

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 719**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 09748405 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2342566**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de una esclerodermia sistémica o de una hipertensión arterial pulmonar**

30 Prioridad:

**17.09.2008 FR 0856255**

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

**14.05.2015**

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS  
(33.3%)  
3 Avenue Victoria  
75001 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y  
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MOUTHON, LUC;  
HUMBERT, MARC;  
CALZAS, CYNTHIA;  
CAMOIN, LUC y  
SAHBATOU, YOUNES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 719 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

Procedimiento de diagnóstico de una esclerodermia sistémica o de una hipertensión arterial pulmonar

La invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de detección de una esclerodermia sistémica (ScS) o de una hipertensión arterial pulmonar asociada a una esclerodermia (HTAP-ScS), o de una hipertensión arterial pulmonar idiopática (HTAPi) en un sujeto, que comprende la determinación de la presencia y/o de la cantidad de anticuerpos en una muestra biológica procedente de un paciente, como se describe en las reivindicaciones.

## Estado de la técnica

La esclerodermia sistémica (ScS) es una enfermedad rara que se caracteriza por la aparición de lesiones fibrosas que afectan a la piel y a ciertas vísceras como el pulmón, el tubo digestivo y el corazón, así como una hiperreactividad vascular que es causa de un fenómeno de Raynaud y de manifestaciones severas como la crisis renal y la hipertensión arterial pulmonar (HTAP). La fisiología de la ScS es compleja y parcialmente comprendida. La aparición de una ScS resulta de la disfunción de tres tipos de células, los linfocitos B y T responsables de una disregulación inmunitaria, las células endoteliales responsables de anomalías vasculares y los fibroblastos responsables de lesiones fibrosas.

El noventa por ciento de los pacientes esclerodérmicos tienen anticuerpos antinucleares (AAN) en su suero. Ciertos auto-anticuerpos son muy específicos de la ScS y mutuamente excluyentes, como los anticuerpos anti-topoisomerasa I (anti-SCI-70) (ATA) (Tamby *et al.*, 2007), presentes con mayor frecuencia en las formas difusas de la enfermedad, los anticuerpos anti-centrómero (ACA), asociados en general a las formas cutáneas limitadas (Moroi *et al.*, 1980), o los anticuerpos anti-ARN polimerasa III asociados a las formas cutáneas difusas y a la aparición de una crisis renal (Bunn *et al.*, 1998). Los AAN no tienen ningún papel patógeno demostrado en el curso de la ScS pero su detección constituye una ayuda para el diagnóstico precoz de la ScS. Otros auto-anticuerpos no específicos de la ScS como los anticuerpos anti-ribonucleoproteína, anti-SSA y anti-SSB, los anticuerpos anti-cardiolipina o el factor reumatoide se encuentran algunas veces en el curso de la ScS. Los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA) se pueden detectar en el 28 a 54 % de los pacientes esclerodérmicos. Estos autoanticuerpos son capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión y de provocar una apoptosis de las células endoteliales en presencia de células citotóxicas naturales (« natural killer ») (Bordron *et al.*, 1998). Las dianas de los AECA en el curso de la ScS todavía son mal conocidas y a fecha de hoy no se ha identificado el antígeno específico de la célula endotelial. En cambio, la ADN topoisomerasa 1 (García de la Peña-Lefebvre *et al.*, 2004) y la proteína centromérica B (Servettaz *et al.*, 2006) han sido identificadas como las dianas de los AECA en los enfermos esclerodérmicos. Los anticuerpos anti-fibroblastos (AFA) han sido identificados en los pacientes esclerodérmicos. Estos anticuerpos son capaces de activar los fibroblastos, de aumentar la expresión de moléculas de adhesión como la molécula-1 de adhesión inter-celular (ICAM) y pro-inflamatorios (aumento de los niveles de ARNm, de IL-1 $\alpha$ , de IL-1 $\beta$  y de IL-6) así como la síntesis de colágeno (Chizzolini *et al.*, 2002). Se ha demostrado recientemente que los AFA se pueden fijar sobre la topoisomerasa 1 adsorbida en la superficie de los fibroblastos (Henault *et al.*, 2006). En el ensayo ELISA (ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas), los AFA se han encontrado en el 30 % de los pacientes que presentan una HTAP asociada a una ScS (Tamby *et al.*, 2006).

La hipertensión arterial pulmonar (HTAP) es una patología rara responsable de la aparición de una descompensación cardíaca derecha que puede llevar a la muerte. El diagnóstico de HTAP se establece mediante un cateterismo derecho que permite la medida de la presión arterial pulmonar media superior o igual a 25 mm de Hg en reposo en ausencia de elevación de la presión capilar pulmonar (Rubin, 1997). La aparición de una HTAP es la consecuencia de una obstrucción crónica de las pequeñas arterias pulmonares secundaria a la proliferación de células endoteliales, de células musculares lisas vasculares y de fibroblastos (Dorfmueller *et al.*, 2003). En particular, la neo-muscularización de las pequeñas arterias pulmonares periféricas normalmente no musculares es una característica común a todas las formas de remodelado asociadas a la HTAP.

La HTAP puede ser idiopática, es decir esporádica, pero también familiar, asociada a la toma de anorexígenos (dexfenfluramina), o asociada a un cierto número de patologías incluyendo la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La HTAP puede estar asociada también a colagenosis como la ScS (Hachulla *et al.*, 2005), el síndrome de Sharp (o conectivitis mixta), o más raramente el lupus eritematoso sistémico. Aproximadamente 8 a 12 % de los pacientes esclerodérmicos desarrollan una HTAP, causa de una mortalidad elevada. Además, en el curso de la HTAP idiopática, se encuentran de vez en cuando señales de auto-inmunidad, a saber anticuerpos anti-nucleares o anticuerpos anti-tiroglobulina. La presencia de anticuerpos anti-células endoteliales (Tamby *et al.*, 2005) y de anticuerpos anti-fibroblastos (Tamby *et al.*, 2006) ha sido descrita en el curso de la HTAP idiopática o asociada a la ScS. Sin embargo, no ha sido estudiado el valor predictivo de estos anticuerpos en la aparición de la HTAP y el papel potencial de los fenómenos auto-inmunes en la patogenia de la HTAP idiopática permanece incierto (Mouthon *et al.*, 2005).

En la mayor parte de los casos, la HTAP se detecta cuando el paciente presenta una disnea de grado III o IV. Cuando el paciente es atendido por una enfermedad crónica como la ScS, la HTAP se detecta por una ecografía cardíaca anual. La solicitud de patente US 2002/0009749 describe la detección de anticuerpos anti-HMG-1 (proteína 1 del grupo de alta movilidad) y anti-HMG-2 para el diagnóstico de enfermedades auto-inmunes, entre otras la

esclerodermia sistémica. Terrier *et al.*, han identificado los antígenos de anticuerpos anti-fibroblastos presentes en los pacientes afectados de hipertensión arterial pulmonar (Terrier *et al.*, 2008). Sigue haciendo falta un ensayo sencillo y fiable para la detección de una ScS y/o de una HTAP, que sería valioso para un diagnóstico lo más precoz posible y que permitiría poner en marcha rápidamente estrategias terapéuticas para mejorar el estado del paciente y sus posibilidades de sobrevivir. La invención tiene por objeto un ensayo de ese tipo.

### Resumen de la invención

La invención proporciona ahora un procedimiento *in vitro* de detección de una esclerodermia sistémica (ScS) o de una hipertensión arterial pulmonar asociada a una esclerodermia (HTAP-ScS) o de una hipertensión arterial pulmonar idiopática (HTAPi) en un sujeto, que comprende la determinación de la presencia y/o de la cantidad de al menos un anticuerpo elegido del grupo constituido por los anticuerpos anti-galectina-1, anti-proteína FAM10A4, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, y anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa, en una muestra biológica procedente de un paciente,

siendo indicativa de una ScS o de una HTAPi, la presencia de un anticuerpo anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa;

siendo indicativa de una HTAP-ScS o de una HTAPi, la presencia de un anticuerpo anti-proteína FAM10A4;

siendo indicativa de una ScS, la presencia de un anticuerpo anti-galectina-1;

o siendo indicativa de una ScS, de una HTAP-ScS o de una HTAPi, la presencia de una cantidad superior a un valor control de un anticuerpo anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés.

### Descripción detallada de la invención

La esclerodermia sistémica (ScS) y la hipertensión arterial pulmonar (HTAP) se caracterizan las dos por la presencia de autoanticuerpos (AAc) en el suero de los pacientes, en particular AAc dirigidos contra las células endoteliales y los fibroblastos. Antes de los trabajos presentados a continuación, ningún AAc dirigido contra las células musculares lisas vasculares (CMLV) había sido puesto en evidencia. La caracterización por los inventores de dichos anticuerpos dirigidos contra las CMLV es de una importancia capital, especialmente teniendo en cuenta el papel clave de estas células en la fisiopatología de la ScS, con o sin HTAP, y de la HTAPi.

