26 (**Fig. 1B**).

*Las principales isoformas de GPBP son el resultado de la iniciación de la traducción no canónica del ARNm* - Para definir adicionalmente el origen de las isoformas celulares de GPBP, se produjeron mutantes de construcciones derivadas de (pc-n4') que expresaban ARNm mutantes que consistían en la delección de la UTR5' o la sustitución de iMet por Gly (**Fig. 2A**) y éstos se usaron en ensayos de expresión de proteínas (Fig. 2B). En las células, las construcciones que representaban el ARNm con la UTR5' eliminada (pc-GPBP-Met) produjeron solamente el polipéptido de 77-kDa y las construcciones que representaban la sustitución de iMet por Gly (pc-n4'-Mmut) expresaron solamente los polipéptidos de 91- y 120-kDa (Fig. 2B, *ex vivo*). Sin embargo, en un sistema de traducción libre de células, pc-GPBP-Met también expresó el polipéptido de GPBP de 77-kDa pero pc-n4'-Mmut rindió solamente el polipéptido de 91-kDa y no se observó expresión significativa del polipéptido de 120-kDa (**Fig. 2B, in vitro**). Estos datos indicaron que el ARNm de GPBP contenía un(os) sitio(s) de iniciación de la traducción no canónico(s) en la UTR5' que representaba los péptidos de 91- y 120-kDa mientras que el polipéptido de 77-kDa fue el producto de la iniciación de la traducción canónica. Además, estos datos también sugerían que el de 91-kDa era el producto principal de la iniciación de la traducción no canónica y el polipéptido de 120-kDa representaba un

producto post-traduccional derivado que podría no expresarse en un sistema libre de células desprovisto de membranas celulares.

Para caracterizar adicionalmente la iniciación de la traducción no canónica, se interrumpió la ORF anteriormente reconocida (1) presente en la UTR5' del ARNm de GPBP (Fig. 2C) introduciendo un codón de terminación en las posiciones individuales de pc-n4'Mmut y se evaluó la expresión celular de proteínas mediante transferencia de Western (Fig. 2D). La construcción que portaba un codón de terminación en -83 (originalmente ACG, treonina) no expresó los polipéptidos de 91- y 120-kDa, pero la construcción con el codón de terminación a -84 (originalmente GCG, alanina) expresó los dos polipéptidos mapeando el sitio de iniciación de la traducción alternativo en el codón -83 (Thr en una un recuadro en la figura 2C). Se obtuvo la misma conclusión cuando se ensayó el mutante de terminación -83 de pc-n4' (Fig. 2D).

Para confirmar que el sitio de iniciación de la traducción no canónico también representaba los polipéptidos de GPBP endógenos de 91- y 120-kDa, se usó un fragmento F(ab)<sub>2</sub> humano (Ac 24) que reaccionaba específicamente con un péptido sintético que representaba la ATR predicha (secuencia sombreada en la Fig. 2C) para el análisis de transferencia de Western de los polipéptidos de GPBP parcialmente purificados (Fig. 2E). Tal como se esperaba, el Ac 24 reaccionó específicamente con dos polipéptidos de 91- y 120-kDa que también se reconocieron mediante el AcMo e26, sugiriendo que los polipéptidos nativos de GPBP contenían la ATR característica de los productos de traducción no canónicos.

*Las isoformas de 91- y 120-kDa de GPBP son polipéptidos insolubles unidos a la membrana* – Se predijo que la isoforma de GPBP de 91-kDa no era una proteína clásica secretada cuando se analizó con el servidor SecretomeP 2.0 (18, <http://www.cbs.dtu.dk/servicios/SecretomeP/>) y que se localizaba en la mitocondria (60,9 %), el núcleo (26,1 %), el citoesqueleto (8,7 %) y la vesículas del sistema secretor (4,3 %) cuando se analizó mediante Predicción PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>). Por lo tanto, estas consideraciones teóricas sugirieron que las isoformas de GPBP resultantes de la iniciación de la traducción no canónica eran polipéptidos no citosólicos que entraban en los orgánulos celulares incluyendo la ruta secretora.

Para evaluar estas predicciones, se incubaron células vivas intactas con  $\alpha$ GPBP y se analizaron mediante inmunofluorescencia directa y citometría de flujo para la detección de la unión de los anticuerpos (Fig. 3A y 3B). De un modo interesante,  $\alpha$ GPBP se unió a las células vivas de un modo específico dado que la unión de los anticuerpos se suprimió eficazmente mediante un péptido sintético que representaba la GPBP (GPBPpep1) pero no mediante un polipéptido no relacionado (Pepcont). Estos datos sugerían que las isoformas celulares de GPBP estaban presentes en la superficie externa de la membrana plasmática.

Para caracterizar adicionalmente la distribución intracelular de GPBP, las células se rompieron y se sometieron a fraccionamiento subcelular y análisis de transferencia de Western (Fig. 3C). En consonancia con las predicciones, las isoformas de GPBP de 91- y 120-kDa no se detectaron como materiales solubles sino que más bien éstas se encontraron principalmente asociadas con las fracciones mitocondriales-lisosomales y microsomales. Aún no se ha determinado si la presencia de GPBP en la fracción nuclear reflejaba, en efecto, la expresión nuclear de estas proteínas o si las células y/o mitocondrias sin romper contaminaban esta fracción. Por el contrario, un polipéptido de ~ 77-kDa que reaccionó con el AcMo 14 y no mostró reactividad con el AcMo e26 se detectó exclusivamente como soluble después de la centrifugación de la muestra a 150.000 x g durante 1 h (citósol).

Estos datos sugerían que los polipéptidos nativos de GPBP de 91- y 120-kDa se expresaban de manera insoluble asociados con las membranas celulares mientras que el polipéptido nativo GPBP $\Delta$ 26/CERT de 77-kDa se expresaba de manera soluble en el citoplasma.

*La GPBP de 77-kDa es una proteína soluble extracelular que interactúa con el colágeno de tipo IV* – Informes anteriores sugirieron que la GPBP de 77-kDa interactúa con el colágeno de tipo IV (1, 3, 4). Esto se evaluó adicionalmente mediante reticulación *ex vivo* e inmunoprecipitación con FLAG de las células que expresaban o no expresaban BM40-FLAG- $\alpha$ 3(IV)NC1, una forma recombinante exportable del  $\alpha$ 3(IV)NC1 humano (16), seguida por un análisis de SDS-PAGE de los inmunoprecipitados (Fig. 4A). Los anticuerpos específicos para FLAG precipitaron eficazmente el FLAG- $\alpha$ 3(IV)NC1 y un polipéptido de 77-kDa que representaba bien a la GPBP o GPBP $\Delta$ 26/CERT<sup>(2)</sup> (Western), junto con la Grp78 y Grp94 (Coomassie), dos chaperonas residentes en el RE implicadas en el plegamiento de las proteínas y el mantenimiento de la homeostasia del RE (19, 20). Para determinar adicionalmente que la GPBP, en efecto, interactuaba con FLAG- $\alpha$ 3(IV) en el RE, las células que expresaban o que no expresaban BM40-FLAG- $\alpha$ 3(IV)NC1 se transfectaron con pc-n4' y se analizaron de modo similar (Fig. 4B). Los anticuerpos para FLAG precipitaron eficazmente la GPBP de 77-kDa de las células que expresaban FLAG- $\alpha$ 3(IV)NC1 pero no la de las células control, sugiriendo que la isoforma de GPBP de 77-kDa entra en la ruta secretora e interactúa con FLAG- $\alpha$ 3(IV)NC1.

El análisis de la estructura primaria predijo una localización citoplasmática para el polipéptido de GPBP de 77-kDa (observaciones no publicadas). Sin embargo, los estudios *in vitro* (1, 3), *ex vivo* (Fig. 4) e *in vivo* (4) sugirieron que la isoforma de GPBP de 77-kDa se une y fosforila al colágeno de tipo IV. Además, a pesar de que los estudios de

expresión recombinantes revelaron que el polipéptido de GPBP de 77-kDa fue el polipéptido más prominente, no se detectaron niveles significativos de la contraparte nativa dentro de las células (**Fig. 1**). Colectivamente, estas observaciones sugirieron que la GPBP canónica era un polipéptido citosólico sometido a una secreción no clásica.

5 Para explorar si GPBP se secretaba, primero se expresó GPBP etiquetada con FLAG en células HeLa y se usaron anticuerpos específicos para FLAG para analizar la distribución intracelular de la proteína recombinante (**Fig. 5A**). La FLAG-GPBP se co-localizó exhaustivamente junto con la calregulina, una proteína residente del RE, sugiriendo que, tal como se describe para GPBP $\Delta$ 26/CERT (21, 22), FLAG-GPBP se unía al RE a través de una interacción FFAT-VAP. Por consiguiente, se expresó y se analizó de un modo similar FLAG GPBP $\Delta$ FFAT, una variante de FLAG-GPBP desprovista del motivo FFAT. La delección del motivo FFAT impidió la distribución de la GPBP al RE ya que la proteína se encontró exhaustivamente co-localizada junto con la golgina-97, una proteína residente en el aparato de Golgi (**Fig. 5A**). Se obtuvieron conclusiones idénticas cuando se llevaron a cabo los estudios en células HEK 293 (no mostrado). Estos datos fueron coherentes con la noción de que la GPBP recombinante era una proteína citosólica que se unía a VAP a través del motivo FFAT para su exportación y solamente cuando se alteraba la interacción con FFAT, la proteína tenía el potencial de asociarse con el aparato de Golgi. Esto se exploró expresando FLAG-GPBP o FLAG-GPBP $\Delta$ FFAT en células cultivadas y el mediante el análisis posterior de los medios de cultivo mediante inmunoprecipitación y análisis de transferencia de Western (**Fig. 5B**). De un modo interesante, los anticuerpos específicos de FLAG inmunoprecipitaron eficazmente la proteína recombinante de los medios de cultivo que expresaban FLAG-GPBP pero no de los de las células que expresaban FLAG-GPBP $\Delta$ FFAT, revelando que la unión mediada por FFAT al RE es esencial para la secreción de la GPBP de 77-kDa.

El GPBP $\Delta$ 26/CERT también se une al RE de un modo dependiente de FFAT (21, 22); sin embargo, se descubrió GPBP $\Delta$ 26/CERT en el citosol y GPBP de 77-kDa en el compartimiento extracelular, confirmando que el resto 26 de la región rica en serina exclusivo para GPBP también es crítico para la secreción de GPBP. Esto se exploró de un modo similar en cultivos que expresaban GPBP de 77-kDa etiquetada con FLAG o GPBP $\Delta$ 26/CERT (**Fig. 5C**). Tal como se esperaba, la presencia del resto 26 de la región rica en serina fue crítica para la secreción de la proteína dado que FLAG-GPBP $\Delta$ 26 no se expresó significativamente en el medio de cultivo.

*La GPBP de 91-kDa regula los niveles de la GPBP de 77-kDa en el compartimiento extracelular* – Las pruebas confirman que tanto la isoforma de GPBP de 77- como la de 91-kDa entran en la ruta secretora pero mientras que la de 91-kDa permanece asociada a las membranas, la GPBP de 77-kDa es soluble en el compartimiento extracelular. Se ha explorado si la GPBP de 91-kDa regula los niveles extracelulares de la GPBP de 77-kDa. Esto se llevó a cabo mediante la expresión recombinante de FLAG-GPBP en líneas celulares individuales que expresaban GPBP recombinante de 91-kDa a distintos niveles (**Fig. 6A**) seguida de la inmunoprecipitación con FLAG de los correspondientes medios de cultivo y el análisis de los inmunoprecipitados mediante transferencia de Western (**Fig. 6B**). De un modo interesante, la expresión aumentada de la GPBP de 91-kDa recombinante se asoció con niveles aumentados de FLAG-GPBP en el medio de cultivo, sugiriendo que la GPBP de 91-kDa indujo la secreción de la GPBP de 77-kDa al compartimiento extracelular.

*La GPBP de 77-kDa no es sensible al tratamiento celular con esfingomielinasa* - Los estudios de expresión recombinante también mostraron que la GPBP de 77-kDa era un polipéptido citosólico asociado con el RE que experimentó la translocación al aparato de Golgi cuando mutaba el motivo FFAT (**Fig. 5A**). Por consiguiente, la pregunta fue si la GPBP de 77-kDa experimentaba la desfosforilación y translocación al aparato de Golgi en respuesta al tratamiento celular con esfingomielinasa tal como se notificó anteriormente para GPBP $\Delta$ 26/CERT (5). Para estos estudios, las células que expresan GPBP etiquetada con FLAG o GPBP $\Delta$ 26/CERT se trataron con esfingomielinasa de *Bacillus cereus* (bSMasa) y se analizaron las proteínas intracelulares de interés mediante inmunoprecipitación con FLAG y transferencia de Western (**Fig. 7A**). Tal como se observó anteriormente (1, 5), ambas proteínas recombinantes se fosforilaron y el tratamiento con una fosfatasa general ( $\lambda$ PPasa) redujo su  $P_r$  en un grado similar (flechas superiores e inferiores). Sin embargo, el tratamiento celular con esfingomielinasa tuvo distintas consecuencias para cada proteína recombinante; mientras la FLAG-GPBP $\Delta$ 26/CERT se desplazó a un  $P_r$  más bajo (flechas superiores y del medio), no se observó un desplazamiento significativo del  $P_r$  para FLAG-GPBP. Esto sugirió que la reducción en los niveles celulares de esfingomielina causados por el tratamiento de esfingomielinasa indujo la desfosforilación de FLAG-GPBP $\Delta$ 26/CERT pero no afectó significativamente al estado de fosforilación de FLAG-GPBP. Tal como se esperaba, el análisis de inmunofluorescencia de las células reveló que el tratamiento con esfingomielinasa promovió la translocación de FLAG-GPBP $\Delta$ 26/CERT al aparato de Golgi sin alterar significativamente la distribución intracelular de la FLAG-GPBP (**Fig. 7B**).

*Los niveles de la GPBP de 77-kDa en la circulación están positivamente regulados en pacientes de Goodpasture y en modelos animales de glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario* – Las pruebas sugirieron que la GPBP de 77-kDa era una proteína soluble secretada *in vivo* que se investigó primero por cromatografía de inmunofluorescencia para aislar la GPBP de 77-kDa humana de la circulación (**Fig. 8A**). Se usó la plasmaféresis obtenida mediante procedimientos terapéuticos convencionales a partir de pacientes de Goodpasture, en los cuales se predijo que expresaran niveles de GPBP más elevados (3). Tal como se esperaba, se identificó un solo polipéptido de 77-kDa en el material eluido de la columna de afinidad que reaccionó con los anticuerpos específicos para GPBP, sugiriendo que la GPBP de 77-kDa es secretada *in vivo* y es un componente del plasma humano. Tanto para validar la

purificación por afinidad como para determinar los niveles de la GPBP de 77-kDa de un modo más preciso, se reveló un ELISA empleando los mismos anticuerpos que se usaron en la cromatografía de afinidad para capturar y detectar la GPBP recombinante humana (**Fig. 8B**). Se usó este ELISA para determinar los niveles de la GPBP de 77-kDa en la circulación en muestras que representaban el control y la glomerulonefritis mediada por anticuerpos (**Fig. 8C, D**). El ELISA mostró un intervalo lineal entre 0,5 ng y 10 ng/ml cuando se medía la GPBP recombinante (**Fig. 8B**) y se detectó comparativamente más GPBP de 77-kDa en la circulación en pacientes de Goodpasture que en los individuos control (**Fig. 8C**). Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon ratones NZW jóvenes (4 meses) y ancianos (7 meses) (**Fig. 8D**), una cepa de ratón que desarrolla una glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario de IgA dependiente de GPBP y propensos a la producción de autoanticuerpos de lupus que comienza a los 7 meses de edad (4).

## Discusión

En el presente documento se han obtenido pruebas contundentes de que el ARNm de GPBP se somete a la iniciación de la traducción canónica (AUG) y no canónica (ACG) para generar dos polipéptidos principales de 77- y 91-kDa, respectivamente. Los resultados del presente estudio también confirman que ambos productos entran en la ruta secretora. Sin embargo, mientras que el de 77-kDa alcanza el compartimiento extracelular y existe en una forma soluble inmunoprecipitable, el polipéptido de 91- y su derivado de 120-kDa permanecen principalmente en forma insoluble, asociados con membranas celulares. El uso de la iniciación de la traducción en ACG y la iniciación de la traducción no canónica para dirigir las proteínas a compartimentos celulares alternativos se ha descrito para otros genes humanos (23, 24). Basándose en las pruebas anteriores (21, 22), se espera que la unión de GPBP mediada por FFAT al RE (**Fig. 5**) ocurra a través de VAP y, por lo tanto, que la interacción de FFAT-VAP medie los mecanismos moleculares subyacentes a la translocación de GPBP en el RE. Además, también se muestra que la variante de corte y empalme alternativa anteriormente notificada GPBP $\Delta$ 26/CERT es una variante de GPBP que permanece principalmente en forma soluble en el citoplasma. Por lo tanto, estos datos confirman la noción de que la iniciación de la traducción alternativa del ARNm y el corte y empalme de los exones son estrategias para dirigir a la GPBP a múltiples localizaciones incluyendo el citosol, la ruta secretora, la membrana plasmática y el compartimiento extracelular. Además, las observaciones anteriores han localizado a la GPBP en el núcleo de las espermatogonias humanas (1) y en las mitocondrias y lisosomas del hígado de rata (observaciones no publicadas), sugiriendo que la distribución de GPBP es prácticamente ubicua y, por lo tanto, se espera que su programa biológico se ejerza en varios compartimentos. Se ha notificado un ADNc de la GPBP humana a partir de células endoteliales de la arteria pulmonar (número de referencia de GenBank AK096854). De un modo interesante, AK096854 porta un sitio de iniciación de la traducción canónica alternativa (iMet) que extiende la ORF del polipéptido de 91-kDa 45 restos aguas arriba. No se han descubierto pruebas de la expresión del ARNm de AK096854 en células HEK 293, ni en una serie de otros tejidos humanos incluyendo el hígado, riñón, cerebro, músculo, páncreas, queratinocitos, linfocitos y las células HeLa (no mostrado). No obstante, no puede excluirse la existencia de isoformas de GPBP producidas por la iniciación canónica de la traducción del ARNm (es decir AK096854) con un P<sub>r</sub> similar a la de los productos de la iniciación de la traducción no canónica notificados en el presente documento.

El análisis de la estructura primaria predice que los productos de GPBP traducidos no canónicamente entran en la ruta secretora. Varias observaciones confirman estas predicciones, principalmente: 1) las isoformas no canónicas de GPBP son especies moleculares asociadas con membranas celulares (**Fig. 3**); 2) las isoformas no canónicas de GPBP son las especies predominantes de GPBP en la célula (**Fig. 1**) y los anticuerpos específicos de GPBP se unieron a la superficie externa de células vivas intactas (**Fig. 3**); 3) el polipéptido de 120-kDa no se expresa a partir del ARNm cuando la traducción ocurre en un sistema libre de células desprovisto de membranas celulares (**Fig. 2**); y 4) la isoforma de GPBP de 91-kDa regula los niveles de la GPBP de 77-kDa en el compartimiento extracelular (**Fig. 6**). Tomadas en conjunto, estas observaciones confirman la noción de que el polipéptido de 91-kDa es el producto principal de la iniciación de la traducción no canónica. Esta isoforma entra en la ruta secretora donde se somete a la modificación covalente para rendir el polipéptido de 120-kDa y permanece unida a las membranas alcanzando la superficie externa de la membrana plasmática. El mecanismo por el cual la GPBP de 91-kDa regula los niveles extracelulares de la GPBP de 77-kDa sigue siendo desconocido.