Los inventores se han propuesto identificar los anticuerpos dirigidos contra las CMLV y caracterizar las dianas antigénicas. Para hacer esto, los inventores han utilizado las CMLV de las arterias mamarias internas como fuente de antígenos y han analizado los sueros de pacientes de fenotipo idéntico (pacientes que tienen una ScS sin o con HTAP, pacientes que tienen una HTAP idiopática, o HTAPi, y sujetos sanos). Se han buscado los anticuerpos con ayuda de una técnica de inmunotransferencia en dos dimensiones seguida de una identificación de los antígenos por espectrometría de masas (véase la sección « Ejemplos » más adelante).

Los inventores han podido demostrar así numerosas reactividades de IgG de las que algunas son muy intensas con el conjunto (pool) de los sueros de pacientes analizados en inmunotransferencia en una dimensión, mientras que los sujetos sanos no expresaban casi ninguna reactividad de IgG. Los inventores han caracterizado, en inmunotransferencia en dos dimensiones, varias manchas proteicas reconocidas por al menos el 80 % de las IgG de los conjuntos de sueros de un grupo de pacientes dados, y no por las IgG séricas de un conjunto de sujetos sanos y otras manchas proteicas reconocidas por la gran mayoría de las IgG séricas de los conjuntos de enfermos con una intensidad mayor que la de las IgG séricas del conjunto de sujetos sanos.

#### Definiciones:

El término « muestra biológica » se refiere a cualquier muestra biológica procedente de un paciente. Los ejemplos de muestras incluyen los líquidos biológicos y las biopsias de tejidos. Los fibroblastos de pacientes esclerodérmicos cultivados a partir de biopsias de la piel constituyen igualmente un ejemplo de muestra biológica. De manera preferente, la muestra puede ser de sangre, suero, saliva, orina, semen. De manera ventajosa preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre o de suero.

El término « paciente » se refiere a cualquier sujeto susceptible de ser sometido a ensayo. Con preferencia se trata de un ser humano, pero el término incluye cualquier otro mamífero, tal como perros, gatos, roedores, ganado, caballos, monos etc. El paciente puede ser sometido a ensayo independientemente de su sexo o edad. El paciente puede ser un sujeto en riesgo, puede ser asintomático o puede presentar signos precoces o avanzados de una ScS y/o de una HTAP. Por ejemplo el paciente puede ser un sujeto predispuesto a desarrollar una ScS y/o una HTAP, en particular un sujeto que es portador de una o varias mutaciones en el gen que codifica BMPRII, endoglin o ALK1.

El término « diagnóstico » significa la identificación de la patología o la evaluación del estado de gravedad de la patología.

El término « pronóstico » significa la evaluación del riesgo de empeoramiento y de sus consecuencias.

El término « valor control » se refiere a un valor basal que corresponde a la media de los valores obtenidos con la muestra biológica de sujetos sanos, no afectados por una ScS o una HTAP o una enfermedad susceptible de provocar una HTAP. Se puede tratar de un valor estadístico de referencia.

5 Para evaluar la evolución de la patología, puede ser útil someter a ensayo a un paciente y controlar el efecto de un tratamiento o la evolución de la patología, sometiendo de nuevo a ensayo al paciente, por ejemplo con varios meses de intervalo. En este caso, los resultados de la segunda prueba se comparan con los resultados de la primera prueba, y también frecuentemente con el valor denominado « control ».

10 Una cantidad de anticuerpos « superior al valor control » significa generalmente un aumento estadísticamente significativo, por ejemplo de al menos dos desviaciones estándar por encima de la media de las densidades ópticas de las reactividades de IgG del conjunto de los sujetos sanos.

15 Por « antígeno de captura », se entiende un antígeno, con preferencia fijado a una base sólida, que es capaz de retener dicho al menos un anticuerpo, presente en una muestra biológica, por unión por afinidad. El antígeno de captura puede ser marcado. El término « marcado » se refiere también tanto a un marcaje directo (por medio de enzimas, radioisótopos, fluorocromos, compuestos luminiscentes, etc.) como a un marcaje indirecto (por ejemplo, por medio de anticuerpos marcados ellos mismos de manera directa o con la ayuda de reactivos de una " pareja de afinidad " marcada, tal como, pero no exclusivamente, la pareja avidina marcada-biotina, etc.).

Anticuerpos identificados:

Como se indica en la sección « Ejemplos », los inventores han identificado varios anticuerpos anti-CMLV en los enfermos que tienen una ScS con o sin HTAP, o que tienen una HTAPi.

20 La detección y/o la cuantificación de estos anticuerpos se pueden utilizar para detectar una ScS y/o una HTAP, para realizar el pronóstico o el seguimiento de estas patologías, o para evaluar la eficacia de un tratamiento contra estas patologías.

25 Los antígenos reconocidos por los anticuerpos identificados se enumeran más adelante. El nombre y los números de acceso que corresponden a estos antígenos en la base de datos de secuencias proteicas SWISSPROT se dan en las tablas 1 y 2 de la sección « Ejemplos ».

30 Los inventores han caracterizado varias reactividades contra las CMLV en los sueros de pacientes que no se encuentran en los sueros de sujetos sanos. Los anticuerpos identificados son los anticuerpos anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa, anti-caldesmona, anti-proteína FAM10A4, anti-zixina, anti-galectina 1, anti-precursor A3 de la proteína disulfuro-isomerasa, anti-desmina, anti-periferina, anti-ribonucleoproteína H nuclear heterogénea, anti-cadena beta de la tubulina y anti-polimerasa I y factor de liberación de transcripción. En un modo particular de realización, el procedimiento descrito en este documento comprende la determinación de la presencia de al menos un anticuerpo elegido del grupo constituido por los anticuerpos anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa, anti-caldesmona, anti-proteína FAM10A4, anti-zixina, anti-galectina 1, anti-precursor A3 de la proteína disulfuro-isomerasa, anti-desmina, anti-periferina, anti-ribonucleoproteína H nuclear heterogénea, anti-cadena beta de la tubulina y anti-polimerasa I y factor de liberación de transcripción en una muestra biológica procedente de un paciente, siendo indicativa la presencia de dicho al menos un anticuerpo, de una esclerodermia sistémica y/o de una hipertensión arterial pulmonar o de un riesgo de desarrollar una esclerodermia sistémica y/o una hipertensión arterial pulmonar.

40 Los inventores han caracterizado igualmente varias reactividades que tienen una intensidad significativamente mayor en los pacientes que en los sujetos sanos. Estas reactividades corresponden a los anticuerpos anti-vimentina, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, anti- $\alpha$ -enolasa, anti-triosafosfato isomerasa, anti-precursor de la albúmina sérica, anti-Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina, anti-actina citoplásmica 2, anti-peroxiredoxina-6, anti-proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far (o anti-proteína 2) anti-precursor de la reticulocabina-1, anti- $\gamma$ -enolasa, anti-precursor mitocondrial de la peróxido reductasa dependiente de la tioredoxina, anti-proteína de activación de GTPasa específica de Ran y anti-proteína B1 del grupo de alta movilidad. En un modo particular de realización, los anticuerpos que corresponden a las reactividades que tienen mayor intensidad en los pacientes que en los sujetos sanos se utilizan en un procedimiento descrito en este documento que comprende la comparación de la cantidad de al menos un anticuerpo elegido del grupo constituido por los anticuerpos anti-vimentina, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, anti- $\alpha$ -enolasa, anti-triosafosfato isomerasa, anti-precursor de la albúmina sérica, anti-Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina, anti-actina citoplásmica 2, anti-peroxiredoxina-6, anti-proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far (o anti-proteína 2) anti-precursor de la reticulocabina-1, anti- $\gamma$ -enolasa, anti-precursor mitocondrial de la peróxido reductasa dependiente de la tioredoxina, anti-proteína de activación de GTPasa específica de Ran y anti-proteína B1 del grupo de alta movilidad en una muestra biológica procedente de un paciente, con un valor control, siendo indicativa la presencia de dicho al menos un anticuerpo en una cantidad superior al valor control, de una esclerodermia sistémica y/o de una hipertensión arterial pulmonar o de un riesgo de desarrollar una esclerodermia sistémica y/o una hipertensión arterial pulmonar.

La invención se refiere por tanto a la utilización de al menos un anticuerpo dirigido contra las CMLV, en un procedimiento, con preferencia *in vitro*, de detección de una ScS y/o de una HTAP.