Se ha observado que cuando la expresión está anormalmente elevada (es decir, expresión génica transitoria), los polipéptidos de GPBP se acumulan en el citosol (**Fig. 10**), revelando que el transporte de la GPBP al RE es un proceso saturable. De un modo interesante, en estas condiciones de expresión, el AcMo e26 mostró más reactividad para el polipéptido de 77-kDa citosólico que para esta isoforma cuando esta residía en el compartimiento extracelular (**Fig. 10 y 11**). Además, el AcMo 14 reaccionó comparativamente más con la GPBP de 91-kDa recombinante que con la nativa y no reaccionó significativamente con el producto nativo o recombinante de 120-kDa (**Fig. 1**). Estas observaciones sugieren que el resto 26 de la región rica en serina (AcMo e26) y el motivo FFAT (AcMo 14) se someten a modificaciones covalentes en la ruta secretora. Estos datos también implican que en circunstancias reguladoras específicas (fisiológicas o patológicas) la GPBP puede expresarse como polipéptidos solubles en el citosol. Finalmente, aun no se ha determinado si la GPBP $\Delta$ 26/CERT de 91-kDa se expresa endógenamente y si la GPBP $\Delta$ 26/CERT puede transportarse dentro del RE sin someterse a secreción.

Los niveles de expresión del polipéptido de 77-kDa citosólico que representa a GPBP $\Delta$ 26/CERT se redujeron significativamente en las células que expresaban ARNpi específico para GPBP (**Fig. 1D**). Esto sugiere bien que el

ARNpi también se dirige al pre-ARNm o que el ARNm de GPBP es, en algún grado, un precursor del ARNm de GPBP $\Delta$ 26. Se ha descubierto que las células que expresan la GPBP recombinante también expresan cantidades limitadas de GPBP $\Delta$ 26/CERT recombinante (observaciones no publicadas). Esto revela que el ARNm maduro de GPBP se somete a procesamiento no clásico, de modo similar a como se notificó para XBP1 en respuesta a las señales de estrés en el RE (25). Como alternativa, las especies de GPBP que portan el resto 26 de la región rica en serina covalentemente modificado, que migran conjuntamente con GPBP $\Delta$ 26/CERT podrían explicar también esta observación.

Varias líneas de investigación confirman que GPBP regula el plegamiento de las proteínas en el RE y la organización supramolecular en el compartimiento extracelular más que el tráfico de ceramidas entre los orgánulos del citosol: 1) La GPBP de 77-kDa es una Ser/Thr quinasa no convencional que se une y fosforila al dominio  $\alpha$ 3(IV)NC1 en los sitios (1) que también están fosforilados *in vivo* (26); 2) La GPBP de 77-kDa se encuentra principalmente en el compartimiento extracelular tanto en forma soluble (**Fig. 5** y **Fig. 8**) como asociado a el colágeno de la MBG (4), y no se expresa a niveles significativos en el citosol de células cultivadas (Figs. 1 y 3); 3) Las isoformas celulares de GPBP se localizan en la superficie externa de la membrana plasmática (**Fig. 3**); 4) La isoforma de GPBP de 91-kDa se asocia con las membranas celulares (**Fig. 3**) y regula los niveles extracelulares de la isoforma de GPBP de 77-kDa (**Fig. 6**); 5) El dominio  $\alpha$ 3(IV)NC1 experimenta una diversificación estructural única y al menos dos isoformas conformacionales distintas (conformómeros) que se ensamblan en las membranas basales (27); 6) Una expresión aumentada de la GPBP de 77-kDa perturba la estructura cuaternaria del colágeno de tipo IV, sugiriendo que los niveles elevados de GPBP interfieren con el programa de diversificación conformacional (estructura terciaria) del dominio  $\alpha$ 3(IV)NC1 (4); 7) Niveles aumentados de la GPBP en suero se correlacionan con la glomerulonefritis basada en colágeno de tipo IV (**Fig. 8**); 8) El motivo FFAT es un requerimiento estructural para la secreción de la GPBP de 77-kDa (**Fig. 5**) y VAP es crítico para el mantenimiento de la homeostasis para el plegamiento adecuado de proteínas en el RE (10); 9) Grp78 y Grp94, chaperonas que residen en el RE y regulan la respuesta celular al plegamiento defectuoso de las proteínas (18, 19), se asocian con FLAG- $\alpha$ 3(IV) y la GPBP de 77-kDa (**Fig. 4**); 10) Se ha descubierto que la expresión aumentada de *COL4A3BP* media la resistencia de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos que inducen el plegamiento defectuoso de las proteínas y a la muerte celular mediada por el estrés del RE (28); 11) El tratamiento de las células con esfingomielinasa no induce la defosforilación ni altera la distribución intracelular de la GPBP de 77-kDa (**Fig. 7**); 12) La proteína quinasa D fosforila la GPBP pero no al mismo grado que a la GPBP $\Delta$ 26/CERT (6); 13) Los experimentos de disminución de la expresión y rescate revelan que la GPBP y la GPBP $\Delta$ 26/CERT ejercen funciones biológicas distintas durante la embriogénesis en pez cebra (29); y 14) La GPBP interactúa con las proteínas RTN3 y RTN4 que están ancladas al lado luminal/extracelular de las membranas en la ruta secretora (30).

La GPBP que carece del resto 26 de la región rica en serina también se une a VAP (21, 22); sin embargo, la captación de ceramidas sigue a la unión a VAP y posteriormente, la proteína migra al aparato de Golgi donde se libera la ceramida y se induce la exocitosis de las proteínas (6, 14). Por lo tanto, la transferencia de fosfatos y el tráfico de ceramidas pueden ser estrategias moleculares a través de las cuales *COL4A3BP* regula la secreción de proteínas (es decir, colágeno de tipo IV). En consonancia con esto, se ha mostrado que VAP también es crítico para regular el transporte de carga de proteínas en la membrana plasmática (11).

Diversas líneas de investigación confirman que *COL4A3BP* es una diana atractiva para las estrategias para diagnosticar y tratar trastornos mediados por anticuerpos (3, 4), inflamación (15), enfermedades mediadas por estrés del RE (10) y cáncer resistente a fármacos (28). Sin embargo, puede que las observaciones que confirman estas conclusiones necesiten re-interpretarse dado que muchas de ellas se han obtenido usando herramientas (es decir, ARNpi o anticuerpos) que fallaron al discriminar entre distintos productos génicos (es decir, GPBP y GPBP $\Delta$ 26/CERT), que se expresan en distintos compartimientos celulares, y que se desregulan diferencialmente en respuesta a estímulos (3). Por lo tanto, el presente estudio hace una contribución importante a este entendimiento clarificando los mecanismos por los cuales se generan diversas isoformas de GPBP dentro de las células.

Además, identificando la GPBP de 77-kDa humana en la circulación, se proporcionan pruebas contundentes de que la secreción de GPBP también es biológicamente relevante *in vivo*. El hallazgo de que los niveles de la GPBP de 77-kDa en la circulación se correlacionan con la expresión glomerular de GPBP y la patogénesis en modelos de ratón de glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario sugieren que la determinación serológica de GPBP es relevante en un entorno clínico. En consonancia con esto, los presentes estudios que demuestran la regulación positiva de la GPBP en la circulación en pacientes de Goodpasture confirman estas conclusiones y las observaciones anteriores sustanciales de que GPBP se sobreexpresa en estos pacientes (3, 31).

Estos hallazgos y los anteriores confirman que la GPBP promueve la secreción y la organización supramolecular del colágeno de tipo IV. Por consiguiente, GPBP es crítica para el ensamblaje adecuado de la MBG y la acumulación anormal de GPBP induce la rotura de la MBG y el depósito de complejos inmunitarios de IgA (4). Hasta donde se sabe, la expresión aumentada de GPBP, la disociación de la MBG y los depósitos de los complejos inmunitarios son nuevos mecanismos subyacentes de la enfermedad renal. Sigue sin determinar si mecanismos similares en la patogénesis en seres humanos; sin embargo, se han notificado pruebas ultraestructurales de la rotura de la MBG y de la acumulación de material denso a los electrones en pacientes que experimentan nefropatía de IgA y

nefritis por lupus (32, 33). Además, la expresión aumentada de GPBP podría reducir el reforzamiento de la estructura cuaternaria del colágeno de tipo IV, facilitando de ese modo la exposición de epítomos, la activación del sistema inmunitario y la unión de autoanticuerpos en la enfermedad de Goodpasture (34). En consonancia con esta última hipótesis, los pacientes de Goodpasture presentan niveles aumentados de GPBP en la circulación que confirman las observaciones anteriores de que la expresión de GPBP está regulada positivamente en los tejidos de Goodpasture (3, 31). La GPBP es una molécula de la circulación y la MBG un componente principal de la barrera de filtración glomerular; por lo tanto, la acumulación patogénica de GPBP en el glomérulo podría ser el resultado de la producción local pero también del secuestro de la GPBP de la circulación producida en otra parte. La sobreproducción local podría representar la glomerulonefritis primaria mediada por anticuerpos mientras que los niveles elevados en la circulación pueden inducir las formas secundarias de esta patología y quizá son responsables de la recurrencia de la enfermedad después del trasplante renal. Por consiguiente, la cuantificación de los niveles de la GPBP en la circulación podría ser útil para discriminar la glomerulonefritis primaria mediada por anticuerpos de la secundaria y para el control clínico del trasplante renal.

## 15 Referencias del ejemplo 1

1. Raya, A., Revert, F., Navarro, S., y Saus, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12642-12649.
2. Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., y Neilson, E. G. (2003) *N. Engl. J. Med.* **348**, 2543-2556.
3. Raya, A., Revert-Ros, F., Martínez-Martínez, P., Navarro, S., Rosello, E., Vieites, B., Granero, F., Forteza, J., y Saus, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 40392-40399.
4. Revert, F., Merino, R., Monteagudo, C., Macías, J., Peydro, A., Alcacer, J., Muniesa, P., Marquina, R., Blanco, M., Iglesias, M., Revert-Ros, F., Merino, J., y Saus, J. (2007) *Am. J. Pathol.* **171**, 1419-1430.
5. Kumagai, K., Kawano, M., Shinkai-Ouchi, F., Nishijima, M., y Hanada, K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 17758-17766
6. Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K., y Olayioye, M. A. (2007) *J. Cell Biol.* **178**, 15-22
7. Lemmon, M. A., y Ferguson, K. M. (2000) *Biochem J.* **350**, 1-18.
8. Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., y Alessi, D. R. (2000) *Biochem. J.* **351**, 19-31.
9. Loewen, C. J. R., Roy, A., y Levine, T. P. (2003) *EMBOJ.* **22**, 2025-2035.
10. Kanekura, K., Nishimoto, I., Aiso, S., y Matsuoka, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30223-30233.
11. Wyles, J. P., McMaster, C. R., y Ridgway, N. D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29908-29918.
12. Soccio, R. E. y Breslow, J. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22183-22186.
13. Alpy, F., y Tomasetto, C. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 2791-2801.
14. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., y Nishijima, M. (2003) *Nature* **426**, 803-809.
15. Lamour, N. F., Stahelin, R. V., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J. C., Merrill, A. H. Jr., Cho, W., Chalfant, C. E. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 1293-1304.
16. Netzer, K. O., Leinonen, A., Boutaud, A., Borza, D. B., Todd, P., Gunwar, S., Langeveld, J. P., y Hudson, B. G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11267-11274.
17. Granero, F., Revert, F., Revert-Ros, F., Lainez, S., Martínez-Martínez, P., y Saus, J. (2005) *FEBSJ.* **272**, 5291-5305.
18. Bendtsen, D. J., Jensen, J. L., Blom, N., von Heijne, G., y Brunak, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 349-356.
19. Yang, Y., y Li, Z. (2005) *Mol. Cells.* **20**, 173-182.
20. Ni, M., y Lee, A. S. (2007) *FEBSLett.* **581**, 3641-3651.
21. Perry, R. J., y Ridgway, N. D. (2006) *Mol. Biol. Cell.* **17**, 2604-2616.
22. Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M., y Hanada, K. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30279-30288.
23. Peabody, D. S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5031-5035
24. Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C., y Vagner, S. (2003) *Biol. Cell.* **95**, 169-178.
25. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., y Mori, K. (2001) *Cell* **107**, 881-891.
26. Revert, F., Penades, J. R., Plana, M., Bernal, D., Johansson, C., Itarte, E., Cervera, J., Wieslyer, J., Quinones, S., y Saus, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13254-13261.
27. Calvete, J. J., Revert, F., Blanco, M., Cervera, J., Tarrega, C., Sanz, L., Revert-Ros, F., Granero, F., Perez-Paya, E., Hudson, B. G., y Saus, J. (2006) *Proteomics* **6**, S237-S244.
28. Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P. H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A. A., Brenton, J. D., Downward, J., y Nicke, B. (2007) *Cancer Cell* **11**, 498-512.
29. Granero-Molto, F., Sarmah, S., O'Rear, L., Spagnoli, A., Abrahamson, D., Saus, J., Hudson, B.G., y Knapik, E.W. (2008) *J. Biol. Chem.* Apr 18. [Publicado electrónicamente con anterioridad a la impresión].
30. Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G. F., Gibbons, F. D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D. S., Zhang, L. V., Wong, S. L., Franklin, G., Li, S., Albala, J. S., Lim, J., Fraughton, C., Llamasas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R. S., Vyenhaute, J., Zoghbi, H. Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Roth, F. P., y Vidal, M. (2005) *Nature* **437**, 1173-1178.
31. Saus, J (2002) "Methods y reagents for treating autoimmune disorders" Solicitud de Utilidad de Patente con

Nº de serie PCT/EP02/01010. Publicación Nº WO 02/061430.

32. Haas M. "IgA Nephropathy y Henoch-Schonlein Purpura Nephritis". *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Editado por Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Editores 2007, páginas 423-486.

5 33. Balow, J.E., Boumpas, D. T., y Austin III, H.A. "Systemic Lupus Erythematosus y the kidney". *Systemic Lupus Erythematosus*. Edited by Lahita RG. San Diego, Academic Press, 1999, páginas 657-685.

34. Borza, D. B., Bondar, O., Colon, S., Todd, P., Sado, Y., Neilson, E. G., y Hudson, B. G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 27147-27154.

## 10 Notas al pie

(1) El polipéptido de 77-kDa puede resolverse como un doblete que representa la versión fosforilada (superior) y desfosforilada (inferior) de GPBP $\Delta$ 26/CERT (5)

15 (2) La secreción de la GPBP de 77-kDa se asocia con la pérdida de reactividad con el AcMo e26 (**Fig. 11**), excluyendo el uso de este anticuerpo para estimar los niveles de la GPBP nativa de 77-kDa en la ruta secretora.

## Abreviaturas

Las abreviaturas que se usan son:  $\alpha$ 3(IV)NC1, el dominio NC1 de la cadena  $\alpha$ 3 del colágeno de tipo IV; ATR, región alternativa traducida; CERT y CERT<sub>L</sub>, isoformas corta y larga de la proteína de transferencia de ceramidas; *COL4A3BP*, el gen que codifica GPBP (CERT<sub>L</sub>) y GPBP $\Delta$ 26 (CERT) la cual se denominó proteína de unión a  $\alpha$ 3 del colágeno de tipo IV; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; RE, retículo endoplasmático; FFAT, dos fenilalaninas en un rastreador ácido; MBG, membrana basal glomerular; GPBP y GPBP $\Delta$ 26, variantes de corte y empalme alternativas larga y corta de la proteína de unión al antígeno de Goodpasture; HRP, peroxidasa de rábano picante; AcMo, anticuerpo monoclonal; NC1, dominio no colagenoso-1; ORF, fase de lectura abierta; NCW, New Zealand White; PBS, fosfato salino tamponado; PH, homología con pleckstrina; TA, temperatura ambiente; SDS-PAGE, electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; START, transferencia esteroideogénica aguda reguladora relacionada con lípidos; UTR, región no traducida; VAP, proteína asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas.

30

## Ejemplo 2

### Identificación y aislamiento de GPBP de plasma humano

35 En el presente documento se usaron procedimientos químicos clásicos para el fraccionamiento de las proteínas de plasma humano y se identificaron múltiples estructuras terciarias y cuaternarias de GPBP en la circulación en plasma humano. Los datos también muestran que la GPBP de 77-kDa y las especies derivadas de menor PM son la(s) principal(es) isoforma(s) de GPBP en la circulación tal como se determinó mediante la reconstitución de las condiciones del plasma a partir las estructuras cuaternarias parcialmente purificadas de GPBP aisladas.

40

### Material y Métodos

La GPBP se purificó a partir de 50 ml de plasma control congelado usando una combinación de precipitación desalinizadora, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel.

45

Las proteínas precipitadas mediante congelación se retiraron primero mediante centrifugación del plasma a 8200 x g durante 10 min a 4 °C. Dado que las propiedades específicas de la purificación del plasma de GPBP no se conocen, las proteínas se precipitaron secuencialmente a partir de la muestra original con saturaciones crecientes de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 %, 40 %, 60 % y 80 %). Se realizaron precipitaciones secuenciales mediante centrifugación a 8200 x g durante 10 min a 4 °C y se disolvieron los precipitados en 5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Las mezclas de proteínas se desalinizaron mediante diálisis contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 usando bolsas de membrana con un corte de 3,5-kDa. El sobrenadante final de las precipitaciones de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dializó de un modo similar y se usó adicionalmente para la purificación como la fracción final rendida por el proceso de inmunoprecipitación.

50

55 Las fracciones rendidas por la desalinización se analizaron posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico (CII) usando una columna de intercambio aniónico HiTrap de Q-sefarsa. Primero se equilibró la columna con tampón A (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 20 mM), se cargó adicionalmente con cada muestra individual y se lavó con 10 volúmenes de tampón A. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente del tampón A al tampón B (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 1 mM) y se recogieron en fracciones de 0,6 ml. Las fracciones de la CII que contenían el material de la GPBP se detectaron mediante transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal N27 biotinilado específico para GPBP. Las fracciones de la CII que contenían GPBP se agruparon, se concentraron hasta 0,5 ml, y posteriormente se sometieron a cromatografía de filtración en gel con Superdex™200 10/300 CL. En este proceso, primero se equilibró la columna con TBS (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM), se inyectó la muestra en la columna y las proteínas se separaron por tamaño. Las fracciones de la filtración en gel se analizaron mediante transferencia de Western para la detección del material de GPBP con el anticuerpo monoclonal biotinilado N27. Las fracciones que contenían la GPBP se agruparon, se precipitaron con acetona al 80 % y se resuspendieron en

65

Tris/HCl 50 mM a pH 7,5, urea 8 M. Las mezclas resultantes, cada una correspondiente a una fracción inicial distinta rendida por la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se agruparon en proporciones iguales con el fin de reconstituir fehacientemente la composición de proteínas del plasma nativo. Se sometió a una muestra del conjunto final a transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal N27 marcado con HRP.