- Con preferencia, los anticuerpos dirigidos contra las CMLV utilizados en los procedimientos descritos, se eligen del grupo constituido por los anticuerpos anti-precursor de la albúmina sérica, anti-zixina, anti-galectina-1, anti-Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina, anti-caldesmona, anti-proteína FAM10A4, anti-proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far, anti-actina citoplásmica 2, anti- $\gamma$ -enolasa, anti-precursor A3 de la proteína disulfuro-isomerasa, anti-desmina, anti-periferina, anti-ribonucleoproteína H nuclear heterogénea, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, anti-triosafosfato isomerasa, anti-peroxiredoxina-6, anti-reticulocabina-1, anti-peroxiredoxina-2, anti-precursor mitocondrial de la peróxido reductasa dependiente de la tioredoxina, anti-proteína de activación de GTPasa específica de Ran, anti-proteína B1 del grupo de alta movilidad, anti-cadena beta de la tubulina y anti-polimerasa I y factor de liberación de transcripción.
- En un modo particular de realización, los anticuerpos dirigidos contra las CLMV utilizados en los procedimientos descritos, se eligen del grupo constituido por los anticuerpos anti-precursor de la albúmina sérica, anti-zixina, anti-galectina-1, anti-Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina, anti-caldesmona, anti-proteína FAM10A4, anti-proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far, anti-actina citoplásmica 2, anti- $\gamma$ -enolasa, anti-precursor A3 de la proteína disulfuro-isomerasa, anti-desmina, anti-periferina, anti-ribonucleoproteína H nuclear heterogénea, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, anti-triosafosfato isomerasa, anti-peroxiredoxina-6 y anti-reticulocabina-1.
- Los anticuerpos identificados por los inventores se pueden utilizar en los procedimientos descritos solos o en combinación. La detección y/o la cuantificación se pueden realizar con respecto a uno solo de los anticuerpos identificados, o pueden implicar a una pluralidad de anticuerpos. Se puede componer así la realización del procedimiento sobre un soporte sólido, por ejemplo una microplaca, sobre la cual se disponen de manera definida y ordenada los antígenos que corresponden a la pluralidad de anticuerpos a detectar y/o cuantificar.
- Según un modo de realización de la invención, los procedimientos descritos utilizan la detección de un anticuerpo anti-galectina 1 o anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés.
- Según un modo de realización de la invención, los procedimientos descritos utilizan la detección de un anticuerpo anti-galectina 1 para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la ScS. En efecto, los inventores han podido demostrar que este anticuerpo es específico de la ScS, teniendo en cuenta su presencia en los sueros de pacientes de ScS con o sin HTAP asociada, y su ausencia en los sueros de pacientes que sufren de HTAPi.
- Según otro modo de realización de la invención, los procedimientos descritos utilizan la detección de un anticuerpo anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la ScS o de la HTAPi.
- Según otro modo de realización de la invención, los procedimientos descritos utilizan la detección de un anticuerpo anti-proteína FAM10A4 para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la HTAP, ya sea idiopática o asociada a una ScS.
- Valoración de los anticuerpos:
- La muestra biológica es con preferencia una muestra de suero, con preferencia diluido 1/100, o más, por ejemplo 1/200 o 1/400.
- De manera ventajosa, la cantidad de anticuerpos se puede determinar mediante un inmunoensayo.
- La muestra biológica se puede tratar opcionalmente en una etapa preliminar, o se puede poner directamente en presencia de al menos un antígeno de captura.
- El procedimiento según la invención se puede realizar según diversos formatos bien conocidos por los expertos en la técnica: en fase sólida o en fase homogénea; en un tiempo o en dos tiempos; en método competitivo, a título de ejemplos no limitativos.
- Según un modo de realización preferido, el antígeno de captura se inmoviliza sobre una fase sólida. Se pueden utilizar, a título de ejemplos no limitativos de fase sólida, las microplacas, especialmente microplacas de poliestireno, tales como las comercializadas por la empresa Nunc, Dinamarca. También se pueden utilizar partículas o perlas sólidas, perlas paramagnéticas, tales como las suministradas por Dynal o Merck-Eurolab (Francia) (bajo la marca Estapor™) o también tubos de ensayo de poliestireno o polipropileno, etc.
- Es igualmente posible un formato de inmunoensayo para la detección de anticuerpos por competición. También son posibles otras modalidades de inmunoensayo y son bien conocidas por los expertos en la técnica.
- Las valoraciones por ELISA, radioinmunoensayos, o cualquier otra técnica de detección se pueden utilizar para revelar la presencia de los complejos de antígeno-anticuerpo formados.
- Según un modo particular de realización preferido, el antígeno de captura corresponde a una proteína completa o a un fragmento de dicha proteína. Por ejemplo, el procedimiento de la invención comprende poner en contacto una muestra biológica con una proteína completa reconocida por el anticuerpo que se va a detectar y/o cuantificar. A

título ilustrativo, la invención comprende poner en contacto una muestra de sangre o de suero con la galectina 1 o la fosfoproteína 1 inducida por el estrés completa, para la detección y/o la cuantificación de los anticuerpos anti-galectina o anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, en dicha muestra.

5 En un ejemplo particular, el antígeno de captura se puede acoplar a una glutatión S transferasa (GST), antes de ser depositado sobre una microplaca.

A título ilustrativo, las muestras de suero que se van a someter a ensayo, por ejemplo, diluidas 1/100, se incuban sobre la microplaca. Después de lavado, se añaden anticuerpos anti-Fc $\gamma$  humanos marcados (por ejemplo, con una fosfatasa alcalina), siendo revelados los complejos (por ejemplo, mediante la adición de un sustrato de la fosfatasa cuya escisión se puede detectar mediante la lectura de la absorbancia).

10 Pacientes diana:

Los pacientes diana son aquellos susceptibles de desarrollar una ScS y/o una HTAP.

Se puede tratar de un paciente que sufre una HTAP asociada a una conectivitis, tal como una esclerodermia sistémica, al síndrome de Sharp (que es una conectivitis mixta), o a un lupus eritematoso sistémico.

El paciente puede sufrir igualmente una HTAP idiopática o familiar.

15 Más generalmente, todo paciente afectado de una enfermedad vascular pulmonar puede ser sometido de forma ventajosa al procedimiento de detección de una HTAP tal como se define en la invención.

Además, la HTAP detectada puede ser también una hipertensión porto-pulmonar (es decir una HTAP asociada a una hipertensión portal), o estar asociada a una cardiopatía congénita, o a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o también puede ser una hipertensión pulmonar post-embólica, que complica la evolución de una bronquitis crónica obstructiva o de una cardiopatía cianógena.

20 Otros pacientes diana son los expuestos a ciertos medicamentos supresores del apetito como la fenfluramina cuya prescripción puede contribuir a la aparición de una HTAP.

Otros pacientes diana son los expuestos a ciertos medicamentos supresores del apetito como la fenfluramina cuya prescripción puede contribuir a la aparición de una HTAP.

25 Otras personas susceptibles de beneficiarse de este tipo de ensayo son las portadoras de una mutación en el gen que codifica BMPRII, endoglin o ALK1, y que eventualmente no presentan HTAP detectable en la ecografía, con el fin de detectar los individuos susceptibles de desarrollar posteriormente una HTAP.

Evaluación de la eficacia de un tratamiento:

Otro objeto de este documento es un procedimiento *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento contra una ScS y/o una HTAP, que comprende la determinación de la presencia y/o de la cantidad de al menos un anticuerpo tal como se ha definido antes en una muestra biológica procedente de un paciente, a diferentes tiempos antes, en el curso de o después del tratamiento, siendo indicativa de una mejoría de la ScS o de la HTAP, la disminución de la cantidad de dicho al menos un anticuerpo a lo largo del tiempo.

30 Otro objeto de este documento es un procedimiento *in vitro* de evaluación de la eficacia de un tratamiento contra una ScS y/o una HTAP, que comprende la determinación de la presencia y/o de la cantidad de al menos un anticuerpo tal como se ha definido antes en una muestra biológica procedente de un paciente, a diferentes tiempos antes, en el curso de o después del tratamiento, siendo indicativa de una mejoría de la ScS o de la HTAP, la disminución de la cantidad de dicho al menos un anticuerpo a lo largo del tiempo.