5

## Resultados

En la transferencia de Western resultante se observaron las isoformas principales de GPBP de 77-, 70-, 66-, 58-, 56- y 53-kDa. Existen polipéptidos adicionales no representados en cantidades significativas en la transferencia de Western de la **Figura 12** que se identificaron en el análisis de transferencia de Western realizado durante el proceso de purificación. Estos incluyeron polipéptidos de aproximadamente: 368-kDa [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20 %], 40-, 110-, 120- y 311-kDa [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40 %], y polipéptidos de 91-, 146-, 171- y 300-kDa [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60 %] (datos no mostrados). Finalmente, también se estimó el tamaño de cada uno de los picos cromatográficos del análisis de la filtración en gel, que representaban a las estructuras cuaternarias individuales de GPBP. Específicamente, se descubrieron agregados de GPBP de: 1400- y 920-kDa en el precipitado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 20 %; 310- y 145-kDa en el precipitado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40 %; 920-, 420-, 270- y 125-kDa en el precipitado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60 %; 66-kDa en el precipitado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80 %; y 91-kDa en una forma soluble en la saturación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80 %.

10

## Conclusiones

1. Existen múltiples isoformas de GPBP en la circulación que se ensamblan en una serie de distintas estructuras cuaternarias.
2. La principal isoforma de GPBP en la circulación incluye la de 77-kDa anteriormente reconocida y polipéptidos derivados de P<sub>r</sub> más bajo.

15

## Ejemplo 3

### Aislamiento de GPBP y cuantificación a partir de la orina humana

En el presente documento se demuestra que la GPBP es un componente normal de la orina que puede medirse tanto por procedimientos simples basados en la inmunidad (es decir, ELISA) y aislarse mediante procedimientos químicos e inmunoquímicos. Las pruebas indican que el polipéptido de 91-kDa y los polipéptidos derivados son los productos principales de GPBP en la orina.

### Aislamiento de GPBP mediante cromatografía de inmunoafinidad.

La GPBP se extrajo de orina de un donante control usando Sefarosa 4B cargada con anticuerpos policlonales de ratón específicos para GPBP. El material unido a la columna se eluyó y se analizó mediante transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP (**Fig. 13**). Se detectaron una serie de polipéptidos que mostraban una amplia gama de PM con anticuerpos específicos para GPBP en la muestra purificada por inmunoafinidad. Se descubrió que un polipéptido de 91-kDa, junto con otros polipéptidos derivados de PM más bajo (46- y 50-kDa), [Juan Saus, Fernando Revert y Francisco Revert-Ros "Novel Goodpasture antigen-binding protein isoforms and protein misfolded-mediated disorders" documento PCT/EP04/01074 y documento WO 2004/070025] era el material de GPBP más abundante en la orina humana.

20

Específicamente, se cargaron doscientos cincuenta mililitros de orina de un donante control (anteriormente aclarada mediante centrifugación y neutralizada con Tris), en una columna de 1 ml de Sefarosa 4B conjugada con 200  $\mu\text{g}$  de anticuerpos anti-GPBP policlonales de ratón. La columna se lavó con 30 ml de TBS y el material unido se eluyó con tampón de elución Gentle Immunopure (Pierce). El material eluido se dializó contra TBS y se analizó adicionalmente mediante transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP ( $\alpha\text{GPBPch}$ ) e IgY anti-pollo marcada con HRP (anticuerpo secundario) (**Figura 13**). La especificidad del anticuerpo se confirmó mediante la tinción de una línea control cargada con el mismo material con anticuerpo secundario (Cont). Las barras y los números o las flechas y los números indican la posición y el tamaño (kDa) de los patrones de PM (izquierda) o los polipéptidos de GPBP (derecha), respectivamente.

25

### Medición de la GPBP en la orina mediante ELISA

Dado que la concentración de la proteínas en orina es baja (normalmente menor que 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se intentó un ELISA indirecto con las muestras de siete donantes. Para estos fines, se recubrieron las placas con muestras de orina y se realizó la detección usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP e IgY anti-pollo marcada con HRP (anticuerpo secundario). Se obtuvo de modo similar una curva patrón usando GPBP recombinante humana diluida en orina humana. Se detectó la GPBP en todos los donantes y las concentraciones individuales se determinaron restando el fondo (I.F. medida usando IgY inespecífica) en cada caso (**Fig. 14**). Todos los donantes mostraron niveles detectables de GPBP y el donante 3 mostró una un nivel anormalmente elevado de concentración GPBP en la orina.

30

Específicamente, se recubrieron placas de ELISA con GPBP recombinante diluida en orina y muestras de orina de siete donantes (1-7) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con BSA al 3 % en PBS y se realizó la inmunodetección con anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP ( $\alpha$ GPBPch) e IgY anti-pollo marcada con HRP (anticuerpo secundario). Se usó el reactivo Amplex UltraRed (Invitrogen) para revelar la placa. (**Figura 14**).  
 5 En **A**, se representa una gráfica de dispersión en una escala log-log de las concentraciones indicadas de GPBP frente a la intensidad de fluorescencia (I.F.) expresada en unidades arbitrarias (U.A.). En **B**, se representa la recta de regresión lineal calculada con las concentraciones indicadas y sus valores de I.F. respectivos representados gráficamente en escala lineal, que se usaron para determinar la concentración de GPBP en la muestra en D. En **C**, se representan los datos brutos obtenidos analizando las muestras de donantes con: anticuerpo secundario (Cont),  
 10 IgY de pollo no específico y anticuerpo secundario (IgY), o  $\alpha$ GPBPch y anticuerpo secundario ( $\alpha$ GPBPch). En **D**, la tabla muestra los datos correspondientes transformados usando la curva obtenida en **B**.

Se obtuvieron valores de concentración similares cuando se determinó la GPBP en orina diluida en TBS usando el procedimiento de ELISA de tipo sándwich usado para las muestras de suero/plasma (datos no mostrados).

#### **Aislamiento de la GPBP de la orina mediante precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico.**

Para validar los procedimientos de inmunoafinidad y ELISA y para determinar qué especies de GPBP aumentaron en el donante 3, se intentó una purificación de GPBP a partir de esta orina usando los procedimientos clásicos de purificación química. Estos incluían, precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico doble [carboximetil-celulosa (CM) y dietilaminoetilcelulosa (DEAE)], y análisis de transferencia de Western de los distintos materiales que representaban cada etapa de purificación (**Fig. 15**). El análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP reveló que la mayor parte del material de GPBP se precipitó por las sales y que no se unió ni a la CM ni a la DEAE. Se detectó un polipéptido principal de GPBP de 91-kDa junto con concentraciones significativas del polipéptido de GPBP de 77-kDa y solamente trazas de polipéptidos relacionados con GPBP de 60- y 50-kDa.

Para validar los procedimientos de inmunoafinidad y de ELISA y para determinar qué especies de GPBP aumentaban en el donante 3, se intentó una purificación de GPBP a partir de esta orina usando los procedimientos clásicos de purificación química. Se llevaron cuatrocientos mililitros de orina aclarada por centrifugación a NaCl 0,85 M durante toda la noche a 4 °C, y se sometieron a centrifugación a 10.000 x g durante 30 min a 4 °C. Una muestra del sobrenadante (Sob NaCl 0,85 M) se almacenó a 4 °C para incluirla en el análisis posterior. El sedimento resultante se disolvió en Tris 50 mM a pH 7,5, se dializó contra el mismo tampón, se extrajo con 0,7 ml de resina de CM y el material no unido se extrajo adicionalmente con 0,5 ml de resina DEAE. La resina CM se eluyó con NaCl 1 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (CM, NaCl 1 M), y la resina DEAE se eluyó posteriormente con NaCl 0,35 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (DEAE, NaCl 0,35 M) y NaCl 1 M, Tris 50 mM a pH 7,5 (DEAE, NaCl 1 M). Las cantidades equivalentes de cada muestra, incluyendo el sobrenadante de la extracción con DEAE (Sob CM/DEAE) se analizaron mediante transferencia de Western con anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP e IgY anti-pollo marcada con HRP ( $\alpha$ GPBPch). Los polipéptidos que no reaccionaron específicamente se identificaron tiñendo en un análisis en paralelo usando solamente IgY anti-pollo marcada con HRP (Cont). Las barras y los números o las flechas y los números indican la posición y el tamaño (kDa) de los patrones de PM (izquierda) o de los polipéptidos que reaccionaban específicamente con los anticuerpos anti-GPBP y que se detectaron solamente en el SobCM/DEAE (derecha), respectivamente. (**Fig. 15**). El análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales de pollo específicos para GPBP reveló que la mayor parte del material de GPBP se precipitó por las sales y no se unió ni a la CM ni a la DEAE. Se detectó un polipéptido principal de GPBP de 91-kDa junto con cantidades significativas de un polipéptido de GPBP de 77-kDa y solamente trazas de polipéptidos relacionados con GPBP de 60- y 50-kDa.

#### **Conclusiones**

- 1) Los polipéptidos de GPBP pueden aislarse de la orina bien por cromatografía de afinidad o mediante precipitación desalinizadora seguida de cromatografía de intercambio iónico.
- 2) Los niveles de GPBP en la orina pueden evaluarse bien mediante un ELISA indirecto o un ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos anti-GPBP específicos.
- 3) El polipéptido principal de GPBP que se encuentra en la orina muestra 91-kDa.

#### **Ejemplo 4**

##### **Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales que se dirigen a GPBP.**

Los epítomos del AcMo 14 y del AcMo e26 anteriormente notificados en GPBP se someten a modificaciones post-traduccionales durante la secreción (Revert *et al.* 2008 J. Biol Chem **283**:30246-55). Por consiguiente, estos anticuerpos monoclonales no reaccionaron significativamente con las isoformas de GPBP en la circulación, presentes en el plasma humano. Esto recomienda el uso de procedimientos inmunológicos basados en anticuerpos policlonales para el aislamiento y la estimación de los niveles de la GPBP en la circulación en plasma humano (véase el Ejemplo 1). En el presente documento se notifica la producción y caracterización de nuevos anticuerpos monoclonales específicos para GPBP para la detección inmunológica de GPBP en plasma que son más confiables

que la estrategia basada en anticuerpos policlonales.

**Propagación y crioconservación de hibridomas que producen nuevos anticuerpos monoclonales contra GPBP.** Usando un ELISA indirecto y GPBP recombinante hecha en levaduras, se han obtenido y aislado 28 clones independientes de hibridoma (N1-N28) que produjeron anticuerpos monoclonales anti-GPBP. Los clones se expandieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 20 %, se congelaron en DMSO al 10 % en FBS y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes almacenarlos, se recogieron 10 ml de medio de cultivo de cada clon y se almacenaron a 4 °C con acida sódica al 0,01 % y se usaron para la caracterización adicional de los anticuerpos (véase a continuación).

**Caracterización por transferencia de Western de los nuevos anticuerpos monoclonales usando isoformas nativas y recombinantes de GPBP expresadas en células HEK 293.** Los anticuerpos de cada uno de los 28 hibridomas reaccionaron con la GPBP recombinante (25 ng) producida en *E. coli* (datos no mostrados). Exceptuando el N20 y el N21, el resto de los anticuerpos también reaccionaron con la GPBP recombinante intracelular (**Fig. 16**). Once anticuerpos monoclonales (N4, N5, N7, N11, N12, N13, N14, N22, N25, N27 y N28) reconocieron de un modo similar tanto, la GPBP recombinante intracelular como extracelular. Siete anticuerpos (N1, N6, N17, N18, N19, N24 y N26) se dirigen al GPBP intracelular pero no a la extracelular, mientras que los anticuerpos restantes (N2, N3, N8, N9, N10, N15, N16 y N23) mostraron una reactividad relativamente baja con la GPBP recombinante extracelular (**Fig. 16**).

Usando extractos de proteínas de las células HEK 293, se determinó que 18 anticuerpos monoclonales [N2, N3, N4, N5, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N16, N22, N25, N27 (mostrado) y N28 (no mostrado)] reconocieron las isoformas nativas intracelulares de la GPBP de 77-kDa. Once de estos 18 anticuerpos [N4, N5, N10, N11, N12, N13, N14, N16, N25, N27 (mostrado) pero no N28 (no mostrado)] también se dirigieron a una isoforma de GPBP de 45-kDa anteriormente notificada por existir en la células [Juan Saus, Fernando Revert y Francisco Revert-Ros "Novel Goodpasture antigen-binding protein isoforms and protein misfolded-mediated disorders" documento WO 2004/070025]. Los anticuerpos N4, N7, N11, N14 y N27 también reconocieron un polipéptido adicional relacionado con GPBP de ~ 88-kDa, que puede representar una versión fosforilada del polipéptido canónico de 77-kDa (Raya *et al* 1999 J. Biol Chem. **274**, 12642-12649). El anticuerpo N26 reconoce un polipéptido de 91-kDa que migró conjuntamente con la isoforma de GPBP de 91-kDa recientemente caracterizada (Revert *et al*. 2008 J. Biol. Chem. **283**:30246-55) a la que se dirige el AcMo e26 (**Fig. 17**). Se han estimado las eficacias relativas de los nuevos anticuerpos monoclonales para la detección de las isoformas de GPBP (nativas o recombinantes) y se resumen en la **Tabla 2**.

**Mapeo de los epítomos para los anticuerpos monoclonales N1-N28.** Para estos fines, se produjeron trece construcciones de ADNc distintas que representan mutantes de delección individuales del extremo C terminal de GPBP (**Fig. 18A**). Las construcciones individuales se usaron para la transfección de las células HEK 293 y se analizaron los extractos celulares correspondientes mediante transferencia de Western para evaluar la unión de los anticuerpos individuales. Diecisiete de los 28 nuevos anticuerpos monoclonales reconocieron el mutante de delección 8 pero fallaron en el reconocimiento del mutante 7 (**Tabla 1**); el resto de los anticuerpos bien se dirigían el extremo N terminal, o no se determinó el epítomo debido a la carencia de reactividad en los ensayos de transferencia de Western. Dado que la mayor parte de los anticuerpos reaccionaron con el mutante de delección 8 y fallaron en la reacción con el mutante de delección 7, se intentó adicionalmente el mapeo individual del epítomo usando péptidos sintéticos que representaban la secuencia comprendida entre los extremos C terminales del mutante de delección 7 y 8. Sorprendentemente, la confirmación de la reactividad de los anticuerpos frente a estos 40 restos falló y estos péptidos tampoco pudieron competir con la unión de anticuerpos para GPBP. Los datos sugirieron que existía una región que era altamente inmunogénica que requería la región N terminal de GPBP para el ensamblaje adecuado de los epítomos. Esto se investigó produciendo mutantes de delección interna FLAG-GPBP ( $\Delta 1$ - $\Delta 4$ ), de los que solamente se eliminaron las secuencias individuales de 20 restos indicadas (**Fig. 18B**). Los mutantes de delección  $\Delta 1$ - $\Delta 4$  se obtuvieron mediante procedimientos convencionales usando dos PCR consecutivas y cebadores específicos para introducir las delecciones correspondientes (**Fig. 18B**). De un modo interesante, todos los anticuerpos fallaron en la reacción con los mutantes FLAG-GPBP con la delección interna  $\Delta 2$  y  $\Delta 3$  pero reaccionaron con los mutantes  $\Delta 1$  y  $\Delta 4$  (**Fig. 18C**). Los datos indican que la secuencia representada por los restos del 305-344 de GPBP (GGPDYEEGPNLSINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK, SEC ID N°: 10) conforma un grupo de epítomos altamente inmunogénico. Por consiguiente, se descubrió que el AcMo 14 anteriormente caracterizado reaccionaba con esta región en el motivo FATT (Reverts *al*. 2008 J. Biol. Chem. **283**:30246-55).

**Clasificación de los anticuerpos monoclonales.** Esta se ha realizado teniendo en consideración el mapeo de los epítomos y la reactividad bien con las isoformas nativas o recombinantes intracelulares o extracelulares de GPBP en el análisis de transferencia de Western (**Tabla 1**).

Región	Grupo	Monoclonal N°	Reactividad en la transferencia de Western con GPBP					
			Recombinante (77-kDa)		Nativa (kDa)			
			lisado	medio	91	88	77	45
7-8	1a	4, 11, 14, 27	+++	+++	-	+	+++	++/+
	1b	7, 22 (~AcMo 14)	+++	+++	-	+(7y-(22))	+++	-
	2	5, 10, 12, 13, 16, 25, 28	+++	++/± (10, 15, 16)	-	-	++(5, 10, 12)/+	++
	3	2, 3, 8, 9	++	±	-	-	+/±	±/-
<7	4	15, 23	++	+	-	-	±	-
<4	5	1, 18, 19, 24, 26	++	-	+(26)	-	-	-
?	6	6, 17	+/±	-	-	-	-	±/-
?	7	20, 21	±(b)/-	-	Se dirigen a varios polipéptidos			

**Tabla 1. Clasificación de los 28 anticuerpos monoclonales.** Los números en el campo de la "Región" se refieren a los distintos mutantes de delección usados en el análisis (véase la **Fig. 18**, composición superior). Por ejemplo, la Región 7-8 indica que los anticuerpos reconocen el mutante 8 pero no el mutante 7, y la Región <7 significa que el epítipo está en el extremo N terminal respecto al mutante 7 del extremo C terminal.

5 **Caracterización de los anticuerpos monoclonales N1-N28 mediante análisis de inmunofluorescencia indirecta de las células HeLa que expresan la GPBP recombinante.** Las células HeLa se transfectaron con pcDNA3-FLAG-GPBP, se cultivaron durante 24 horas adicionales, y se fijaron con metanol/acetona (50 %-50 %). Después de la fijación, se bloquearon las células con BSA al 3 % en PBS (solución de bloqueo) y se incubaron con los anticuerpos indicados (medios de cultivo) diluidos 1:2 en solución de bloqueo. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se incubaron con IgG anti-ratón marcada con FITC, se lavaron nuevamente, se montaron y se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de 40 x usando unos tiempos de exposición y de ganancia idénticos. Exceptuando N6, todos los anticuerpos reconocieron la FLAG-GPBP expresada en las células HeLa con distinta reactividad, siendo los anticuerpos más reactivos para estos fines N13, N14, N15, N16, N21, N22 y N26 (véase la **Tabla 2** para las eficacias de detección relativas). Entre los anticuerpos reactivos, todos excepto N28 desvelaron el patrón de distribución reticular característico de GPBP, consecuencia de la localización de GPBP en el retículo endoplasmático (Revert *et al.* 2008 J. Biol. Chem. **283**:30246-55).

10 **Caracterización de los anticuerpos monoclonales N1-N28 mediante análisis de inmunofluorescencia indirecta de células HeLa.** Las células HeLa se sembraron y se cultivaron en cubreobjetos de cristal, se procesaron como se hizo anteriormente, y se analizaron con un microscopio de fluorescencia invertido usando un objetivo de 40 x y una amplificación de la imagen de 1,63. Exceptuando N26, todos los anticuerpos mostraron una distribución en el retículo endoplasmático similar a la que rindió el anticuerpo N27 mostrado a la izquierda de la composición. Algunas células mostraron también refuerzos peri-nucleares y focales típicos del aparato de Golgi (flecha blanca). El patrón desvelado por N26 mezcla la distribución reticular anteriormente descrita con grupos puntuales nucleares y peri-nucleares, y la delineación de la membrana plasmática. Exceptuando N26, todos los anticuerpos desvelaron exclusivamente la distribución del retículo endoplasmático descrita para el polipéptido de GPBP recombinante. El anticuerpo N26, aparte de rendir un patrón reticular, delineó la membrana plasmática y mostró evidencias de acumulaciones nucleares y peri-nucleares puntuales. Los mejores anticuerpos para detectar los materiales endógenos de GPBP en las células HeLa fueron N5, N12, N16, N21, N26 y N27 (véase la **Tabla 2**).

35

**Caracterización de los anticuerpos monoclonales N1-N28 mediante el análisis inmunohistoquímico de tejido de riñón humano incluido en parafina.**

Se usaron los anticuerpos monoclonales individuales para el análisis inmunohistoquímico convencional de muestras de tejidos de riñón humano incluidos en parafina. Todos los anticuerpos reactivos tiñeron principalmente los túbulos contorneados y colectores con una tinción significativa también dentro de los glomérulos en las células mesangiales, podocitos, matriz mesangial y paredes capilares. En este último caso con un patrón lineal en la superficie del endotelio y con una distribución similar a gránulos dentro de la pared capilar. En las paredes capilares, la inmunotinción fue menos frecuente, siendo N5, N6, N7, N8, N10 y N26 los mejores anticuerpos para estos fines. Los anticuerpos que rendían mejor detección de GPBP usando técnicas inmunohistoquímicas fueron N5, N6, N7, N8, N9, N10, N12, N26 y N27 (véase la **Tabla 2**).

**Evaluación de la capacidad de los anticuerpos monoclonales N1-N28 para capturar la GPBP en un ELISA de tipo sándwich.**

Con el fin de seleccionar anticuerpos individuales para los ensayos de ELISA de tipo sándwich, se usó una placa de ELISA anteriormente recubierta con anticuerpo anti-ratón para unir anticuerpos monoclonales de los medios de cultivo y para su capacidad para capturar las GPBP recombinantes y nativas evaluadas. Las placas de ELISA recubiertas con anti-ratón se cargaron con el medio de cultivo de los hibridomas de los anticuerpos indicados o con el medio de cultivo de un hibridoma anti-GAPDH (cont). Posteriormente, la placa se bloqueó con BSA al 3 % en PBS y se incubó con la GPBP recombinante diluida en FBS a las concentraciones indicadas, o con FBS (blanco). La GPBP unida se detectó con anti-GPBP policlonal de pollo e IgY anti-pollo marcada con HRP. El revelado se realizó con un reactivo fluorescente (Amplex).

a) Ensayos de captura para la GPBP recombinante humana. Todos los anticuerpos capturaron eficazmente la FLAG-GPBP, siendo N5, N6, N8, N10, N11, N12, N15, N16, N20, N23, N26, N27 y N28, los que mostraban la mejor eficacia de captura de FLAG-GPBP del FBS que contenía 10 ng/ml de FLAG-GPBP (**Tabla 2**).

b) Ensayos de captura para la GPBP humana de la circulación (plasma). Las placas de ELISA recubiertas con anti-ratón se cargaron y se bloquearon tal como se indica anteriormente y se incubaron adicionalmente con un plasma humano de un paciente de Goodpasture (Nº de registro M049) diluido 1:10 en FBS o solamente con FBS (blanco). Nueve de los 28 anticuerpos (N3, N5, N9, N10, N11, N12, N13, N26 y N27) capturaron eficazmente la GPBP del plasma humano (**Tabla 2**).

**Conclusión**

Se proporcionan nuevos anticuerpos monoclonales para la detección de la GPBP nativa mediante ELISA, inmunofluorescencia y procedimientos inmunohistoquímicos.

	Transferencia de Western										IF	IHC	Anticuerpo de captura (ELISA de tipo sandwich)	
	recGPBP		natGPBP (293)					IF		rec			nat	
	intracel	extracel	45	77	88	91	rec	nat	rec	nat (suero)				
N1	++	-	-	-	-	-	-	+	+/-	++	+	+/-	++	-
N2	+++	+	-	+/-	-	-	-	+++	+/-	+/-	+++	+/-	+/-	-
N3	+++	+	-	+	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	++	+
N4	++++	+++	+	+++	+	-	-	++	+/-	++	++	+/-	+	-
N5	++++	+++	++	++	-	-	-	++	++	++	++	++	+++	++
N6	+	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	++	+/-	+/-	+++	-
N7	++++	+++	-	+++	+	-	-	++	+/-	++	++	+/-	+	-
N8	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	++	+/-
N9	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	++	+
N10	+++	+	++	+++	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	++	+
N11	++++	+++	++	+++	++	-	-	++	+/-	++	++	+/-	+++	++
N12	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	++	++	++	++	+++	+++
N13	+++	+++	+	+	-	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	++	++
N14	++++	+++	+	+++	++	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	++	-
N15	+++	++	-	+/-	-	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	+++	-
N16	++++	++	+	++	-	-	-	+++	++	++	+++	++	+++	-
N17	+	-	-	-	-	-	-	+	+/-	++	+	+/-	+/-	-
N18	++	-	-	-	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	+/-	+/-
N19	+++	-	-	-	-	-	-	+	+/-	++	+	+/-	+/-	-
N20	-	-	-	<i>frotis</i>	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	++	+/-
N21	-	-	-	<i>frotis</i>	-	-	-	+++	++	++	+++	++	+	-
N22	++++	+++	-	+++	-	-	-	+++	+/-	++	+++	+/-	+	-
N23	++++	+	-	-	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	++	-
N24	++	-	-	<i>frotis</i>	-	-	-	++	+	++	++	+	+	+/-
N25	+++	++	++	+	-	-	-	++	+/-	++	++	+/-	+	-
N26	++	-	-	-	-	++	-	+++	++	+++	+++	++	++	++
N27	++++	+++	++	+++	++	-	-	++	++	++	++	++	+++	++
N28	++++	+++	++	+	-	-	-	+	+/-	+	+	+/-	++	+/-

Tabla 2. Sumario de la eficacia relativa de los 28 anticuerpos monoclonales como anticuerpos de detección en transferencia de Western, inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHC) y como anticuerpos de captura en un ELISA de tipo sandwich.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> saus, Juan	
5	<120> Proteína de unión al antígeno de Goodpasture y su detección	
	<130> 150-270	
	<140>	
10	<141> 20-07-2009	
	<150> 61/082.741	
	<151> 22-07-2008	
15	<150> 61/085.211	
	<151> 31-07-2008	
	<160> 33	
20	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 2124	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	acggcggcgg cggctgacgg ctggaagggg aggcttcctt caccgctcgt cctccttcct	60
	cgctcccgtc ggtgtcaggg gcggcggcgg cgcggcgggc ggacttcgtc cctcctcctg	120
	ctcccccca caccggagcg ggcactcttc gcttcgccat cccccgacc ttcacccccga	180
	ggactgggcg cctcctccgg cgcagctgag ggagcggggg ccggtctcct gctcggttgt	240
	cgagcctcca tgtcggataa tcagagctgg aactcgtcgg gctcggagga ggatccagag	300
	acggagtctg ggccgcctgt ggagcgtcgc ggggtcctca gtaagtggac aaactacatt	360
	catgggtggc aggatcgttg ggtagttttg aaaaataatg ctctgagtta ctacaaatct	420
	gaagatgaaa cagagtatgg ctgcagagga tccatctgtc ttagcaaggc tgtcatcaca	480
	cctcacgatt ttgatgaatg tcgatttgat attagtgtaa atgatagtgt ttggtatctt	540
	cgtgctcagg atccagatca tagacagcaa tggatagatg ccattgaaca gcacaagact	600
	gaatctggat atggatctga atccagcttg cgtcgacatg gctcaatggt gtccttggtg	660
	tctggagcaa gtggctactc tgcaacatcc acctcttcat tcaagaaagg ccacagtta	720
	cgtgagaagt tggctgaaat ggaaacattt agagacatct tatgtagaca agttgacacg	780
	ctacagaagt actttgatgc ctgtgctgat gctgtctcta aggatgaact tcaaagggat	840
	aaagtggtag aagatgatga agatgacttt cctacaacgc gttctgatgg tgacttcttg	900
	catagtacca acggcaataa agaaaagtta tttccacatg tgacaccaaa aggaattaat	960
	ggtatagact ttaaagggga agcgataact tttaaagcaa ctactgctgg aatccttgca	1020
	acactttctc attgtattga actaatgggt aaacgtgagg acagctggca gaagagactg	1080
	gataaggaaa ctgagaagaa aagaagaaca gaggaagcat ataaaaatgc aatgacagaa	1140
	cttaagaaaa aatcccactt tggaggacca gattatgaag aaggccctaa cagtctgatt	1200

aatgaagaag agttctttga tgctgttgaa gctgctcttg acagaāaaga taaaatagaa 1260  
 gaacagtcac agagtgaaaa ggtgagatta cattggccta catccttgcc ctctggagat 1320  
 gccttttctt ctgtggggac acatagattt gtccaaaagc cctatagtcg ctcttctcc 1380  
 atgtcttcca ttgatctagt cagtgcctct gatgatgttc acagattcag ctcccaggtt 1440  
 gaagagatgg tgcagaacca catgacttac tcattacagg atgtaggcgg agatgccaat 1500  
 tggcagttgg ttgtagaaga aggagaaatg aaggtataca gaagagaagt agaagaaaat 1560  
 gggattgttc tggatccttt aaaagctacc catgcagtta aaggcgtcac aggacatgaa 1620  
 gtctgcaatt atttctggaa tgttgacgtt cgcaatgact gggaaacaac tatagaaaac 1680  
 tttcatgtgg tggaaacatt agctgataat gcaatcatca tttatcaaac acacaagagg 1740  
 gtgtggcctg cttctcagcg agacgtatta tatctttctg tcattcgaaa gataccagcc 1800  
 ttgactgaaa atgaccctga aacttgata gtttgaatt tttctgtgga tcatgacagt 1860  
 gctcctctaa acaaccgatg tgtccgtgcc aaaataaatg ttgctatgat ttgtcaaacc 1920  
 ttgtaagcc caccagaggg aaaccaggaa attagcaggg acaacattct atgcaagatt 1980  
 acatatgtag ctaatgtgaa ccctggagga tgggcaccag cctcagtggt aagggcagtg 2040  
 gcaaagcgag agtatcctaa atttctaaaa cgttttactt cttacgtcca agaaaaaact 2100  
 gcaggaaagc ctattttggt ctag 2124

<210> 2  
 <211> 707  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Thr Ala Ala Ala Ala Asp Gly Trp Lys Gly Arg Leu Pro Ser Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Val Leu Leu Pro Arg Ser Ala Arg Cys Gln Ala Arg Arg Arg Arg Gly  
 20 25 30  
 Gly Arg Thr Ser Ser Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr Pro Glu Arg Ala  
 35 40 45  
 Leu Phe Ala Ser Pro Ser Pro Asp Pro Ser Pro Arg Gly Leu Gly Ala  
 50 55 60  
 Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gly Ala Gly Ala Gly Leu Leu Leu Gly Cys  
 65 70 75 80  
 Arg Ala Ser Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val  
 100 105 110

10

Leu Ser Lys Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val  
 115 120 125  
 Val Leu Lys Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr  
 130 135 140  
 Glu Tyr Gly Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Pro His Asp Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser  
 165 170 175  
 Val Trp Tyr Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile  
 180 185 190  
 Asp Ala Ile Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser  
 195 200 205  
 Ser Leu Arg Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser  
 210 215 220  
 Gly Tyr Ser Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Arg Glu Lys Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg  
 245 250 255  
 Gln Val Asp Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val  
 260 265 270  
 Ser Lys Asp Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp  
 275 280 285  
 Asp Phe Pro Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn  
 290 295 300  
 Gly Asn Lys Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Ile Asp Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala  
 325 330 335  
 Gly Ile Leu Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg  
 340 345 350  
 Glu Asp Ser Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg  
 355 360 365  
 Arg Thr Glu Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys  
 370 375 380

Ser His Phe Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile  
 385 390 395 400

Asn Glu Glu Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln  
 405 410 415

Asp Lys Ile Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp  
 420 425 430

Pro Thr Ser Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His  
 435 440 445

Arg Phe Val Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile  
 450 455 460

Asp Leu Val Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val  
 465 470 475 480

Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly  
 485 490 495

Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val  
 500 505 510

Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys  
 515 520 525

Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr  
 530 535 540

Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn  
 545 550 555 560

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

Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu  
 580 585 590

Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr  
 595 600 605

Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn  
 610 615 620

Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr  
 625 630 635 640

Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile  
 645 650 655

Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala  
660 665 670

Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe  
675 680 685

Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro  
690 695 700

Ile Leu Phe  
705

5

<210> 3  
<211> 1875  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 3

ES 2 535 258 T3

atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct 60  
 gggccgcctg tggagcgtg cggggtctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg 120  
 caggatcgtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa 180  
 acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat 240  
 tttgatgaat gtcgatttga tattagtgtg aatgatagtg tttggtatct tcgtgctcag 300  
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360  
 tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtccctggg gtctggagca 420  
 agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480  
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540  
 tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaagggg taaagtggta 600  
 gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc 660  
 aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatatagac 720  
 tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780  
 cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840  
 actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900  
 aatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960  
 gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020  
 cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct 1080  
 tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag ccctatagtc gctcttcctc catgtcttcc 1140  
 attgatctag tcagtgcctc tgatgatgtt cacagattca gctcccaggg tgaagagatg 1200  
 gtgcagaacc acatgactta ctcatcag gatgtaggcg gagatgcca ttggcagttg 1260  
 gttgtagaag aaggagaaat gaaggtatac agaagagaag tagaagaaaa tgggattgtt 1320  
 ctggatcctt taaaagctac ccatgcagtt aaaggcgtca caggacatga agtctgcaat 1380  
  
 tatttctgga atgttgacgt tcgcaatgac tgggaaacaa ctataāgaaa ctttcatgtg 1440  
 gtggaaacat tagctgataa tgcaatcatc atttatcaaa cacacaagag ggtgtggcct 1500  
 gcttctcagc gagacgtatt atatctttct gtcattcgaa agataccagc cttgactgaa 1560  
 aatgaccctg aaacttgat agtttgaat ttttctgtgg atcatgacag tgctcctcta 1620  
 aacaaccgat gtgtccgtgc caaataaat gttgctatga tttgtcaaac cttggaagc 1680  
 ccaccagagg gaaaccagga aattagcagg gacaacattc tatgcaagat tacatatgta 1740  
 gctaagtga accctggagg atgggcacca gcctcagtgt taagggcagt ggcaaagcga 1800  
 gagtatccta aatttctaaa acgttttact tcttacgtcc aagaaaaaac tgcaggaaag 1860  
 cctattttgt tctag 1875

<210> 4  
 <211> 624  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 535 258 T3

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro  
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys  
 20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys  
 35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly  
 50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp  
 65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr  
 85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile  
 100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg  
 115 120 125

Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys  
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp  
 165 170 175

ES 2 535 258 T3

Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp  
 180 185 190  
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro  
 195 200 205  
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys  
 210 215 220  
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu  
 245 250 255  
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser  
 260 265 270  
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu  
 275 280 285  
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe  
 290 295 300  
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
 325 330 335  
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser  
 340 345 350  
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val  
 355 360 365  
 Gln Lys Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val  
 370 375 380  
 Ser Ala Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln Val Glu Glu Met  
 385 390 395 400  
 Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln Asp Val Gly Gly Asp Ala  
 405 410 415  
 Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu Met Lys Val Tyr Arg Arg  
 420 425 430  
 Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp Pro Leu Lys Ala Thr His  
 435 440 445

ES 2 535 258 T3

Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val Cys Asn Tyr Phe Trp Asn  
 450 455 460

Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr Ile Glu Asn Phe His Val  
 465 470 475 480

Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile Ile Tyr Gln Thr His Lys  
 485 490 495

Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val Leu Tyr Leu Ser Val Ile  
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp Pro Glu Thr Trp Ile Val  
 515 520 525

Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala Pro Leu Asn Asn Arg Cys  
 530 535 540

Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile Cys Gln Thr Leu Val Ser  
 545 550 555 560

Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg Asp Asn Ile Leu Cys Lys  
 565 570 575

Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly Gly Trp Ala Pro Ala Ser  
 580 585 590

Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr Pro Lys Phe Leu Lys Arg  
 595 600 605

Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala Gly Lys Pro Ile Leu Phe  
 610 615 620

5 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

Glu Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu  
 1 5

10 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

Asp Asp Val His Arg  
 1 5

20

ES 2 535 258 T3

<210> 7  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5  
<400> 7

Asp Gly Trp Lys Gly Arg Leu Pro Ser Pro Leu Val Leu Leu Pro Arg  
1 5 10 15  
Ser Ala Arg Cys  
20

10  
<210> 8  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15  
<400> 8

Leu Ile Asn Glu Glu Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp  
1 5 10 15  
Arg Gln

20  
<210> 9  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

25  
<400> 9

Pro Tyr Ser Arg Ser Ser Ser Met Ser Ser Ile Asp Leu Val Ser Ala  
1 5 10 15  
Ser Asp Asp Val His Arg Phe Ser Ser Gln  
20 25

30  
<210> 10  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile  
20 25 30  
Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys  
35 40

35  
<210> 11  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 535 258 T3

<220>  
 <223> Sintética; secuencia diana del ADNc de pSi-GPBP/GPBP\_Delta\_26-2

5 <400> 11  
 acagagtatg gctgcagag 19

<210> 12  
 <211> 19  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética; secuencia diana del ADNc de pSi-GPBP/GPBP\_Delta\_26-3

15 <400> 12  
 gtactttgat gcctgtgct 19

<210> 13  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética; secuencia diana del ADNc de pSi-GPBP-1

25 <400> 13  
 gccctatagt cgctctcc 19

<210> 14  
 <211> 411  
 30 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 14

**gcaggaagat ggcggcggta gcggagggtg gagtggacgc gggactcagc ggccggattt 60**  
**tctcttccct tcttttccct tttccttccc tatttgaaat tggcatcgag ggggctaagt 120**  
**tcgggtggca gcgccgggcg caacgcaggg gtcacggcga cggcggcggc ggctgacggc 180**  
**tggaagggta ggcttccttc accgctcgtc ctctctctc gctccgctcg gtgtcaggcg 240**  
**cggcggcggc gcggcgggcg gacttcgtcc ctctctctgc tccccccac accggagcgg 300**  
**gcactcttcg cttcgccatc ccccgacct tcaccccgag gactgggcgc ctctccggc 360**  
**gcagctgagg gagcgggggc cggctctctg ctcggttgtc gagcctccat g 411**