El tratamiento clásico actual de la HTAP asocia un tratamiento sintomático y un tratamiento vasodilatador. El tratamiento sintomático asocia anti-coagulantes, una oxigenoterapia y diuréticos. El tratamiento vasodilatador se apoya sobre las siguientes moléculas: bloqueadores de los canales de calcio, epoprostenol (prostaciclina) prescrito por vía intravenosa en perfusión continua, los inhibidores de los receptores de la endotelina, selectivos o no, en particular el bosentán, el sitaxentán y el ambrisentán, los inhibidores de las fosfodiesterasas de tipo 5 en particular el sildenafil, el taladafil, siendo administrado el conjunto de estos medicamentos por vía oral, y el iloprost inhalado, análogo de la prostaciclina, administrado por inhalación. Estos tratamientos se pueden combinar opcionalmente. En caso de fracaso de estas terapias, se puede proponer un trasplante pulmonar o de corazón-pulmones. En el curso de la ScS es clásico prescribir vasodilatadores, en primer lugar los inhibidores cálcicos en el tratamiento del fenómeno de Raynaud, los inhibidores de la bomba de protones y un procinético, la domperidona, en el tratamiento del reflujo gastro-esofágico. Los otros tratamientos dependen de las afecciones presentadas por el paciente: colchicina o corticoides en dosis bajas en caso de afección articular inflamatoria, inhibidores de la enzima de conversión en caso de crisis renal, ciclofosfamida en caso de neumopatía infiltrante difusa evolutiva, tratamiento vasodilatador de una hipertensión arterial pulmonar.

35 El tratamiento clásico actual de la HTAP asocia un tratamiento sintomático y un tratamiento vasodilatador. El tratamiento sintomático asocia anti-coagulantes, una oxigenoterapia y diuréticos. El tratamiento vasodilatador se apoya sobre las siguientes moléculas: bloqueadores de los canales de calcio, epoprostenol (prostaciclina) prescrito por vía intravenosa en perfusión continua, los inhibidores de los receptores de la endotelina, selectivos o no, en particular el bosentán, el sitaxentán y el ambrisentán, los inhibidores de las fosfodiesterasas de tipo 5 en particular el sildenafil, el taladafil, siendo administrado el conjunto de estos medicamentos por vía oral, y el iloprost inhalado, análogo de la prostaciclina, administrado por inhalación. Estos tratamientos se pueden combinar opcionalmente. En caso de fracaso de estas terapias, se puede proponer un trasplante pulmonar o de corazón-pulmones. En el curso de la ScS es clásico prescribir vasodilatadores, en primer lugar los inhibidores cálcicos en el tratamiento del fenómeno de Raynaud, los inhibidores de la bomba de protones y un procinético, la domperidona, en el tratamiento del reflujo gastro-esofágico. Los otros tratamientos dependen de las afecciones presentadas por el paciente: colchicina o corticoides en dosis bajas en caso de afección articular inflamatoria, inhibidores de la enzima de conversión en caso de crisis renal, ciclofosfamida en caso de neumopatía infiltrante difusa evolutiva, tratamiento vasodilatador de una hipertensión arterial pulmonar.

Las figuras y ejemplos que siguen ilustran la invención sin limitar su alcance.

### Leyendas de las figuras

La figura 1 corresponde a una inmunotransferencia en una dimensión que muestra las reactividades de las IgG séricas de pacientes esclerodérmicos con HTAP (n=3) o sin HTAP (n=6), de pacientes que tienen una HTAP idiopática (n=6) y de sujetos sanos (n=4) con respecto a las proteínas de células musculares lisas vasculares. La HTAP estaba documentada por cateterismo derecho en el conjunto de los pacientes. ScS: esclerodermia sistémica; HTAP: hipertensión arterial pulmonar; HTAPi: hipertensión arterial pulmonar idiopática; HTAP-ScS: hipertensión

arterial pulmonar asociada a una esclerodermia; C: control interno (HTAP-ScS); PBS: solución salina tamponada con fosfato.

5 La figura 2 corresponde a un gel de referencia en dos dimensiones de un extracto proteico total de células musculares lisas vasculares, teñido con nitrato de plata. La primera dimensión (eje horizontal): pH 3-10, segunda dimensión (eje vertical): gradiente de acrilamida 7-18 %, permiten el recuento de 880 manchas proteicas.

La figura 3 es un gráfico que muestra el número de manchas proteicas reconocidas por las IgG de 15 conjuntos de 3 sueros de pacientes fenotípicamente idénticos que tienen una esclerodermia sistémica y/o una HTAP y por un conjunto de 12 sujetos sanos después de ajuste sobre el gel de referencia. La escala de las ordenadas indica el número de reactividades de IgG.

10 La figura 4 muestra la proporción de las manchas de reactividad reconocidas por las IgG de los sueros de los conjuntos de 3 pacientes en el seno de cada grupo (reconocidas o no por los sujetos sanos). 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 %: número de manchas proteicas reconocidas respectivamente por 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 5/5 de los conjuntos de pacientes en un grupo dado.

15 La figura 5 representa el número de manchas reconocidas por las IgG de los sueros de los conjuntos de pacientes de cada grupo y no reconocidas por los sueros de los sujetos sanos. 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 %: número de manchas proteicas reconocidas respectivamente por 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, 5/5 de los conjuntos de pacientes en un grupo dado.

20 La figura 6 muestra la localización de las manchas proteicas candidatos sobre el gel de electroforesis en dos dimensiones de un extracto proteico total de células musculares lisas vasculares, teñido con nitrato de plata. Primera dimensión (eje horizontal): pH 3-10, segunda dimensión (eje vertical): gradiente de acrilamida 7-18 %.

25 La figura 7 muestra la intensidad de las reactividades de las IgG de los 15 conjuntos de 3 sueros de pacientes y del conjunto de sueros de sujetos sanos dirigidas contra la  $\alpha$ -enolasa y la fosfoproteína 1 inducida por el estrés sobre membranas de PVDF de los diferentes grupos de enfermos. La zona de membrana de PVDF representada para cada uno de los grupos corresponde a un pHi comprendido entre 6,6 y 7,9 y pesos moleculares comprendidos entre 51 y 70 kDa.

30 La figura 8 es una representación gráfica de la detección de anticuerpos anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés (stress induced phosphoprotein 1 o STIP1) por ELISA en los sueros de pacientes que sufren una ScS, una HTAPi, una HTAP asociada a una ScS y en los sueros de sujetos controles sanos (HC). Los datos registrados corresponden a la densidad óptica de las proteínas a 405 nm (DO405), habiéndose restado el ruido de fondo (DO405 del tampón de bicarbonato). Cada punto representa la reactividad de una muestra de suero. Las barras horizontales únicas indican la media y las barras horizontales dobles indican la desviación estándar. Las muestras se consideran positivas cuando la densidad óptica es superior o igual a la media + 2 desviaciones estándar del control (2 et).

35 La figura 9 muestra el efecto del suero y de las IgG purificadas de pacientes que tienen una ScS, una ScS-HTAP o una HTAPi, sobre la contracción de una matriz de colágeno por las CMLV de la aorta. Se ha seguido durante 4 días la contracción de matrices de colágeno sembradas con las CMLV, en presencia de SVF (suero de ternera fetal), de suero, o de IgG purificadas de pacientes que tienen una ScS, ScS-HTAP, o una HTAPi. A: fotografías de 4 matrices que corresponden a las 4 condiciones patológicas, incubadas con el suero (A1) o con las IgG purificadas (A2), en los días 0 y 4 (J0 y J4). B: representación gráfica de la cinética de contracción de matrices de colágeno incubadas con el suero (A1) o con las IgG purificadas (A2) de pacientes ScS, ScS-HTAP o HTAPi, o de sujetos sanos emparejados. Para cada condición, se han utilizado 10 sueros o IgG purificadas. <sup>\*</sup>Sueros: Sanos/ScS p = 0,012; IgG purificadas Sanos/HTAPi p = 0,001.

45 La figura 10 muestra el efecto del suero y de las IgG purificadas de pacientes que tienen una ScS, una ScS-HTAP, o una HTAPi, sobre la contracción de una matriz de colágeno por las CMLV activadas por el TNF- $\alpha$ . La contracción de matrices de colágeno sembradas con las CMLV se ha seguido durante dos días (sueros) o tres días (IgG purificadas), en presencia de SVF, de suero, o de IgG purificadas de pacientes que tienen una ScS, una ScS-HTAP, o una HTAPi. A: fotografías de 4 matrices que corresponden a las 4 condiciones patológicas, incubadas con el suero (A1) o con las IgG purificadas (A2), los días 0 y 2 (suero) o el día 3 (IgG purificadas). B: representación gráfica de la cinética de contracción de matrices de colágeno incubadas con el suero (B1) o con las IgG purificadas (B2) de pacientes ScS, ScS-HTAP o HTAPi, o de sujetos sanos emparejados. Para cada condición, se han utilizado 10 sueros o IgG purificadas. <sup>\*</sup>Sanos/HTAPi p = 0,001; Sanos/ScS-HTAP p = 0,029

#### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

#### Sueros

55 Los inventores han utilizado los sueros de pacientes que tienen una HTAPi o una ScS con o sin HTAP. La HTAP era detectada por una ecografía cardiaca trans-torácica y confirmada por un cateterismo derecho. Los pacientes

esclerodérmicos respondían a los criterios de la Asociación Americana de Reumatología (ARA) y/o a los criterios de Leroy y Medsger. Los sueros se recogían y conservaban a -80 °C antes de su utilización. Todos los pacientes habían firmado un consentimiento informado en el marco del estudio de HTAP-Ig (Contrato de Investigación y de Investigación Clínica 2005 N° CRC 05066, promotor Assistance Publique-Hôpitaux de Paris).