<210> 15  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

40

ES 2 535 258 T3

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

5

<210> 16  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 16

ES 2 535 258 T3

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

ES 2 535 258 T3

130		135		140											
Glu 145	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu 150	Lys	Ser	Phe	Ala	Leu 155	Met	Val	Val	Asp	Glu 160
Gln	Gln	Arg	Leu	Thr 165	Ala	Gln	Leu	Thr	Leu 170	Gln	Arg	Gln	Lys	Ile 175	Gln
Glu	Leu	Thr	Thr 180	Asn	Ala	Lys	Glu	Thr 185	His	Thr	Lys	Leu	Ala 190	Leu	Ala
Glu	Ala	Arg 195	Val	Gln	Glu	Glu	Glu 200	Gln	Lys	Ala	Thr	Arg 205	Leu	Glu	Lys
Glu 210	Leu	Gln	Thr	Gln	Thr	Thr 215	Lys	Phe	His	Gln	Asp 220	Gln	Asp	Thr	Ile
Met 225	Ala	Lys	Leu	Thr	Asn 230	Glu	Asp	Ser	Gln	Asn 235	Arg	Gln	Leu	Gln	Gln 240
Lys	Leu	Ala	Ala	Leu 245	Ser	Arg	Gln	Ile	Asp 250	Glu	Leu	Glu	Glu	Thr 255	Asn
Arg	Ser	Leu	Arg 260	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu 265							

<210> 17  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 17

5

ES 2 535 258 T3

Met Arg Ser Arg Gly Ser Asp Thr Glu Gly Ser Ala Gln Lys Lys Phe  
 1 5 10 15

Pro Arg His Thr Lys Gly His Ser Phe Gln Gly Pro Lys Asn Met Lys  
 20 25 30

His Arg Gln Gln Asp Lys Asp Ser Pro Ser Glu Ser Asp Val Ile Leu  
 35 40 45

Pro Cys Pro Lys Ala Glu Lys Pro His Ser Gly Asn Gly His Gln Ala  
 50 55 60

Glu Asp Leu Ser Arg Asp Asp Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ile Leu Glu  
 65 70 75 80

Gly Glu Leu Gln Ala Arg Asp Glu Val Ile Gly Ile Leu Lys Ala Glu  
 85 90 95

Lys Met Asp Leu Ala Leu Leu Glu Ala Gln Tyr Gly Phe Val Thr Pro  
 100 105 110

ES 2 535 258 T3

Lys Lys Val Leu Glu Ala Leu Gln Arg Asp Ala Phe Gln Ala Lys Ser  
 115 120 125  
 Thr Pro Trp Gln Glu Asp Ile Tyr Glu Lys Pro Met Asn Glu Leu Asp  
 130 135 140  
 Lys Val Val Glu Lys His Lys Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Leu Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Val Ala Glu Lys Ser Arg Arg Gln Thr Ile Leu Glu Leu Glu  
 165 170 175  
 Glu Glu Lys Arg Lys His Lys Glu Tyr Met Glu Lys Ser Asp Glu Phe  
 180 185 190  
 Ile Cys Leu Leu Glu Gln Glu Cys Glu Arg Leu Lys Lys Leu Ile Asp  
 195 200 205  
 Gln Glu Ile Lys Ser Gln Glu Glu Lys Glu Gln Glu Lys Glu Lys Arg  
 210 215 220  
 Val Thr Thr Leu Lys Glu Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Phe Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Met Val Val Asp Glu Gln Gln Arg Leu Thr Ala Gln Leu Thr Leu Gln  
 245 250 255  
 Arg Gln Lys Ile Gln Glu Leu Thr Thr Asn Ala Lys Glu Thr His Thr  
 260 265 270  
 Lys Leu Ala Leu Ala Glu Ala Arg Val Gln Glu Glu Glu Gln Lys Ala  
 275 280 285  
 Thr Arg Leu Glu Lys Glu Leu Gln Thr Gln Thr Thr Lys Phe His Gln  
 290 295 300  
 Asp Gln Asp Thr Ile Met Ala Lys Leu Thr Asn Glu Asp Ser Gln Asn  
 305 310 315 320  
 Arg Gln Leu Gln Gln Lys Leu Ala Ala Leu Ser Arg Gln Ile Asp Glu  
 325 330 335  
 Leu Glu Glu Thr Asn Arg Ser Leu Arg Lys Ala Glu Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350  
 Asp Ile Lys Glu Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Gly Asn Ala Gly Ile  
 355 360 365  
 Met Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Lys Arg Val Leu Asp Met Glu Gly  
 370 375 380

Lys Asp Glu Glu Leu Ile Lys Met Glu Glu Gln Cys Arg Asp Leu Asn  
 385 390 395 400  
 Lys Arg Leu Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Lys Asp Phe Lys Leu Glu  
 405 410 415  
 Val Glu Lys Leu Ser Lys Arg Ile Met Ala Leu Glu Lys Leu Glu Asp  
 420 425 430  
 Ala Phe Asn Lys Ser Lys Gln Glu Cys Tyr Ser Leu Lys Cys Asn Leu  
 435 440 445  
 Glu Lys Glu Arg Met Thr Thr Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Glu Ser  
 450 455 460  
 Leu Lys Val Arg Ile Lys Glu Leu Glu Ala Ile Glu Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Lys Thr Glu Phe Thr Leu Lys Glu Asp Leu Thr Lys Leu Lys Thr Leu  
 485 490 495  
 Thr Val Met Phe Val Asp Glu Arg Lys Thr Met Ser Glu Lys Leu Lys  
 500 505 510  
 Lys Thr Glu Asp Lys Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Leu Gln Val Glu  
 515 520 525  
 Gln Asn Lys Val Thr Thr Val Thr Glu Lys Leu Ile Glu Glu Thr Lys  
 530 535 540  
 Arg Ala Leu Lys Ser Lys Thr Asp Val Glu Glu Lys Met Tyr Ser Val  
 545 550 555 560  
 Thr Lys Glu Arg Asp Asp Leu Lys Asn Lys Leu Lys Ala Glu Glu Glu  
 565 570 575  
 Lys Gly Asn Asp Leu Leu Ser Arg Val Asn Met Leu Lys Asn Arg Leu  
 580 585 590  
 Gln Ser Leu Glu Ala Ile Glu Lys Asp Phe Leu Lys Asn Lys Leu Asn  
 595 600 605  
 Gln Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Ala Leu His Gln Glu Asn Asn Lys  
 610 615 620  
 Ile Lys Glu Leu Ser Gln Glu Val Glu Arg Leu Lys Leu Lys Leu Lys  
 625 630 635 640  
 Asp Met Lys Ala Ile Glu Asp Asp Leu Met Lys Thr Glu Asp Glu Tyr  
 645 650 655

ES 2 535 258 T3

Glu Thr Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Glu Arg Asp Lys Ala Gln Phe  
 660 665 670  
 Leu Ser Lys Glu Leu Glu His Val Lys Met Glu Leu Ala Lys Tyr Lys  
 675 680 685  
 Leu Ala Glu Lys Thr Glu Thr Ser His Glu Gln Trp Leu Phe Lys Arg  
 690 695 700  
 Leu Gln Glu Glu Glu Ala Lys Ser Gly His Leu Ser Arg Glu Val Asp  
 705 710 715 720  
 Ala Leu Lys Glu Lys Ile His Glu Tyr Met Ala Thr Glu Asp Leu Ile  
 725 730 735  
 Cys His Leu Gln Gly Asp His Ser Val Leu Gln Lys Lys Thr Lys Ser  
 740 745 750  
 Thr Arg Lys Gln Glu Gln Arg Phe Arg Lys Arg Asp  
 755 760

<210> 18  
 <211> 1135  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 18

5

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

10

ES 2 535 258 T3

Thr Pro Trp Gln Glu Asp Ile Tyr Glu Lys Pro Met Asn Glu Leu Asp  
 130 135 140

Lys Val Val Glu Lys His Lys Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Leu Gly Gln  
 145 150 155

Leu Leu Val Ala Glu Lys Ser Arg Arg Gln Thr Ile Leu Glu Leu Glu  
 165 170 175

Glu Glu Lys Arg Lys His Lys Glu Tyr Met Glu Lys Ser Asp Glu Phe  
 180 185 190

Ile Cys Leu Leu Glu Gln Glu Cys Glu Arg Leu Lys Lys Leu Ile Asp  
 195 200 205

Gln Glu Ile Lys Ser Gln Glu Glu Lys Glu Gln Glu Lys Glu Lys Arg  
 210 215 220

Val Thr Thr Leu Lys Glu Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Phe Ala Leu  
 225 230 235 240

Met Val Val Asp Glu Gln Gln Arg Leu Thr Ala Gln Leu Thr Leu Gln  
 245 250 255

Arg Gln Lys Ile Gln Glu Leu Thr Thr Asn Ala Lys Glu Thr His Thr  
 260 265 270

Lys Leu Ala Leu Ala Glu Ala Arg Val Gln Glu Glu Gln Lys Ala  
 275 280 285

Thr Arg Leu Glu Lys Glu Leu Gln Thr Gln Thr Thr Lys Phe His Gln  
 290 295 300

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

Arg Gln Leu Gln Gln Lys Leu Ala Ala Leu Ser Arg Gln Ile Asp Glu  
 325 330 335

Leu Glu Glu Thr Asn Arg Ser Leu Arg Lys Ala Glu Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350

Asp Ile Lys Glu Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Gly Asn Ala Gly Ile  
 355 360 365

Met Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Lys Arg Val Leu Asp Met Glu Gly  
 370 375 380

Lys Asp Glu Glu Leu Ile Lys Met Glu Glu Gln Cys Arg Asp Leu Asn  
 385 390 395 400

Lys Arg Leu Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Lys Asp Phe Lys Leu Glu  
 405 410 415  
 Val Glu Lys Leu Ser Lys Arg Ile Met Ala Leu Glu Lys Leu Glu Asp  
 420 425 430  
 Ala Phe Asn Lys Ser Lys Gln Glu Cys Tyr Ser Leu Lys Cys Asn Leu  
 435 440 445  
 Glu Lys Glu Arg Met Thr Thr Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Glu Ser  
 450 455 460  
 Leu Lys Val Arg Ile Lys Glu Leu Glu Ala Ile Glu Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475  
 Lys Thr Glu Phe Thr Leu Lys Glu Asp Leu Thr Lys Leu Lys Thr Leu  
 485 490 495  
 Thr Val Met Phe Val Asp Glu Arg Lys Thr Met Ser Glu Lys Leu Lys  
 500 505 510  
 Lys Thr Glu Asp Lys Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Leu Gln Val Glu  
 515 520 525  
 Gln Asn Lys Val Thr Thr Val Thr Glu Lys Leu Ile Glu Glu Thr Lys  
 530 535 540  
 Arg Ala Leu Lys Ser Lys Thr Asp Val Glu Glu Lys Met Tyr Ser Val  
 545 550 555 560  
 Thr Lys Glu Arg Asp Asp Leu Lys Asn Lys Leu Lys Ala Glu Glu Glu  
 565 570 575  
 Lys Gly Asn Asp Leu Leu Ser Arg Val Asn Met Leu Lys Asn Arg Leu  
 580 585 590  
 Gln Ser Leu Glu Ala Ile Glu Lys Asp Phe Leu Lys Asn Lys Leu Asn  
 595 600 605  
 Gln Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Ala Leu His Gln Glu Asn Asn Lys  
 610 615 620  
 Ile Lys Glu Leu Ser Gln Glu Val Glu Arg Leu Lys Leu Lys Leu Lys  
 625 630 635 640  
 Asp Met Lys Ala Ile Glu Asp Asp Leu Met Lys Thr Glu Asp Glu Tyr  
 645 650 655  
 Glu Thr Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Glu Arg Asp Lys Ala Gln Phe  
 660 665 670

Leu Ser Lys Glu Leu Glu His Val Lys Met Glu Leu Ala Lys Tyr Lys  
 675 680 685

Leu Ala Glu Lys Thr Glu Thr Ser His Glu Gln Trp Leu Phe Lys Arg  
 690 695 700

Leu Gln Glu Glu Glu Ala Lys Ser Gly His Leu Ser Arg Glu Val Asp  
 705 710 715 720

Ala Leu Lys Glu Lys Ile His Glu Tyr Met Ala Thr Glu Asp Leu Ile  
 725 730 735

Cys His Leu Gln Gly Asp His Ser Val Leu Gln Lys Lys Leu Asn Gln  
 740 745 750

Gln Glu Asn Arg Asn Arg Asp Leu Gly Arg Glu Ile Glu Asn Leu Thr  
 755 760 765

Lys Glu Leu Glu Arg Tyr Arg His Phe Ser Lys Ser Leu Arg Pro Ser  
 770 775 780

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

Gln Thr Glu Ala Val Asp Asn Glu Pro Pro Asp Tyr Lys Ser Leu Ile  
 805 810 815

Pro Leu Glu Arg Ala Val Ile Asn Gly Gln Leu Tyr Glu Glu Ser Glu  
 820 825 830

Asn Gln Asp Glu Asp Pro Asn Asp Glu Gly Ser Val Leu Ser Phe Lys  
 835 840 845

Cys Ser Gln Ser Thr Pro Cys Pro Val Asn Arg Lys Leu Trp Ile Pro  
 850 855 860

Trp Met Lys Ser Lys Glu Gly His Leu Gln Asn Gly Lys Met Gln Thr  
 865 870 875 880

Lys Pro Asn Ala Asn Phe Val Gln Pro Gly Asp Leu Val Leu Ser His  
 885 890 895

Thr Pro Gly Gln Pro Leu His Ile Lys Val Thr Pro Asp His Val Gln  
 900 905 910

Asn Thr Ala Thr Leu Glu Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Ser Pro His  
 915 920 925

Ser Tyr Thr Ser Thr Ala Val Ile Pro Asn Cys Gly Thr Pro Lys Gln  
 930 935 940

Arg Ile Thr Ile Leu Gln Asn Ala Ser Ile Thr Pro Val Lys Ser Lys  
 945 950 955 960

Thr Ser Thr Glu Asp Leu Met Asn Leu Glu Gln Gly Met Ser Pro Ile  
 965 970 975

Thr Met Ala Thr Phe Ala Arg Ala Gln Thr Pro Glu Ser Cys Gly Ser  
 980 985 990

Leu Thr Pro Glu Arg Thr Met Ser Pro Ile Gln Val Leu Ala Val Thr  
 995 1000 1005

Gly Ser Ala Ser Ser Pro Glu Gln Gly Arg Ser Pro Glu Pro Thr  
 1010 1015 1020

Glu Ile Ser Ala Lys His Ala Ile Phe Arg Val Ser Pro Asp Arg  
 1025 1030 1035

Gln Ser Ser Trp Gln Phe Gln Arg Ser Asn Ser Asn Ser Ser Ser  
 1040 1045 1050

Val Ile Thr Thr Glu Asp Asn Lys Ile His Ile His Leu Gly Ser  
 1055 1060 1065

Pro Tyr Met Gln Ala Val Ala Ser Pro Val Arg Pro Ala Ser Pro  
 1070 1075 1080

Ser Ala Pro Leu Gln Asp Asn Arg Thr Gln Gly Leu Ile Asn Gly  
 1085 1090 1095

Ala Leu Asn Lys Thr Thr Asn Lys Val Thr Ser Ser Ile Thr Ile  
 1100 1105 1110

Thr Pro Thr Ala Thr Pro Leu Pro Arg Gln Ser Gln Ile Thr Val  
 1115 1120 1125

Glu Pro Leu Leu Leu Pro His  
 1130 1135

<210> 19  
 <211> 1133  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

Met Arg Ser Arg Gly Ser Asp Thr Glu Gly Ser Ala Gln Lys Lys Phe  
 1 5 10 15

Pro Arg His Thr Lys Gly His Ser Phe Gln Gly Pro Lys Asn Met Lys  
 20 25 30

10

ES 2 535 258 T3

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

ES 2 535 258 T3

Asp Gln Asp Thr Ile Met Ala Lys Leu Thr Asn Glu Asp Ser Gln Asn  
 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400  
 Arg Gln Leu Gln Gln Lys Leu Ala Ala Leu Ser Arg Gln Ile Asp Glu  
 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420  
 Leu Glu Glu Thr Asn Arg Ser Leu Arg Lys Ala Glu Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440  
 Asp Ile Lys Glu Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Gly Asn Ala Gly Ile  
 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460  
 Met Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Lys Arg Val Leu Asp Met Glu Gly  
 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480  
 Lys Asp Glu Glu Leu Ile Lys Met Glu Glu Gln Cys Arg Asp Leu Asn  
 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500  
 Lys Arg Leu Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Lys Asp Phe Lys Leu Glu  
 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520  
 Val Glu Lys Leu Ser Lys Arg Ile Met Ala Leu Glu Lys Leu Glu Asp  
 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540  
 Ala Phe Asn Lys Ser Lys Gln Glu Cys Tyr Ser Leu Lys Cys Asn Leu  
 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560  
 Glu Lys Glu Arg Met Thr Thr Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Glu Ser  
 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580  
 Leu Lys Val Arg Ile Lys Glu Leu Glu Ala Ile Glu Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600  
 Lys Thr Glu Phe Thr Leu Lys Glu Asp Leu Thr Lys Leu Lys Thr Leu  
 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620  
 Thr Val Met Phe Val Asp Glu Arg Lys Thr Met Ser Glu Lys Leu Lys  
 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640  
 Lys Thr Glu Asp Lys Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Leu Gln Val Glu  
 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660  
 Gln Asn Lys Val Thr Thr Val Thr Glu Lys Leu Ile Glu Glu Thr Lys  
 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680  
 Arg Ala Leu Lys Ser Lys Thr Asp Val Glu Glu Lys Met Tyr Ser Val  
 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700  
 Thr Lys Glu Arg Asp Asp Leu Lys Asn Lys Leu Lys Ala Glu Glu Glu  
 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720

ES 2 535 258 T3

Lys Gly Asn Asp Leu Leu Ser Arg Val Asn Met Leu Lys Asn Arg Leu  
 580 585 590

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

Gln Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Ala Leu His Gln Glu Asn Asn Lys  
 610 615 620

Ile Lys Glu Leu Ser Gln Glu Val Glu Arg Leu Lys Leu Lys Leu Lys  
 625 630 635 640

Asp Met Lys Ala Ile Glu Asp Asp Leu Met Lys Thr Glu Asp Glu Tyr  
 645 650 655

Glu Thr Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Glu Arg Asp Lys Ala Gln Phe  
 660 665 670

Leu Ser Lys Glu Leu Glu His Val Lys Met Glu Leu Ala Lys Tyr Lys  
 675 680 685

Leu Ala Glu Lys Thr Glu Thr Ser His Glu Gln Trp Leu Phe Lys Arg  
 690 695 700

Leu Gln Glu Glu Glu Ala Lys Ser Gly His Leu Ser Arg Glu Val Asp  
 705 710 715 720

Ala Leu Lys Glu Lys Ile His Glu Tyr Met Ala Thr Glu Asp Leu Ile  
 725 730 735

Cys His Leu Gln Gly Asp His Ser Val Leu Gln Lys Lys Leu Asn Gln  
 740 745 750

Gln Glu Asn Arg Asn Arg Asp Leu Gly Arg Glu Ile Glu Asn Leu Thr  
 755 760 765

Lys Glu Leu Glu Arg Tyr Arg His Phe Ser Lys Ser Leu Arg Pro Ser  
 770 775 780

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

Gln Thr Glu Ala Val Asp Asn Glu Pro Pro Asp Tyr Lys Ser Leu Ile  
 805 810 815

Pro Leu Glu Arg Ala Val Ile Asn Gly Gln Leu Tyr Glu Glu Ser Glu  
 820 825 830

Asn Gln Asp Glu Asp Pro Asn Asp Glu Gly Ser Val Leu Ser Phe Lys  
 835 840 845

Cys Ser Gln Ser Thr Pro Cys Pro Val Asn Arg Lys Leu Trp Ile Pro  
 850 855 860

Trp Met Lys Ser Lys Glu Gly His Leu Gln Asn Gly Lys Met Gln Thr  
 865 870 875 880