- 5 En un primer tiempo los sueros de 15 pacientes que tienen una HTAPi, 15 pacientes que tienen una HTAP-ScS, 15 pacientes que tienen una ScS sin HTAP y de 12 sujetos sanos, han sido sometidos a ensayo en experimentos de inmunotransferencia 1D (1 dimensión). En un segundo tiempo, los mismos sueros han sido sometidos a ensayo en la forma de conjuntos de 3 sueros de pacientes que tienen un fenotipo similar. Un conjunto de 12 sueros de sujetos sanos, diferentes de los utilizados en 1D se ha utilizado como testigo en los experimentos de inmunotransferencia en
- 10 2D (2 dimensiones).

#### Células

- Las CMLV humanas obtenidas a partir de las arterias mamarias en los pacientes que han sufrido un puente aortocoronario han sido proporcionadas por el Dr. Babett Weksler (Institut Cochin, Paris). Estas células han sido
- 15 immortalizadas después de la transducción secuencial lentiviral de la subunidad catalítica de la holoenzima humana telomerasa transcriptasa inversa y del antígeno T del poliomavirus SV40 (Virus del simio 40) en un cultivo primario de CMLV adultas (Weksler *et al.*, 2005). Estas células han sido cultivadas en frascos de 175 cm<sup>2</sup> en el medio de cultivo Medio 2 de crecimiento de células del músculo liso (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado con 5 % de suero de ternera fetal descomplementado (SVF), 0,5 ng/ml de Factor de crecimiento epitelial (EGF), 2 ng/ml de Factor de crecimiento de fibroblastos básico, 5 µg/ml de insulina, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de ciprofloxacino. Estas células han sido utilizadas para los experimentos de inmunotransferencia en 1D y 2D.
- 20

Las CMLV de aorta humana (Cambrex) han sido utilizadas en los experimentos que evalúan el efecto del suero y de las IgG purificadas de pacientes que tienen una ScS, una ScS-HTAP, o una HTAPi, sobre la contracción de una matriz de colágeno por las CMLV no activadas o activadas por el TNF-α

#### Extracción de las proteínas

- 25 Electroforesis en una dimensión

- Las CMLV llegadas a la confluencia se despegaban con tripsina, se lavaban con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se centrifugaban a 1600 rpm. a 20 °C. El sedimento celular se recuperaba a continuación en un tampón que contiene dodecilsulfato de sodio al 2 % (SDS), Tris 62,5 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol al 5 % en presencia de inhibidores de proteasas: 1 µg/ml de pepstatina, de aprotinina, de leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF). Se sometía enseguida la mezcla a sonicación en 4 ciclos de 30 segundos en hielo
- 30 a 4 °C a una potencia de 25 W y después se calentaba durante 10 min a 100 °C. Los extractos proteicos eran divididos seguidamente en alícuotas y conservados a -80 °C hasta utilización.

#### Electroforesis en dos dimensiones

- Las CMLV llegadas a la confluencia se lavaban 2 veces en PBS desprovisto de Mg<sup>2+</sup> y de Ca<sup>2+</sup>, después se despegaban y se recuperaban en una solución isotónica en ausencia de la enzima que contiene agentes quelantes como EDTA (tampón de disociación de células libre de enzimas basado en PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se recogían las células y después se centrifugaban durante 5 min a 1300 rpm a 20 °C. Después de un lavado en una solución isotónica de NaCl, se realizaba una segunda centrifugación. Después de haber repetido esta operación por segunda vez, el sedimento celular se congelaba a -80 °C en presencia de PMSF 1 mM y de un cóctel
- 40 de inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche Diagnóstico, Meylan, Francia).

- En un segundo tiempo, las proteínas se extraían después de tres sonicaciones de 30 s cada una a 4 °C en un tampón compuesto de urea 5 M, tiourea 2 M, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) al 2 %, Tris 40 mM y anfólitos Bio-Lyte 3/10 al 0,2 % (ReadyPrep Sequential Extraction Reagent 3, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). A continuación se realizaban dos ultracentrifugaciones a 150 000 g durante 25 min cada una a 4 °C (Optima LE-80K, Beckman, Fullerton, CA, Estados Unidos). Con el fin de evitar la perturbación artefactual del ADN liberado a lo largo de la sonicación, se realizaba una congelación a -80 °C con el fin de hacer precipitar el ADN. El extracto se descongelaba a continuación, se centrifugaba y se recuperaba el sobrenadante. Finalmente, se medía la concentración en proteínas por el método de Lowry (RC DC Protein Assay, Bio-Rad, Richmond, Estados Unidos). Se añadía ditiotreitól (DTT) al extracto a una concentración final 64 mM antes de la congelación a -80 °C.
- 45

- 50 Inmunotransferencia 1D

#### Separación de las proteínas por electroforesis monodimensional

- Las proteínas de la muestra eran separadas según su peso molecular (PM) sobre geles de poliacrilamida desnaturizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) con acrilamida al 10 % (acrilamida al 10 %, bisacrilamida al 0,27 %, Tris/HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 0,1 %, persulfato de amonio al 0,1 %, 0,04 % de tetrametiletildiamina (TEMED) (Biorad, Hercules, CA, Estados Unidos)). Se depositaban ciento veinte microlitros de proteínas en lo alto
- 55



de cada gel y se efectuaba la migración en un tampón de migración (Tris /HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 %) a 25 mA por gel en amperaje constante con un dispositivo mini-PROTEAN III (Bio Rad) durante aproximadamente 50 min.

Electrotransferencia a partir de geles en una dimensión

- 5 Les proteínas así separadas se transferían del gel sobre una membrana de nitrocelulosa (Immuntics Inc., Boston, Massachusetts, Estados Unidos) gracias a un módulo de electrotransferencia semi-seco (Semi Dry Electroblotter A ANCOS, Hoejby, Dinamarca) durante 1 h a 50 mA por módulo de transferencia. Las membranas eran bloqueadas a continuación durante 1 h 30 min en el PBS-Tween 20 al 0,2 % (Sigma) e incubadas durante toda la noche en presencia de sueros que pertenecen a uno de los tres grupos siguientes: ScS asociada o no a una HTAP, HTAPi.
- 10 Los sueros de 12 sujetos sanos eran utilizados como controles y el PBS-Tween al 0,2 % solo sin Ac era utilizado como testigo negativo.. Cada suero de pacientes se diluía a 1/2 en el PBS-Tween al 0,2 % y los sueros de sujetos sanos se diluían a 1/100.

- Después de 5 lavados cortos de 20 s y 5 lavados largos de 5 min en una solución de PBS-Tween al 0,2 %, las membranas eran incubadas durante 1 h 30 min a 20 °C con un Ac secundario anti-IgG humanas específico del fragmento Fcy humano (Ac anti-Fcy humano) conjugado con la fosfatasa alcalina (Dako, Glostrup, Dinamarca).
- 15 Después de 5 lavados cortos y 1 lavado largo en PBS-Tween al 0,2 %, las membranas han sido lavadas en una solución salina tamponada con Tris (TBS: Tris 24 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 18,6 mM, pH 8) y las reactividades eran reveladas con ayuda del sustrato de la fosfatasa alcalina (bromo-cloro-indolil-fosfato y nitroazul de tetrazolio (Sigma)) en un tampón que contiene Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl 2 5 mM (VWR internacional). La reacción se paraba por los lavados con agua bidestilada, y las membranas se secaban y después se sometían a un barrido con ayuda de un escáner de alta resolución (Perfection 12008 Seiko Epson Corporation, Hirooka, Japón).
- 20

Inmunotransferencia 2D

Isoelectroenfoque (IEF)

- El isoelectroenfoque permite la separación de las proteínas según su pH isoelectrónico (pHi). Esta etapa se realizaba en gradiente de pH inmovilizado (IPG), es decir que se llevaba a cabo sobre un gel de acrilamida vertido sobre una banda rígida (tira) en la que se había preformado un gradiente de pH, aquí, un gradiente de 3 a 10 (ReadyStrip 17 cm, pH 3-10, Bio-Rad). Las bandas eran colocadas en una cuba horizontal Bio-Rad tipo célula Protean IEF a temperatura ambiente. Cada banda se colocaba en una ranura en presencia de una mezcla que contiene tampón de rehidratación y 100 µg de extractos proteicos de CMLV; era recubierto todo con 2 ml de aceite mineral con el fin de limitar la evaporación. El tampón de rehidratación estaba constituido por urea de alta pureza 7 M (VWR, Fontenay-Sous-Bois, Francia), tiourea 2 M (Sigma), CHAPS al 4 % (Sigma), triton X100 al 0,002 % (Sigma), DTT (Sigma), azul de bromofenol, y anfolitos Pharmalytes 3-10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).
- 25
- 30

- El isoelectroenfoque comprendía una hidratación pasiva de 9 h seguida de una hidratación activa de 12 h de las bandas bajo una tensión de 50 V. A continuación, se realizaba el isoelectroenfoque como sigue: 1 h a 200 V (eliminación del exceso de sales), después subida lineal de la tensión durante 1 h hasta 1000 V, después durante 6 h hasta 10.000 V y después durante 1 h hasta 10.000 V.
- 35

Separación de las proteínas en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

- Esta segunda etapa permitía la separación de las proteínas según su peso molecular (PM). Doce geles de 20 x 20 x 0,1 cm con un gradiente de acrilamida de 7 a 18,5 % eran vertidos simultáneamente en una cuba multi-geles (Protean Plus Multi-Casting Chamber, Bio- Rad) asegurando una reproductibilidad óptima y permitiendo la separación de proteínas con un PM comprendido entre 10 y 250 kDa. Antes de realizar la segunda dimensión, las bandas obtenidas al final de la etapa precedente eran puestas en presencia de 2 tampones de equilibrio con el fin de reducir y alcalinizar los grupos sulfhidrilo de las cisteínas. El primer tampón de equilibrio se componía de Tris 50 mM, urea 6 mM, glicerol al 40 %, SDS 52 mM y DTT 32,4 mM. El segundo tampón estaba compuesto de Tris 50 mM, urea 6 mM, glicerol al 40 %, SDS 52 mM y yodoacetamida 86,5 mM. A continuación, las bandas se mantenían en contacto con los geles de acrilamida en una solución de agarosa al 1 % (Agarosa de bajo punto de fusión ultrapura, Gibco BRL Invitrogen) que contiene azul de bromofenol para seguir el frente de la migración. Se habían dispuesto marcadores de PM a ambas partes de la banda. La migración duraba alrededor de 30 h en un tampón de migración (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM, tiosulfato de sodio 1,25 mM (Sigma)) mantenido a 10 °C (Cuve Protean Plus Dodeca Cell Bio-Rad, Cryostat MultiTemp III Amersham Biosciences) a amperaje constante; 40 V durante 1 h después 80 V durante 1 h y finalmente 15 mA/gel hasta que el frente de migración se había salido de los geles.
- 40
- 45
- 50

Al final de la migración en la segunda dimensión, 11 geles eran transferidos sobre las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (membranas de transferencia Immobilon-P, poros de 0,45 µm, Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos), mientras que el último gel era teñido con nitrato de plata.

55

## Electrotransferencia

La transferencia semiseca se efectuaba a 4 °C durante 1 h 30 min a amperaje constante (320 mA). Al final de la transferencia, las membranas se sumergían durante 5 min en una solución de PBS compuesta de NaCl 148 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 17,6 mM, y después se secaban.

## 5 Tinción de los geles no transferidos

El gel no transferido (llamado también gel de referencia) se teñía con nitrato de plata (Rabilloud *et al.*, 1990) en 5 etapas; fijación (etanol absoluto al 30 %, ácido acético al 5 %), lavado (nitrato de plata 11,8 mM (Sigma), formaldehído 3,45 mM (Sigma), tinción (nitrato de plata al 0,02 %) y finalmente revelado (formaldehído al 37 %, carbonato de sodio, tiosulfato). El gel era conservado a continuación en una solución de conservación (dimetilsulfóxido al 2 % (Sigma), ácido acético al 10 % antes de ser barrido con ayuda de un densitómetro (GS-800, Bio-Rad).

## Incubación de las membranas de PVDF con los sueros y revelado de las reactividades

Las membranas de PVDF inicialmente bloqueadas con PBS-Tween al 0,2 % se incubaban toda la noche en presencia de sueros de pacientes que pertenecen a uno de los tres grupos descritos precedentemente: HTAPi, HTAP-ScS o ScS sin HTAP. Para cada membrana, se utilizaba un conjunto de tres sueros que pertenecen a un mismo grupo diluido a 1/100 en una solución de PBS-Tween al 0,2 %. Para cada experimento, se incubaba una membrana con un conjunto de 12 sueros de sujetos sanos diluido en el mismo tampón a 1/100. El revelado de las reactividades se efectuaba como precedentemente en el caso de la inmunotransferencia 1D (Ac anti-Fcγ humano conjugado con fosfatasa alcalina, revelado de las reactividades con ayuda del sustrato de la fosfatasa alcalina) después se secaban las membranas y se fotografiaban con ayuda de un densitómetro (GS-800, Bio-Rad). Las membranas se teñían a continuación con oro coloidal (Protogold®, BioCell, Cardiff, GB) con el fin de revelar el conjunto de las proteínas transferidas a la superficie de las membranas. A continuación se efectuaba una nueva adquisición densitométrica.

## Análisis informático

El análisis informático de los geles y membranas era realizado con ayuda de un programa concebido especialmente para el análisis de los geles bidimensionales (Image Master 2D® Platinum 6.0, Buckinghamshire, Inglaterra). La primera etapa consistía en una detección automática de las manchas proteicas en función de los parámetros que se han elegido (número de operaciones efectuadas para eliminar el ruido de fondo, umbral Laplacien y superficie mínima de las manchas a detectar). Las manchas detectadas se controlaban visualmente con ayuda de procedimientos de reconstrucción en 3 dimensiones, con el fin de eliminar los falsos positivos y ver las manchas de reactividad no detectadas por el programa. A continuación, cada mancha proteica reconocida por las IgG de un individuo era emparejada con la proteína correspondiente con ayuda de la fotografía densitométrica de la misma membrana realizada después de la tinción con oro coloidal. Esta etapa se realizaba para cada una de las 16 membranas. Finalmente, las proteínas transferidas sobre las membranas se emparejaban con las proteínas del gel elegido como gel de referencia. Esto permitía recoger todas las informaciones sobre el gel de referencia y poder comparar a continuación las manchas proteicas reconocidas por los sujetos sanos y por los pacientes en el seno de los diferentes grupos estudiados.

## Espectrometría de masas

Las manchas proteicas reconocidas como dianas antigénicas eran extraídas por taladro de un nuevo gel de acrilamida cargado con 400 µg de extractos proteicos y coloreado con azul de Coomassie. Cada mancha extraída era colocada en el pocillo de una placa de 96 pocillos y digerida en presencia de tripsina (Promega, Francia) durante toda una noche. Las muestras digeridas eran transferidas seguidamente a otra placa de 96 pocillos depositada después a 4 °C antes del análisis por espectrometría de masas tipo 'Desorción-ionización mediante láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo' (MALDI- TOF) (PerSeptive Biosystems Framingham, MA, Estados Unidos).

## 45 Valoración de anticuerpos anti-STIP1 por ELISA

La fosfoproteína 1 inducida por el estrés (STIP1) ha sido obtenida de la sociedad Tebu-bio (Tebu-bio, Maryland, USA), se ha diluido en un tampón de bicarbonato y se ha depositado sobre placas de 96 pocillos (Maxisorb, NalgeNunc Int. Rochester, NY, USA) a una concentración final de 3 µg/mL a 4 °C. La reactividad de las IgG séricas obtenidas a partir de 75 pacientes esclerodérmicos sin HTAP, 74 afectados de HTAPi, 37 pacientes esclerodérmicos con HTAP (ScS-HTAP), y 70 sujetos sanos (HC) ha sido analizada por ELISA contra STIP-1. Los pocillos han sido lavados cinco veces con tampón fosfato (PBS) y bloqueados con ayuda de una solución PBS-seroalbúmina bovina al 1 % durante una hora a 37 °C. Los sueros han sido diluidos a 1/100 en PBS, introducidos por duplicado e incubados durante una hora a temperatura ambiente. Anticuerpos policlonales de ratones anti-STIP-1 (Tebu-bio, Maryland, USA) han sido diluidos a 1/500 y utilizados como control positivo. Las placas se han lavado como se ha mencionado antes, y los anticuerpos de conejo anti-Fcγ humano conjugados con fosfatasa alcalina (Tebu-bio, Maryland, USA; diluidos a 1/1000), con los anticuerpos de asno anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA; diluidos a 1/10000) se han incubado durante una hora a temperatura ambiente. Las

reactividades se han revelado por la adición de p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se ha medido la absorbancia (DO) a 405 nm. El ruido de fondo de densidad óptica (pocillos recubiertos de tampón bicarbonato únicamente) se ha restado del valor de la DO obtenido con las proteínas. Las muestras se han considerado positivas cuando la densidad óptica era superior o igual a la media + 2 desviaciones estándar del control (2et).