Lys Pro Asn Ala Asn Phe Val Gln Pro Gly Asp Leu Val Leu Ser His  
 885 890 895

Thr Pro Gly Gln Pro Leu His Ile Lys Val Thr Pro Asp His Val Gln  
 900 905 910

Asn Thr Ala Thr Leu Glu Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Ser Pro His  
 915 920 925

Ser Tyr Thr Ser Thr Ala Val Ile Pro Asn Cys Gly Thr Pro Lys Gln  
 930 935 940

Arg Ile Thr Ile Leu Gln Asn Ala Ser Ile Thr Pro Val Lys Ser Lys  
 945 950 955 960

Thr Ser Thr Glu Asp Leu Met Asn Leu Glu Gln Gly Met Ser Pro Ile  
 965 970 975

Thr Met Ala Thr Phe Ala Arg Ala Gln Thr Pro Glu Ser Cys Gly Ser  
 980 985 990

Leu Thr Pro Glu Arg Thr Met Ser Pro Ile Gln Val Leu Ala Val Thi  
 995 1000 1005

Gly Ser Ala Ser Ser Pro Glu Gln Gly Arg Ser Pro Glu Pro Thr  
 1010 1015 1020

Glu Ile Ser Ala Lys His Ala Ile Phe Arg Val Ser Pro Asp Arg  
 1025 1030 1035

Gln Ser Ser Trp Gln Phe Gln Arg Ser Asn Ser Asn Ser Ser Ser  
 1040 1045 1050

Val Ile Thr Thr Glu Asp Asn Lys Ile His Ile His Leu Gly Ser  
 1055 1060 1065

Pro Tyr Met Gln Ala Val Ala Ser Pro Val Arg Pro Ala Ser Pro  
 1070 1075 1080

Ser Ala Pro Leu Gln Asp Asn Arg Thr Gln Gly Leu Ile Asn Gly  
 1085 1090 1095

Ala Leu Asn Lys Thr Thr Asn Lys Val Thr Ser Ser Ile Thr Ile  
 1100 1105 1110

Thr Pro Thr Ala Thr Pro Leu Pro Arg Gln Ser Gln Ile Thr Val  
1115 1120 1125

Ser Asn Ile Tyr Asn  
1130

5

<210> 20  
<211> 1133  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 20

ES 2 535 258 T3

Met Arg Ser Arg Gly Ser Asp Thr Glu Gly Ser Ala Gln Lys Lys Phe  
1 5 10 15

Pro Arg His Thr Lys Gly His Ser Phe Gln Gly Pro Lys Asn Met Lys  
20 25 30

His Arg Gln Gln Asp Lys Asp Ser Pro Ser Glu Ser Asp Val Ile Leu  
35 40 45

Pro Cys Pro Lys Ala Glu Lys Pro His Ser Gly Asn Gly His Gln Ala  
50 55 60

Glu Asp Leu Ser Arg Asp Asp Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ile Leu Glu  
65 70 75 80

Gly Glu Leu Gln Ala Arg Asp Glu Val Ile Gly Ile Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Lys Met Asp Leu Ala Leu Leu Glu Ala Gln Tyr Gly Phe Val Thr Pro  
100 105 110

Lys Lys Val Leu Glu Ala Leu Gln Arg Asp Ala Phe Gln Ala Lys Ser  
115 120 125

Thr Pro Trp Gln Glu Asp Ile Tyr Glu Lys Pro Met Asn Glu Leu Asp  
130 135 140

Lys Val Val Glu Lys His Lys Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Leu Gly Gln  
145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Glu Lys Ser Arg Arg Gln Thr Ile Leu Glu Leu Glu  
165 170 175

Glu Glu Lys Arg Lys His Lys Glu Tyr Met Glu Lys Ser Asp Glu Phe  
180 185 190

Ile Cys Leu Leu Glu Gln Glu Cys Glu Arg Leu Lys Lys Leu Ile Asp  
195 200 205

Gln Glu Ile Lys Ser Gln Glu Glu Lys Glu Gln Glu Lys Glu Lys Arg



ES 2 535 258 T3

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

ES 2 535 258 T3

755					760					765					
Lys	Glu	Leu	Glu	Arg	Tyr	Arg	His	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser
	770					775					780				
Leu	Asn	Gly	Arg	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Gln	Val	Phe	Ser	Lys	Glu	Val
785					790					795					800
Gln	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Asn	Glu	Pro	Pro	Asp	Tyr	Lys	Ser	Leu	Ile
				805					810					815	
Pro	Leu	Glu	Arg	Ala	Val	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu	Tyr	Glu	Glu	Ser	Glu
			820					825					830		
Asn	Gln	Asp	Glu	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Gly	Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Lys
		835					840					845			
Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	Pro	Cys	Pro	Val	Asn	Arg	Lys	Leu	Trp	Ile	Pro
	850					855					860				
Trp	Met	Lys	Ser	Lys	Glu	Gly	His	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Met	Gln	Thr
865					870					875					880
Lys	Pro	Asn	Ala	Asn	Phe	Val	Gln	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Ser	His
				885					890					895	
Thr	Pro	Gly	Gln	Pro	Leu	His	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Asp	His	Val	Gln
			900					905					910		
Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ile	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Ser	Pro	His
		915					920					925			
Ser	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Pro	Asn	Cys	Gly	Thr	Pro	Lys	Gln
	930					935					940				
Arg	Ile	Thr	Ile	Leu	Gln	Asn	Ala	Ser	Ile	Thr	Pro	Val	Lys	Ser	Lys
945					950					955					960
Thr	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Met	Asn	Leu	Glu	Gln	Gly	Met	Ser	Pro	Ile
				965					970					975	
Thr	Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Glu	Ser	Cys	Gly	Ser
			980					985					990		
Leu	Thr	Pro	Glu	Arg	Thr	Met	Ser	Pro	Ile	Gln	Val	Leu	Ala	Val	Thr
		995					1000					1005			
Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Glu	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	
	1010					1015					1020				
Glu	Ile	Ser	Ala	Lys	His	Ala	Ile	Phe	Arg	Val	Ser	Pro	Asp	Arg	

ES 2 535 258 T3

	1025					1030					1035			
Gln	Ser	Ser	Trp	Gln	Phe	Gln	Arg	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser	Ser
	1040					1045					1050			
Val	Ile	Thr	Thr	Glu	Asp	Asn	Lys	Ile	His	Ile	His	Leu	Gly	Ser
	1055					1060					1065			
Pro	Tyr	Met	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Pro	Val	Arg	Pro	Ala	Ser	Pro
	1070					1075					1080			
Ser	Ala	Pro	Leu	Gln	Asp	Asn	Arg	Thr	Gln	Gly	Leu	Ile	Asn	Gly
	1085					1090					1095			
Ala	Leu	Asn	Lys	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	Thr	Ser	Ser	Ile	Thr	Ile
	1100					1105					1110			
Thr	Pro	Thr	Ala	Thr	Pro	Leu	Pro	Arg	Gln	Ser	Gln	Ile	Thr	Val
	1115					1120					1125			
Ser	Asn	Ile	Tyr	Asn										
	1130													

<210> 21  
 <211> 1135  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

ES 2 535 258 T3

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

ES 2 535 258 T3

Thr Pro Trp Gln Glu Asp Ile Tyr Glu Lys Pro Met Asn Glu Leu Asp  
 130 135 140

Lys Val Val Glu Lys His Lys Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Leu Gly Gln  
 145 150 155

Leu Leu Val Ala Glu Lys Ser His Arg Gln Thr Ile Leu Glu Leu Glu  
 165 170 175

Glu Glu Lys Arg Lys His Lys Glu Tyr Met Glu Lys Ser Asp Glu Phe  
 180 185 190

Ile Cys Leu Leu Glu Gln Glu Cys Glu Arg Leu Lys Lys Leu Ile Asp  
 195 200 205

Gln Glu Ile Lys Ser Gln Glu Glu Lys Glu Gln Glu Lys Glu Lys Arg  
 210 215 220

Val Thr Thr Leu Lys Glu Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Phe Ala Leu  
 225 230 235 240

Met Val Val Asp Glu Gln Gln Arg Leu Thr Ala Gln Leu Thr Leu Gln  
 245 250 255

Arg Gln Lys Ile Gln Glu Leu Thr Thr Asn Ala Lys Glu Thr His Thr  
 260 265 270

Lys Leu Ala Leu Ala Glu Ala Arg Val Gln Glu Glu Glu Gln Lys Ala  
 275 280 285

Thr Arg Leu Glu Lys Glu Leu Gln Thr Gln Thr Thr Lys Phe His Gln  
 290 295 300

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

Arg Gln Leu Gln Gln Lys Leu Ala Ala Leu Ser Arg Gln Ile Asp Glu  
 325 330 335

Leu Glu Glu Thr Asn Arg Ser Leu Arg Lys Ala Glu Glu Glu Leu Gln  
 340 345 350

Asp Ile Lys Glu Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Gly Asn Ala Gly Ile  
 355 360 365

Met Ala Glu Val Glu Glu Leu Arg Lys Arg Val Leu Asp Met Glu Gly  
 370 375 380

Lys Asp Glu Glu Leu Ile Lys Met Glu Glu Gln Cys Arg Asp Leu Asn  
 385 390 395 400

Lys Arg Leu Glu Arg Glu Thr Leu Gln Ser Lys Asp Phe Lys Leu Glu  
 405 410 415  
 Val Glu Lys Leu Ser Lys Arg Ile Met Ala Leu Glu Lys Leu Glu Asp  
 420 425 430  
 Ala Phe Asn Lys Ser Lys Gln Glu Cys Tyr Ser Leu Lys Cys Asn Leu  
 435 440 445  
 Glu Lys Glu Arg Met Thr Thr Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Glu Ser  
 450 455 460  
 Leu Lys Val Arg Ile Lys Glu Leu Glu Ala Ile Glu Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Lys Thr Glu Phe Thr Leu Lys Glu Asp Leu Thr Lys Leu Lys Thr Leu  
 485 490 495  
 Thr Val Met Phe Val Asp Glu Arg Lys Thr Met Ser Glu Lys Leu Lys  
 500 505 510  
 Lys Thr Glu Asp Lys Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Leu Gln Val Glu  
 515 520 525  
 Gln Asn Lys Val Thr Thr Val Thr Glu Lys Leu Ile Glu Glu Thr Lys  
 530 535 540  
 Arg Ala Leu Lys Ser Lys Thr Asp Val Glu Glu Lys Met Tyr Ser Val  
 545 550 555 560  
 Thr Lys Glu Arg Asp Asp Leu Lys Asn Lys Leu Lys Ala Glu Glu Glu  
 565 570 575  
 Lys Gly Asn Asp Leu Leu Ser Arg Val Asn Met Leu Lys Asn Arg Leu  
 580 585 590  
 Gln Ser Leu Glu Ala Ile Glu Lys Asp Phe Leu Lys Asn Lys Leu Asn  
 595 600 605  
 Gln Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Ala Leu His Gln Glu Asn Asn Lys  
 610 615 620  
 Ile Lys Glu Leu Ser Gln Glu Val Glu Arg Leu Lys Leu Lys Leu Lys  
 625 630 635 640  
 Asp Met Lys Ala Ile Glu Asp Asp Leu Met Lys Thr Glu Asp Glu Tyr  
 645 650 655  
 Glu Thr Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Glu Arg Asp Lys Ala Gln Phe  
 660 665 670

ES 2 535 258 T3

Leu Ser Lys Glu Leu Glu His Val Lys Met Glu Leu Ala Lys Tyr Lys  
 675 680 685  
 Leu Ala Glu Lys Thr Glu Thr Ser His Glu Gln Trp Leu Phe Lys Arg  
 690 695 700  
 Leu Gln Glu Glu Glu Ala Lys Ser Gly His Leu Ser Arg Glu Val Asp  
 705 710 715 720  
 Ala Leu Lys Glu Lys Ile His Glu Tyr Met Ala Thr Glu Asp Leu Ile  
 725 730 735  
 Cys His Leu Gln Gly Asp His Ser Val Leu Gln Lys Lys Leu Asn Gln  
 740 745 750  
 Gln Glu Asn Arg Asn Arg Asp Leu Gly Arg Glu Ile Glu Asn Leu Thr  
 755 760 765  
 Lys Glu Leu Glu Arg Tyr Arg His Phe Ser Lys Ser Leu Arg Pro Ser  
 770 775 780  
 Leu Asn Gly Arg Arg Ile Ser Asp Pro Gln Val Phe Ser Lys Glu Val  
 785 790 795 800  
 Gln Thr Glu Ala Val Asp Asn Glu Pro Pro Asp Tyr Lys Ser Leu Ile  
 805 810 815  
 Pro Leu Glu Arg Ala Val Ile Asn Gly Gln Leu Tyr Glu Glu Ser Glu  
 820 825 830  
 Asn Gln Asp Glu Asp Pro Asn Asp Glu Gly Ser Val Leu Ser Phe Lys  
 835 840 845  
 Cys Ser Gln Ser Thr Pro Cys Pro Val Asn Arg Lys Leu Trp Ile Pro  
 850 855 860  
 Trp Met Lys Ser Lys Glu Gly His Leu Gln Asn Gly Lys Met Gln Thr  
 865 870 875 880  
 Lys Pro Asn Ala Asn Phe Val Gln Pro Gly Asp Leu Val Leu Ser His  
 885 890 895  
 Thr Pro Gly Gln Pro Leu His Ile Lys Val Thr Pro Asp His Val Gln  
 900 905 910  
 Asn Thr Ala Thr Leu Glu Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Ser Pro His  
 915 920 925  
 Ser Tyr Thr Ser Thr Ala Val Ile Pro Asn Cys Gly Thr Pro Lys Gln  
 930 935 940

ES 2 535 258 T3

Arg Ile Thr Ile Leu Gln Asn Ala Ser Ile Thr Pro Val Lys Ser Lys  
945 950 955 960

Thr Ser Thr Glu Asp Leu Met Asn Leu Glu Gln Gly Met Ser Pro Ile  
965 970 975

Thr Met Ala Thr Phe Ala Arg Ala Gln Thr Pro Glu Ser Cys Gly Ser  
980 985 990

Leu Thr Pro Glu Arg Thr Met Ser Pro Ile Gln Val Leu Ala Val Th  
995 1000 1005

Gly Ser Ala Ser Ser Pro Glu Gln Gly Arg Ser Pro Glu Pro Thr  
1010 1015 1020

Glu Ile Ser Ala Lys His Ala Ile Phe Arg Val Ser Pro Asp Arg  
1025 1030 1035

Gln Ser Ser Trp Gln Phe Gln Arg Ser Asn Ser Asn Ser Ser Ser  
1040 1045 1050

Val Ile Thr Thr Glu Asp Asn Lys Ile His Ile His Leu Gly Ser  
1055 1060 1065

Pro Tyr Met Gln Ala Val Ala Ser Pro Val Arg Pro Ala Ser Pro  
1070 1075 1080

Ser Ala Pro Leu Gln Asp Asn Arg Thr Gln Gly Leu Ile Asn Gly  
1085 1090 1095

Ala Leu Asn Lys Thr Thr Asn Lys Val Thr Ser Ser Ile Thr Ile  
1100 1105 1110

Thr Pro Thr Ala Thr Pro Leu Pro Arg Gln Ser Gln Ile Thr Val  
1115 1120 1125

Glu Pro Leu Leu Leu Pro His  
1130 1135

<210> 22  
<211> 197  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 22

5

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
20 25 30

10

ES 2 535 258 T3

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

<210> 23  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 23

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 20 25 30  
 His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly  
 35 40 45  
 Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys  
 50 55 60

10

ES 2 535 258 T3

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu  
 65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr  
 85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro  
 100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro  
 115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly  
 130 135 140

Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val  
 145 150 155 160

Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp  
 165 170 175

Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 180 185

<210> 24  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 24

5

ES 2 535 258 T3

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly  
 35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro  
 50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg  
 65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr  
 85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu  
 100 105 110

Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr  
 115 120 125

Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly  
 130 135 140

Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg  
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 165 170

<210> 25  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 25

5

ES 2 535 258 T3

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

<210> 26  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 26

5

ES 2 535 258 T3

Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp  
1 5 10

Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn  
20 25 30

Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg  
35 40 45

Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
50 55 60

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
65 70 75 80

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His  
85 90 95

Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met  
100 105 110

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr  
115 120 125

Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp  
130 135 140

Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln  
145 150 155 160

Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val  
165 170 175

His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr  
180 185 190

Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg  
195 200 205

Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala  
210 215 220

Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val  
225 230 235 240

Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly  
245 250

<210> 27  
<211> 244  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

5

<210> 28

<211> 42

ES 2 535 258 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

<210> 29  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Secuencia artificial - GPBP\_DeltaFFAT

15

<400> 29

Leu Ile Asn Glu Glu Glu Phe Ala Ala Leu Asp Arg Gln  
1 5 10

<210> 30  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 30

25

Arg Arg Thr Glu Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys  
1 5 10 15

Lys Ser His Phe  
20

<210> 31  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 31

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

Glu Phe Phe Asp  
20

35

<210> 32  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 32

Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile Glu Glu Gln Ser  
1 5 10 15

Gln Ser Glu Lys  
20

<210> 33

<211> 20

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser  
1 5 10 15

Ser Val Gly Thr  
20

10

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una molécula de unión a la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP) para detectar la GPBP de 77 kDa en una muestra de plasma, donde la molécula de unión a GPBP es un anticuerpo, un aptámero o un sustrato de GPBP.
2. El uso de la reivindicación 1, donde el plasma es un suero sanguíneo al que se le han retirado los factores de coagulación.
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicha molécula de unión a GPBP es un anticuerpo monoclonal.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha isoforma de GPBP de 77 kDa es la isoforma nativa de GPBP de 77 kDa.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha muestra de plasma o suero se obtiene de un sujeto humano que se sospecha que tiene una afección inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en Síndrome de Goodpasture y glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario.
6. El uso de la reivindicación 5, para diagnosticar que el sujeto humano tiene una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en Síndrome de Goodpasture y glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario, donde un aumento en el sujeto de la GPBP de 77 kD respecto al control es indicativo de Síndrome de Goodpasture o glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario.
7. Un método para detectar en la circulación la proteína de unión al antígeno de Goodpasture (GPBP), que comprende
- (a) poner en contacto una muestra de plasma con una molécula de unión a GPBP que se une a la GPBP en condiciones que promueven la unión selectiva de la molécula de unión a GPBP a la GPBP, donde la molécula de unión a GPBP es un anticuerpo, un aptámero o un sustrato de GPBP;
- (b) retirar las moléculas de unión a GPBP no unidas; y
- (c) detectar la formación de complejos entre la molécula de unión a GPBP y la GPBP en la muestra de plasma.
8. El método de la reivindicación 7 donde la molécula de unión a GPBP comprende un anticuerpo.
9. Un método para aislar isoformas nativas de GPBP, que comprende un método seleccionado del grupo que consiste en:
- (I)
- (a) someter a una muestra de plasma a una precipitación con sulfato de amonio;
- (b) llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico (CII) en la muestra de plasma precipitada con sulfato de amonio;
- (c) identificar las fracciones de la CII que contienen isoformas nativas de GPBP;
- (d) someter a las fracciones de la CII que contienen isoformas nativas de GPBP a cromatografía de filtración en gel (CFG); y
- (e) identificar las fracciones de la CFG que contienen isoformas nativas de GPBP; y
- (II)
- (a) pasar una muestra de plasma a través de una columna de afinidad que comprende una molécula de unión a GPBP que se une selectivamente a la GPBP nativa, donde la molécula de unión a GPBP es un anticuerpo, un aptámero o un sustrato de GPBP;
- (b) lavar la proteína no unida de la muestra de plasma de la columna de afinidad; y
- (c) eluir las isoformas nativas de GPBP de la columna.

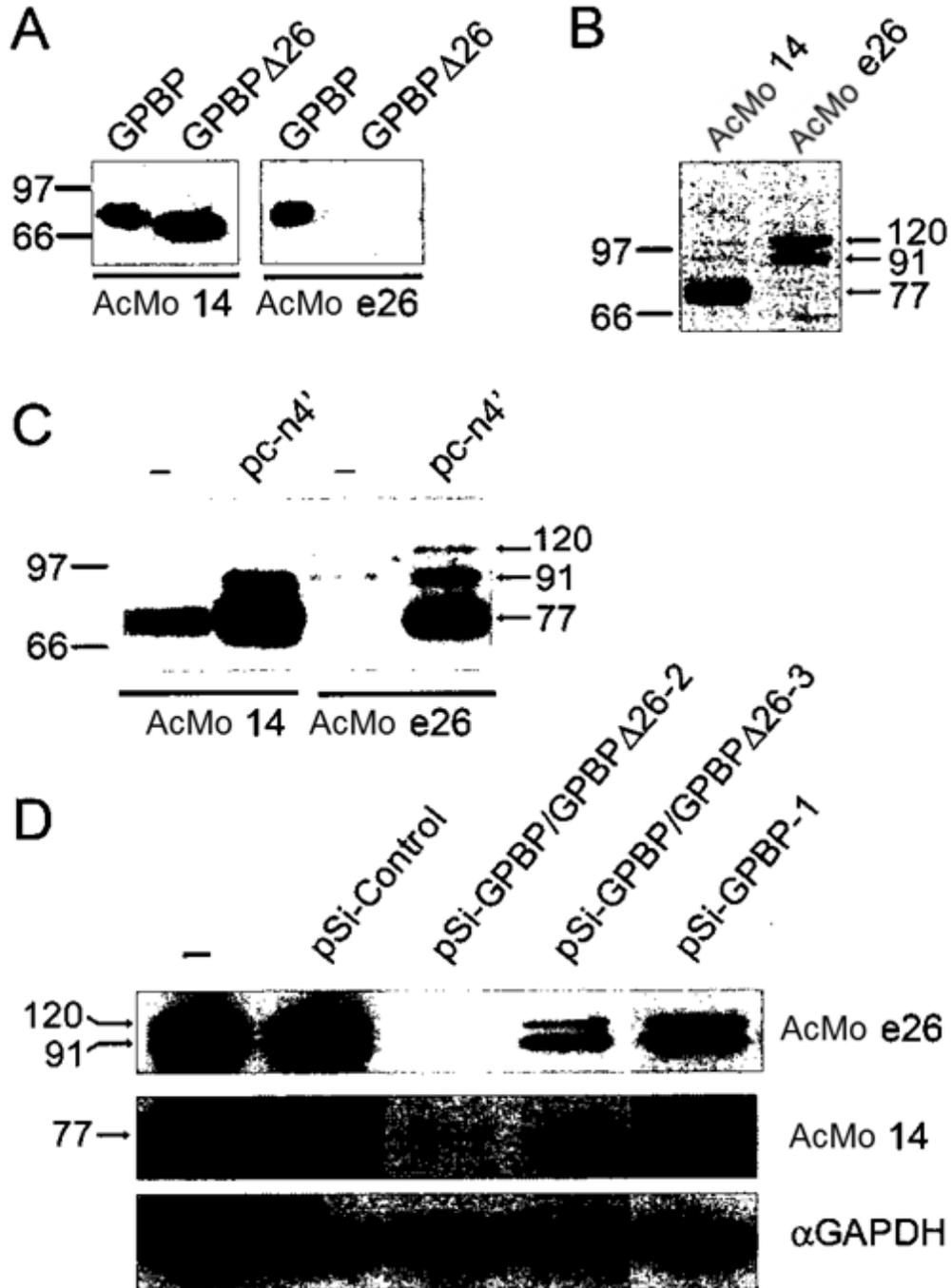


Figura 1



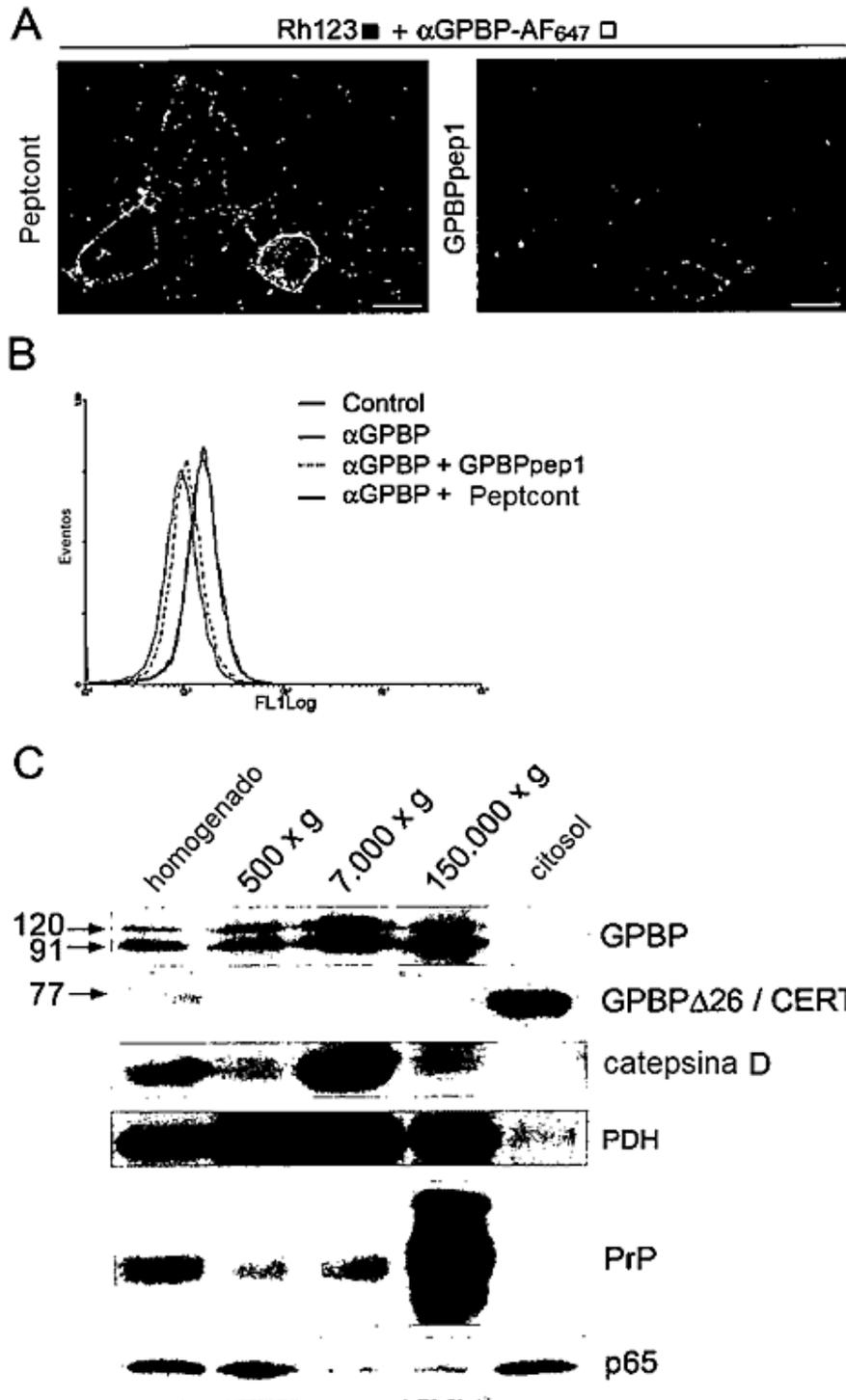


Figura 3

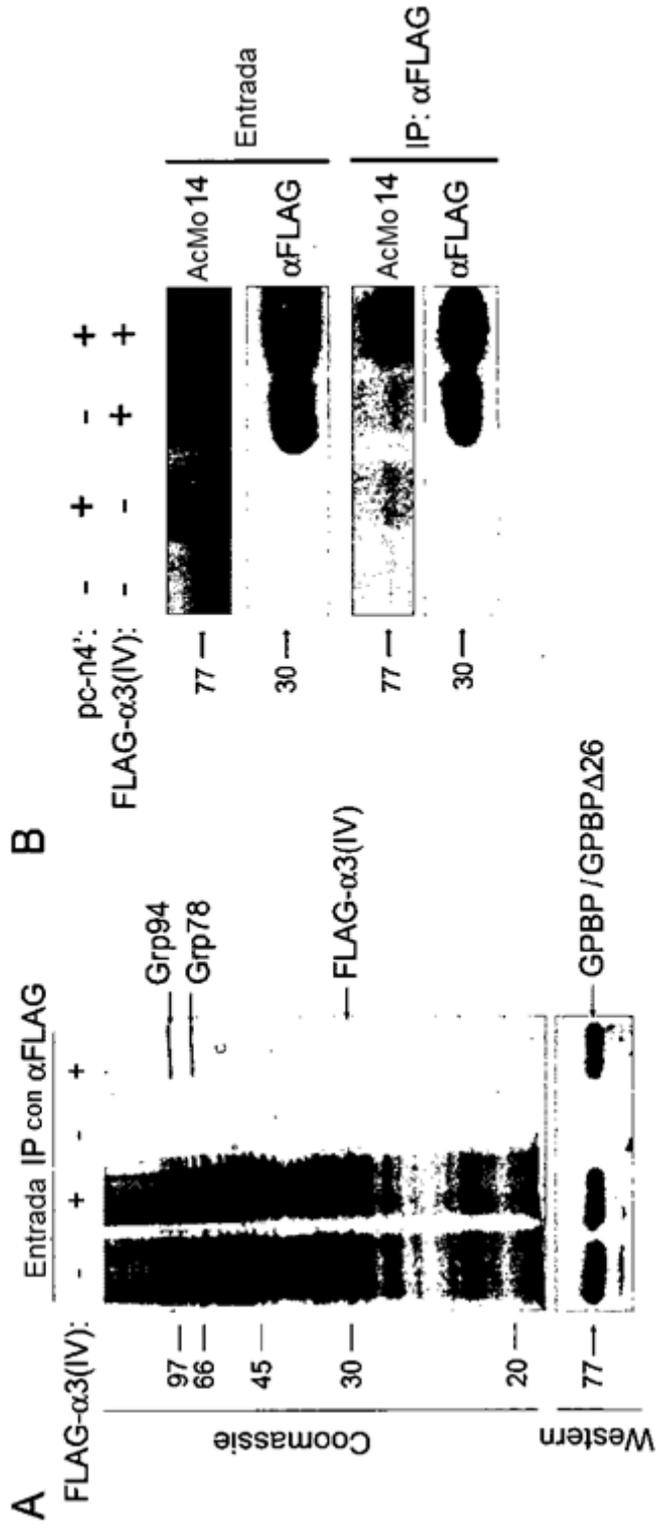


Figura 4

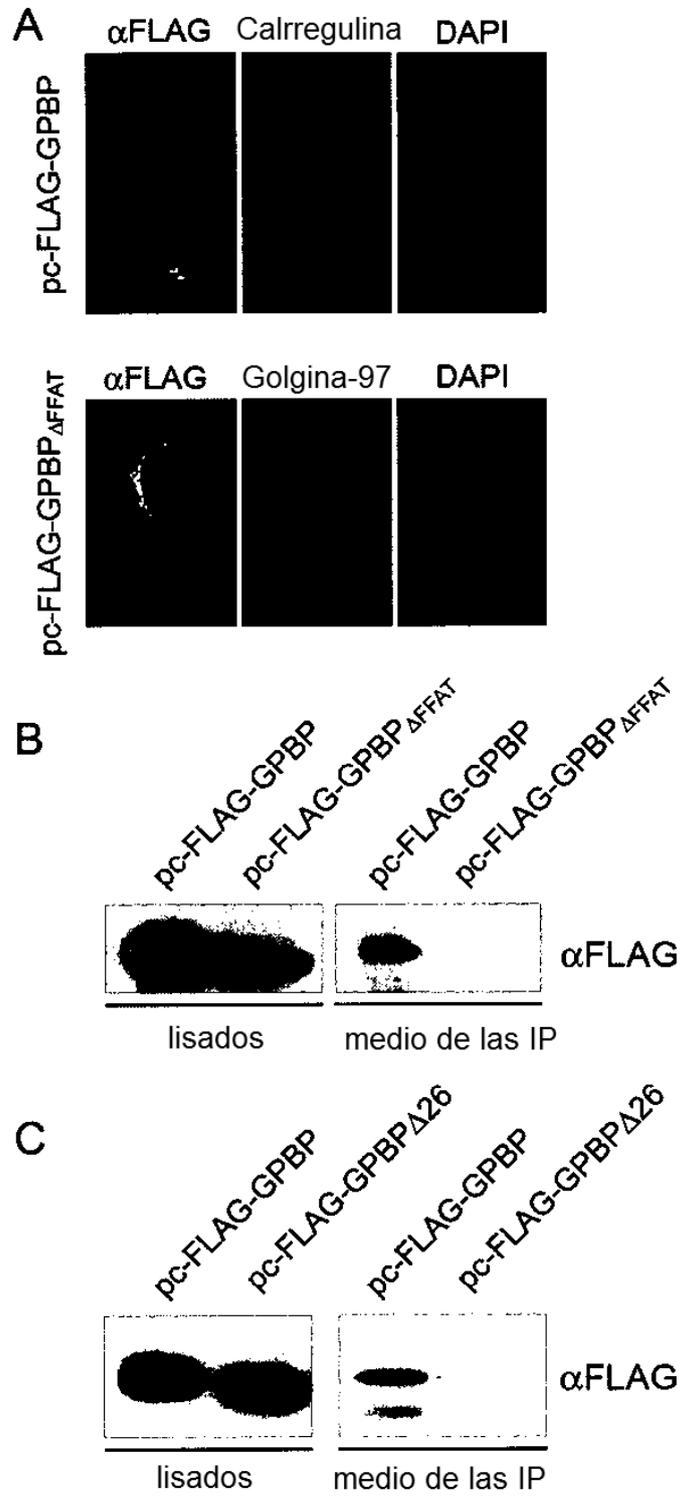


Figura 5

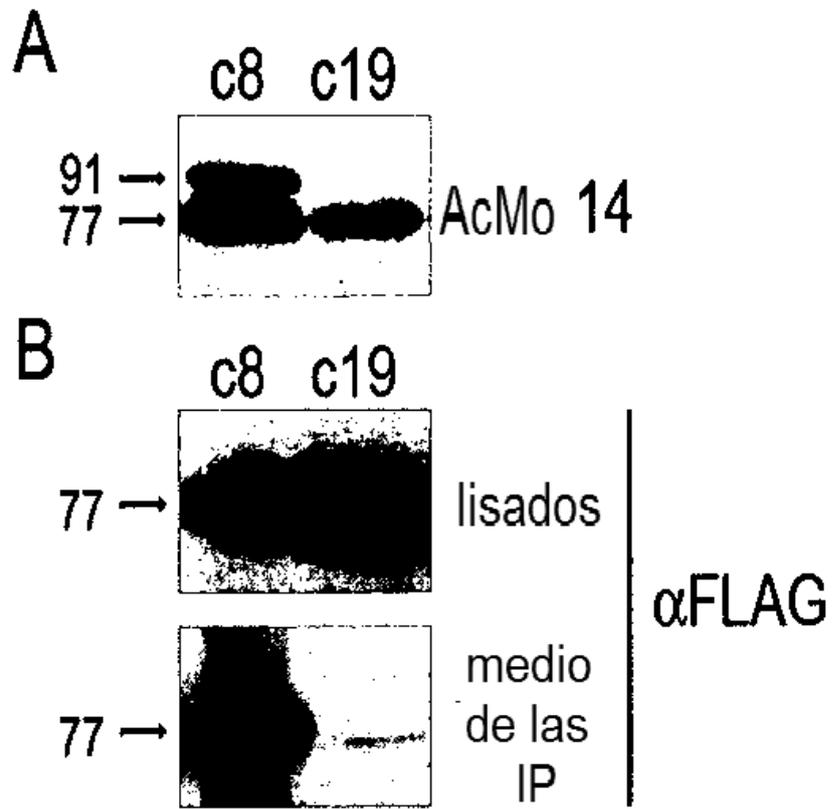
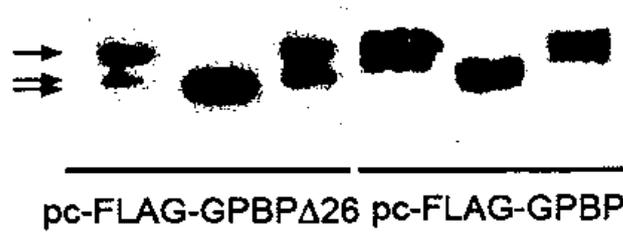