- 5 Estudio del efecto de los sueros o de las IgG purificadas de pacientes frente a sujetos sanos sobre la contracción de las CMLV o de los fibroblastos

Sueros e IgG purificadas

10 Los inventores han utilizado los sueros de 10 pacientes esclerodérmicos sin HTAP (denominados en lo sucesivo ScS), 10 pacientes esclerodérmicos con HTAP (ScS-HTAP), y 10 pacientes afectados de HTAPi. Diez sujetos sanos emparejados en cuanto a sexo y edad han sido igualmente sometidos a ensayo. Los pacientes esclerodérmicos responden a los criterios de la Asociación Americana de Reumatología (ARA) y/o a los criterios de Leroy y Medsger. Los sueros se conservaban a -80 °C antes de su utilización. Todos los pacientes y los sujetos sanos han firmado un consentimiento informado en el marco del estudio HTAP-Ig (Contrato de Investigación y de Investigación Clínica 2005 N° CR C 05066, promotor Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; investigador coordinador Luc Mouthon; centro de gestión URC Cochin).

15 Las IgG han sido purificadas del suero de los pacientes y de los sujetos sanos sobre una columna de proteína G seferosa. Las IgG purificadas han sido cuantificadas por espectrofotometría a 260 y 280 nm. La pureza de las preparaciones de IgG purificadas ha sido determinada por SDS-PAGE.

Cultivo celular

20 Las CMLV humanas obtenidas a partir de las arterias mamarias de los pacientes que han sufrido un puente aortocoronario inmortalizadas después de la transducción secuencial lentiviral de la subunidad catalítica de la holoenzima humana telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) y del antígeno T del poliomavirus SV40 (Virus del simio 40) en un cultivo primario de CMLV adultas (Weksler *et al.*, 2005) han sido proporcionadas por el Dr. Babet Weksler (Institut Cochin, Paris). Estas células han sido cultivadas en medio de cultivo DMEM (Gibco BRL Invitrogen™ Cergy Pontoise, Francia) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (SVF) filtrado y descomplementado, con 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de ciprofloxacino.

25 Las CMLV humanas de la aorta (PromoCell, Heidelberg, Alemania) han sido cultivadas en el medio de cultivo Medio 2 de crecimiento de células del músculo liso (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado con 5 % de suero de ternera fetal descomplementado (SVF), 0,5 ng/ml de Factor de crecimiento epitelial (EGF), 2 ng/ml de Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), 5 µg/ml de insulina, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de ciprofloxacino.

Contracción de una matriz de colágeno

35 Las CMLV han sido recogidas con tripsina al 0,25 % EDTA 1 mM (Gibco BRL Invitrogen™ Cergy Pontoise, Francia) neutralizada por 5 % de SVF. Las matrices de colágeno han sido preparadas en placas de 35 mm con 1 ml de medio sin SVF que contienen 500.000 CMLV, 1,65 ml de medio 1 % de suero (SVF, suero de paciente o suero sano) o 128 µg/ml de IgG purificadas, y 1 ml de colágeno a 3,35 mg/ml (BD Biosciences, Franklin Lakes, Estados Unidos). Para el ensayo de contracción con activación de las CMLV, se han añadido 40 ng/ml de TNF-α (R&D Systems, Abingdon, England). Después de una incubación de 1 h a 37 °C que permite la polimerización, se han despegado las matrices dando golpecitos suaves sobre los bordes de la placa, con el fin de iniciar la contracción. Para determinar el grado de contracción del gel, se han realizado fotografías los días 2 y 4, con el fin de medir la superficie de la matriz. Se han comparado los resultados obtenidos con los sueros de sujetos sanos y de pacientes. Se han analizado veinte sueros en cada experimento; los diferentes ensayos de contracción se han verificado gracias al SVF y a un suero de referencia utilizado por duplicado. Este control permitía verificar la buena reproducibilidad del ensayo. Las medidas se han efectuado gracias al programa Image J (Nacional Institute of Health NIH, Estados Unidos).

45 Resultados

Inmunotransferencia 1D

50 En un primer tiempo, los inventores han ensayado por separado las reactividades de IgG de los sueros de 15 pacientes en cada grupo y de 15 sujetos sanos en inmunotransferencia 1D a una dilución de 1/100. Se han puesto en evidencia numerosas reactividades con los sueros de pacientes (ScS, HTAP-ScS, HTAPi) de las cuales algunas eran muy intensas en comparación con los sueros de sujetos sanos que no presentaban casi ninguna banda de inmunorreactividad de IgG. El número de las bandas de reactividad era más importante en el caso de los pacientes esclerodérmicos con o sin HTAP que en el caso de los pacientes que tienen una HTAPi. Además, ciertas bandas de reactividades parecían específicas de un grupo de enfermos dado, en particular una banda de aproximadamente 90 kDa en ciertos pacientes esclerodérmicos con o sin HTAP (Figura 1). Con el fin de identificar las dianas antigénicas de las IgG anti-CMVL de los pacientes, los inventores han efectuado después las inmunotransferencias 2D.

55

## Cartografía de las proteínas de CMLV después de la separación en dos dimensiones

Después de haber hecho migrar 100 µg de extractos proteicos de CMLV preparados como se describe en la sección Materiales y métodos, los inventores han podido separar y después teñir con nitrato de plata 880 manchas proteicas y obtener el gel representado en la figura 2. Los inventores han podido estimar el PM y el pHi de cada una de estas manchas proteicas después de un análisis informático según su disposición en el gel y con ayuda de marcadores de PM; las manchas tenían mayoritariamente un PM comprendido entre 10 y 125 kDa y un pHi comprendido entre 3 y 8.

Inmunotransferencia 2D de las IgG séricas de sujetos sanos y de pacientes con respecto a proteínas de células musculares lisas vasculares

Se han identificado 635 reactividades después del emparejamiento de las reactividades presentes sobre cada una de las dieciséis membranas de PVDF con el gel de referencia, considerando las reactividades de las IgG séricas de los conjuntos de tres pacientes y las del conjunto de sujetos sanos adicionadas.

## Sujetos sanos

Se han mezclado los sueros de 12 sujetos sanos y se han analizado sus reactividades. Las IgG de estos sujetos reconocían 150 manchas proteicas de CMVL (Figura 3). Veintiuna manchas proteicas eran específicas de los sujetos sanos (no reconocidas por los pacientes).

## Pacientes esclerodérmicos

Los 5 conjuntos de 3 sueros de pacientes afectados de ScS sin HTAP reconocían una media de  $127 \pm 26$  manchas proteicas (figura 3) y un total de 367 manchas diferentes. El 71 % de estas manchas no eran reconocidas por los sujetos sanos. Entre estas 367 manchas, 13 eran comunes a los 5 conjuntos de pacientes esclerodérmicos (de las cuales una sola no era reconocida por los sujetos sanos), 18 comunes a 4 conjuntos sobre 5 (de las cuales 7 no eran reconocidas por los sujetos sanos) y 39 comunes a 3 conjuntos sobre 5 (de las cuales 19 no eran reconocidas por los sujetos sanos) (figura 4).

Las manchas proteicas comunes a los 5 conjuntos de pacientes ScS sin HTAP eran todas igualmente reconocidas por ciertos conjuntos de pacientes afectados de HTAPi y de HTAP-ScS. Sobre las 18 manchas proteicas reconocidas por 4/5 de los conjuntos de pacientes ScS, 9 eran igualmente reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de pacientes de cada uno de los otros dos grupos de enfermos (de las cuales 3 no eran reconocidas por los sujetos sanos), 5 eran reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes HTAP-ScS (de las cuales una no era reconocida por los sujetos sanos), y 3 eran reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes HTAPi (de las cuales 2 no eran reconocidas por los sujetos sanos). Una mancha (5325) era reconocida por un solo conjunto de pacientes HTAP-ScS, por ningún conjunto de pacientes HTAPi y por ningún conjunto de sujetos sanos.

Las IgG de los 5 conjuntos de 3 sueros de pacientes afectados de HTAP-ScS reconocían una media de  $145 \pm 48$  manchas proteicas (figura 4). En total, 264 manchas proteicas diferentes eran reconocidas por las IgG séricas de estos pacientes, de las cuales el 77 % no eran reconocidas por las IgG de los sujetos sanos. Entre estas 264 manchas proteicas, 19 eran comunes a los 5 conjuntos de pacientes HTAP-ScS (de las cuales 2 no eran reconocidas por los sujetos sanos), 29 comunes a 4/5 de los conjuntos (de las cuales 9 no eran reconocidas por los sujetos sanos) y 47 comunes a 3/5 de los conjuntos (de las cuales 30 no eran reconocidas por los sujetos sanos) (figura 4).