Figura 6

7/19

**A**

bSM <sub>asa</sub> :	-	-	+	-	-	+
λPP <sub>asa</sub> :	-	+	-	-	+	-



**B**

bSM <sub>asa</sub> :	-	+
----------------------	---	---

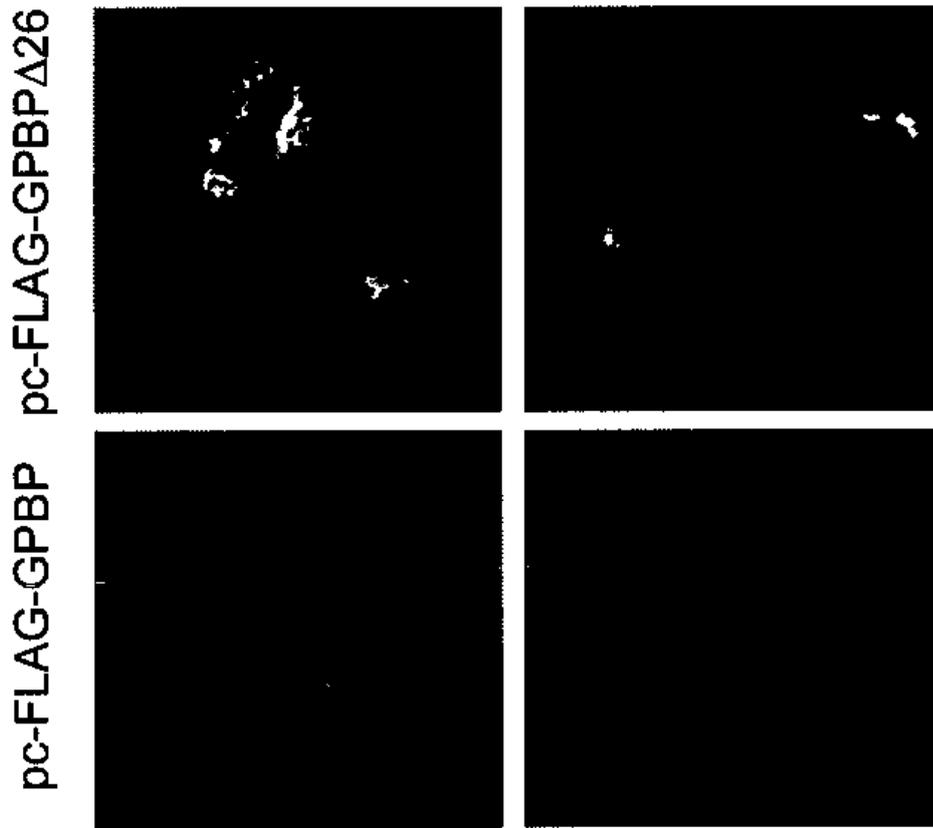


Figura 7

8/19

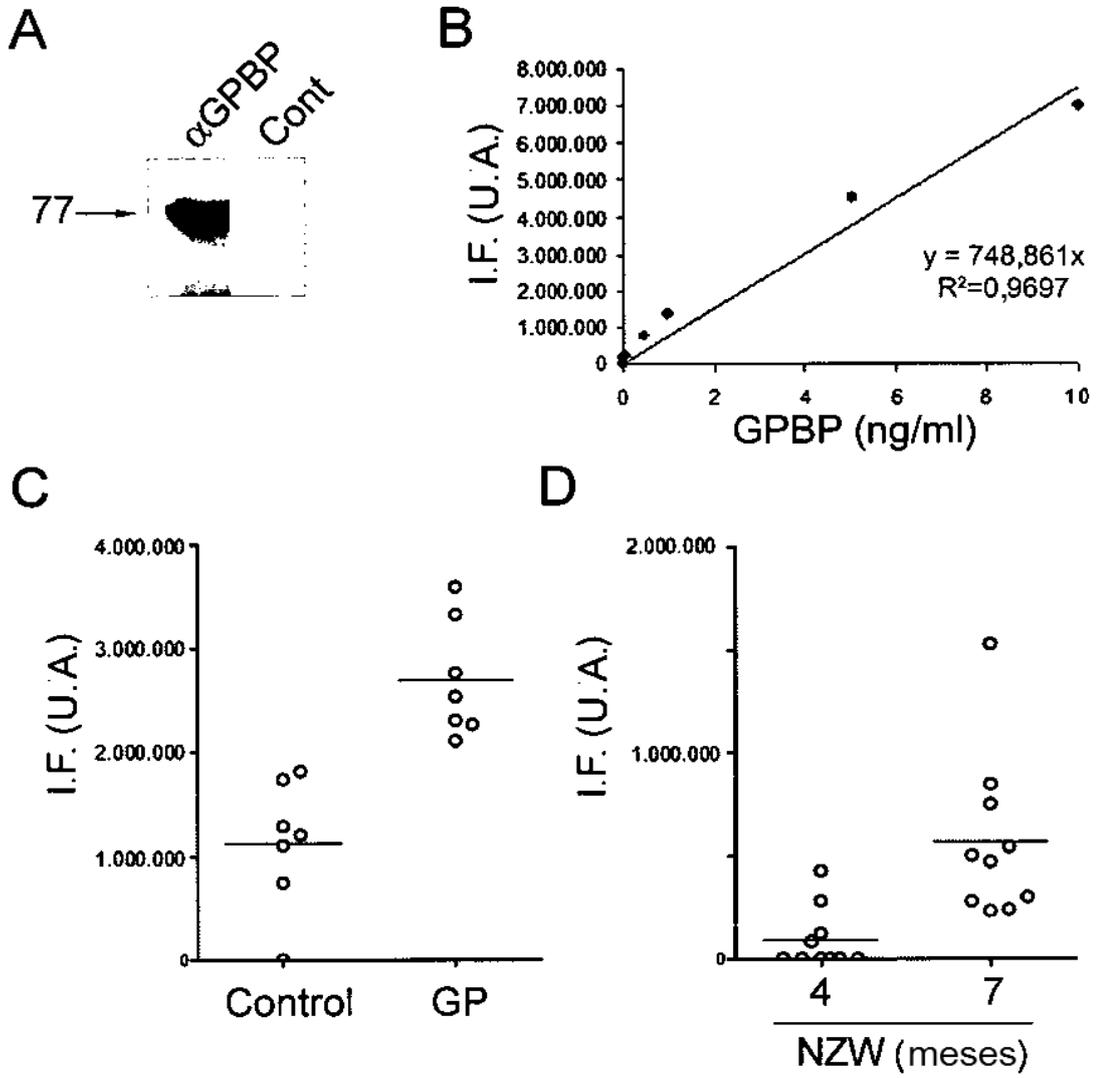


Figura 8

9/19

**A**

GPBP 316 LINEEEFFDAVEAALDRQ 333  
GPBP<sub>ΔFFAT</sub> 316 LINEEEF - - - - - AALDRQ 333

**B**

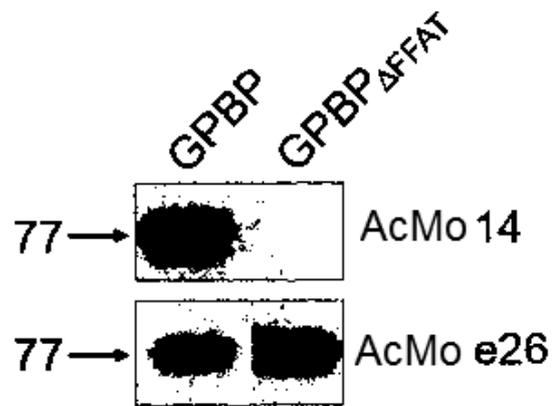


Figura 9

10/19

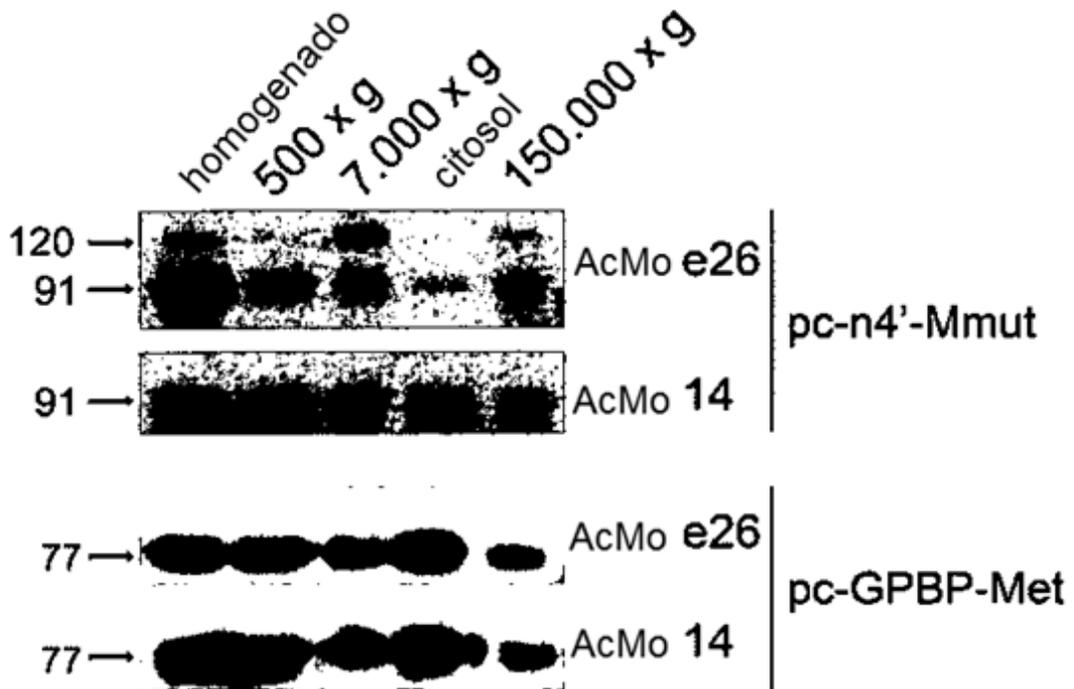


Figura 10

11/19

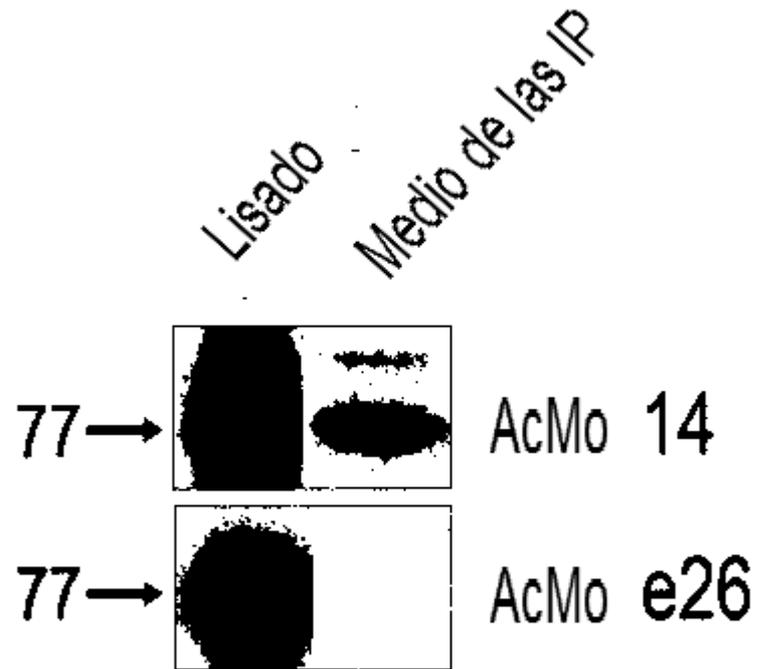


Figura 11

12/19

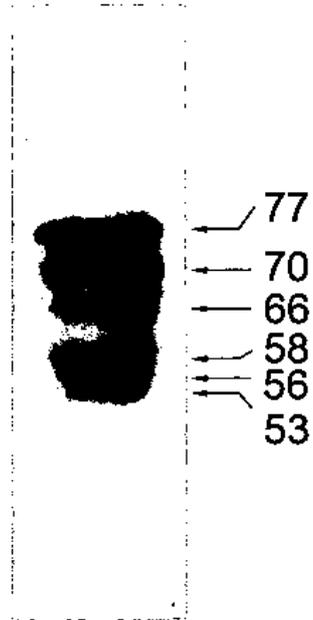


Figura 12

13/19

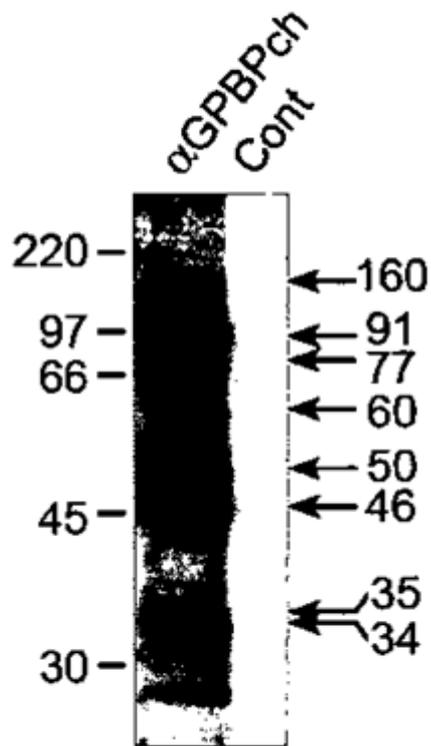


Figura 13

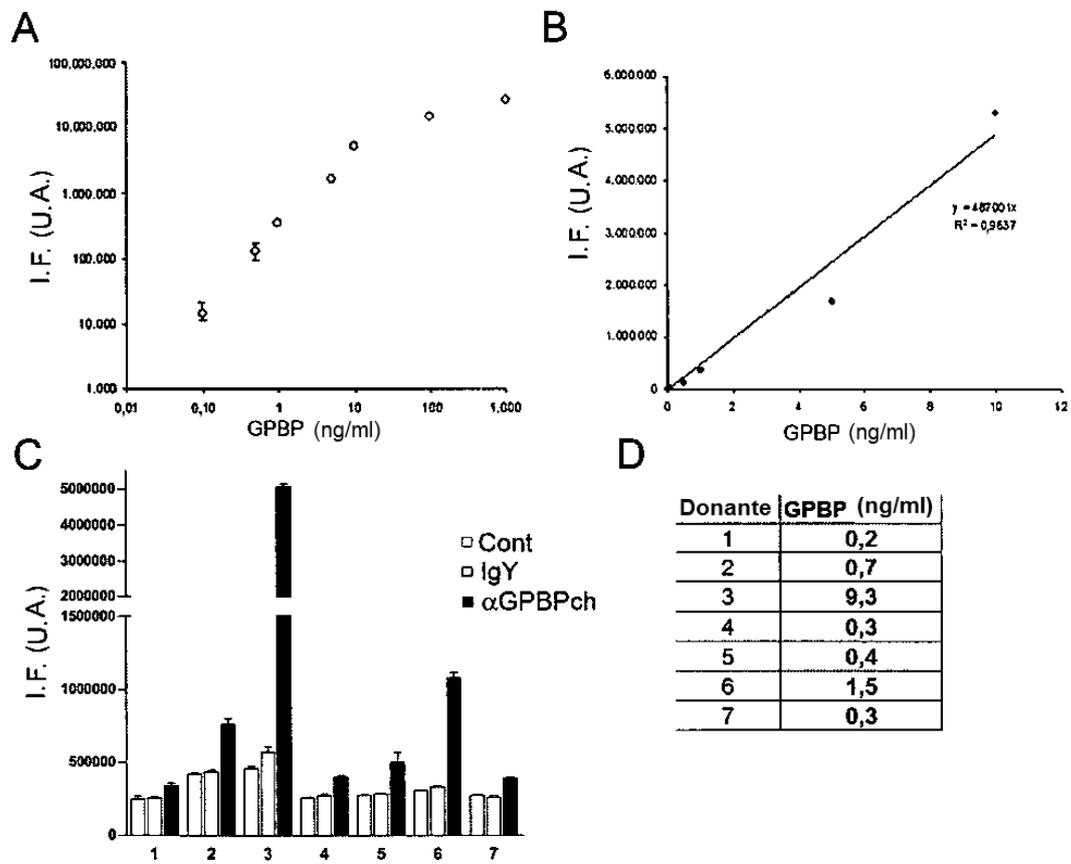


Figura 14



16/19

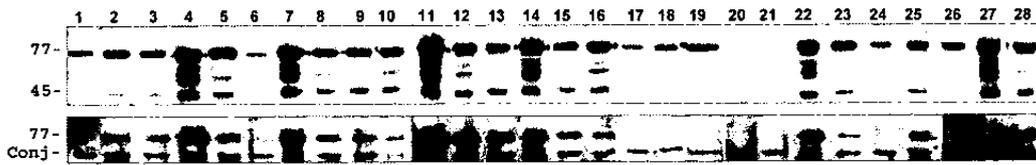


Figura 16

17/19

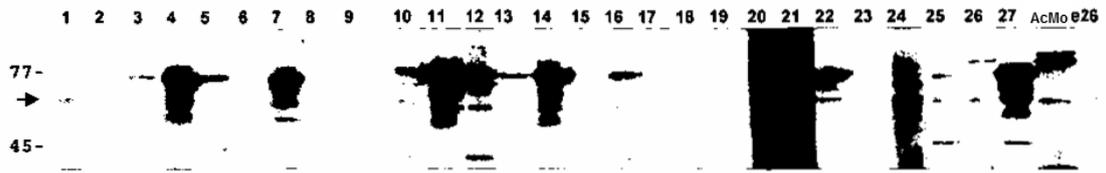


Figura 17

**A**

```

MSDNQSWNSSGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNY IHGWQDRWVVLKNNALSYYKSEDE 60
TEYGCGRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDSVWYLRAQDPDHRQQWIDAIEQHKTESG 120
YGSSESSLRRHGSMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
YFDACADAVSKDELQRDKVVEDDEDFFPTTRSDGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDSWQKRLDKE1TEKKRRTEEAYKNAMTELKK 300
KSHFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEK2VRLHWPTSLPSGDAFS 360
SVGTHRFVQKPYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQVEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 420
VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPK3KATHAVKGV4TGHEVCNYF5WNV6DVRNDWETT7IENT8FHV 480
VETLADN9AI10IIYQTHKRVWPASQ11RDVLYLSVIRKIPALTENDPE12TWIVCNFSVDHDSAPL 540
NNRCVRAKINVAMICQTLVSPPEGNQEISRDNILCKITYVANVNP13GGWAPASVLR14AVAKR 600
EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 624
    
```

**B**

7	R R T E E A Y K N A M T E L K K K S H F <sup>304</sup> Δ1
	C G P D Y E E G P N S L I N E E E F F D <sup>324</sup> Δ2
8	A V E A A L D R Q D K I E E Q S Q S E K <sup>344</sup> Δ3
	V R L R H W P T S L P S G D A F S S V G T <sup>364</sup> Δ4

**C**

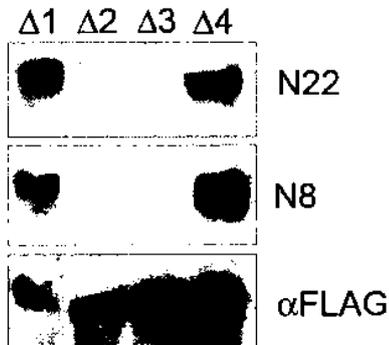


Figura 18

TAAAADGWKGRLLPSPLVLLPRSARCQARRRRGGRTSSLLLLPPTPERALFASPSDPSPRGLGASSGAAE  
GAGAGLLLGCRASTMSDNQSWNSSGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYS  
EDETEYGCGRSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDSVWYLRAQDPDHRQQWIDAIEQHKTESGYGSESSL  
RRHGSMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQKYFDACADAVSKDELQRD  
KVVEDDEDDFPTRSDGDFLHSTNGNKEKLPFHVTPKGINGIDFKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMV  
KREDSWQKRLDKETEKRRTEEAYKNAMTELKKKSHFGGPDYEEGPNLINEEEFFDAVEAALDRQDKIE  
EQSQSEKVRHLHWPTSLPSGDAFSSVGTFRFVQKPYRSSSMSIDLVASDDVHRFSSQVEEMVQNHMTY  
SLQDVGGDANWQLVVEEGEMKVYRREVEENGLVLDPLKATHAVKGVTCHEVCNYFWNVVDRNDWETTIEN  
FHVETLADNAIIYQTHKRVWPASQRDVLVYLSVIRKIPALTENDPETWIVCNFSVDHDSAPLNNRCVRA  
KINVAMICQTLVSPPEGNQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRRAVAKREYPKFLKRFTSYVQEKT  
AGKPILF

Figura 19