Las manchas proteicas comunes a los 5 conjuntos de pacientes HTAP-ScS eran igualmente mayoritariamente reconocidas por los pacientes afectados de HTAPi y de HTAP-ScS. Más precisamente, 16 manchas eran reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de pacientes de los otros dos grupos (de las cuales 1 sola no era reconocida por los sujetos sanos), 3 eran reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de pacientes HTAPi (de las cuales 1 sola no era reconocida por los sujetos sanos) y 1 mancha era reconocida por al menos 3/5 de los conjuntos de pacientes ScS.

Contrariamente a los pacientes afectados de ScS, la mayoría de las manchas reconocidas por 4/5 de los conjuntos de pacientes HTAP-ScS eran reconocidas por menos de 40 % de los enfermos de los otros dos grupos. Más precisamente, 12 manchas eran reconocidas por menos de 40 % de los enfermos de los otros dos grupos, de las cuales 5 manchas no eran reconocidas por los pacientes ScS (4658, 5206, 4831, 4707, 4659) y 3 manchas no eran reconocidas por los pacientes HTAPi (4656, 5190, 4707). 9 manchas eran reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes ScS y HTAPi (de las cuales 2 no eran reconocidas por los sujetos sanos), 5 eran reconocidas por al menos 3/5 de los pacientes HTAPi (de las cuales 1 no era reconocida por los sujetos sanos) y 3 eran reconocidas por al menos 3/5 de los pacientes ScS (estas 3 manchas eran todas igualmente reconocidas por los sujetos sanos).

55

Pacientes afectados de HTAP idiopática

5 Las IgG de los 5 conjuntos de 3 sueros de pacientes afectados de HTAPi reconocían una media de  $130 \pm 25$  manchas proteicas (figura 3). En total, 356 manchas proteicas diferentes eran reconocidas por las IgG de estos pacientes, y el 70 % no eran reconocidas por las IgG de los sujetos sanos. Entre estas 356 manchas proteicas, 12 eran comunes a los 5 conjuntos de pacientes (pero todas eran reconocidas por los sujetos sanos), 24 comunes a 4/5 de los conjuntos (de las cuales 7 no eran reconocidas por los sujetos sanos) y 54 comunes a 3/5 de los conjuntos (de las cuales 31 no eran reconocidas por los sujetos sanos) (figura 4).

10 Las manchas proteicas comunes a los 5 conjuntos de pacientes HTAPi eran igualmente mayoritariamente reconocidas por los conjuntos de pacientes afectados de HTAPi o de HTAP-ScS. Más precisamente, 10 eran igualmente reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes ScS y de los pacientes HTAP-ScS, una era reconocida igualmente por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes ScS y otra por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes HTAP-ScS.

15 Las manchas proteicas reconocidas por 4/5 de los conjuntos de sueros de pacientes HTAPi eran mayoritariamente compartidas con los otros 2 grupos de enfermos. Más precisamente, 15 manchas eran igualmente reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes ScS y 3/5 de los conjuntos de los pacientes HTAP-ScS (de las cuales 4 no eran reconocidas por los sujetos sanos), 3 manchas eran igualmente reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes ScS (de las cuales una no era reconocida por los sujetos sanos) y una era también reconocida por al menos 3/5 de los conjuntos de los pacientes HTAP-ScS (y por los sujetos sanos). 5 manchas eran reconocidas por menos del 40 % de los conjuntos de los pacientes ScS o HTAP-ScS (de las cuales 4 no eran reconocidas por los sujetos sanos). Entre estas 4 manchas, una no era reconocida por los pacientes ScS (4735).

20 Comparación de las reactividades de las IgG de pacientes esclerodérmicos con o sin HTAP, de pacientes que tienen una HTAP idiopática y de sujetos sanos e identificación de los antígenos específicos de un grupo de enfermos

25 Los inventores han comparado los perfiles de reactividad de las IgG del conjunto de sueros de sujetos sanos y de los conjuntos de sueros de pacientes con respecto a las proteínas de CMLV. Cualquiera que sea el grupo de pacientes, la mayor parte de las manchas proteicas no reconocidas por las IgG de sujetos sanos lo eran por un único grupo de pacientes sobre 5 (figura 5). Seleccionando las manchas proteicas reconocidas por al menos 3/5 de los conjuntos de sueros de pacientes de un grupo dado y no por el conjunto de los sujetos sanos, los inventores han identificado 21 manchas proteicas de interés (tabla 1). Aunque el resultado de todas las manchas proteicas digeridas no se ha obtenido todavía, se han podido identificar 13 manchas proteicas interesantes. La localización de estas  
 30 manchas proteicas sobre el gel de referencia está indicada en la figura 6. Dos manchas (5190, 5325) parecen específicas de la ScS puesto que son reconocidas respectivamente por 3/5 y 4/5 de los conjuntos de pacientes ScS y 4/5 y 1/5 de los conjuntos de pacientes HTAP-ScS, pero por ningún conjunto de pacientes HTAPi. Una de ellas (5325) ha sido identificada como la galectina.

Tabla 1: Identificación de las manchas proteicas reconocidas por las IgG de al menos 4/5 de los conjuntos de pacientes de un grupo dado y no por las IgG del conjunto de sujetos sanos. La identificación de un mismo antígeno candidato para manchas diferentes corresponde a la detección de isoformas de la proteína.

Mancha	pHi	PM (kDa)	Antígeno candidato	Número de conjuntos de pacientes que reconocen el antígeno			Nombre y número de acceso Swissprot de los antígenos candidatos
				ScS (n=5)	HTAP-ScS (n=5)	HTAPi (n=5)	
4484	6,7	82	Precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa	4	0	3	GRP78_HUMAN P11021 (SEQ. ID. NO: 18)
4488	6,8	81	Caldesmona	2	2	4	CALD1_HUMAN Q05682 (SEQ. ID. NO: 5)
4735	5,5	51	Proteína FAM10A4	0	2	4	F10A4_HUMAN Q81ZP2 (SEQ. ID. NO: 6)
4787	5,7	46	Actina citoplásmica 2	3	3	4	ACTG_HUMAN P63261 (SEQ. ID. NO: 8)
4660	6,2	60	Precursor A3 de la proteína disulfuro-isomerasa,	1	4	1	PDIA3_HUMAN P30101 (SEQ. ID. NO: 10)
			Desmina,				DESM_HUMAN P14661 (SEQ. ID. NO: 11)
			Periferina				PERI_HUMAN P41219 (SEQ. ID. NO: 12)
4691	6,4	56	Ribonucleoproteína H nuclear heterogénea	1	4	1	HNRH1_HUMAN P31943 (SEQ. ID. NO: 13)

5 Identificación de los antígenos diana de las IgG anti-CMLV reconocidos con una intensidad significativamente mayor en los enfermos que en los sujetos sanos

10 En un segundo tiempo los inventores han identificado las manchas proteicas de CMLV reconocidas por las IgG de conjuntos de 3 sueros de pacientes y por las IgG del conjunto de sujetos sanos, con la condición que estas manchas proteicas sean reconocidas con una gran intensidad por las IgG de un gran número de conjuntos de 3 sueros de pacientes y con una intensidad mayor que los sujetos sanos. Veintisiete manchas proteicas han respondido a estos criterios (Tabla 2). Las reactividades de las IgG séricas de los diferentes grupos de enfermos con respecto a las manchas proteicas 4576, 4570 y 4576 identificadas como las isoformas de la fosfoproteína inducida por el estrés y con respecto a la mancha 4738 identificada como la  $\alpha$ -enolasa se representan en la figura 7. La región seleccionada se representa en la figura 6.

ES 2 535 719 T3

Tabla 2: Identificación de las manchas proteicas reconocidas con una intensidad significativamente mayor en los pacientes que en los sujetos sanos

Mancha	pHi	PM (kDa)	Antígeno candidato	Número de conjuntos de pacientes que reconocen el antígeno			Nombre y número de acceso Swissprot de los antígenos candidatos
				ScS (n=5)	HTAP-ScS (n=5)	HTAPi (n=5)	
4757	5,2	49	Vimentina	5	4	5	VIME_HUMAN P08670 (SEQ. ID. NO: 19)
4576	6,9	70	Fosfoproteína 1 inducida por el estrés	5	4	5	STIP1_HUMAN P31948 (SEQ. ID. NO: 14)
4570	7,1	70	Fosfoproteína 1 inducida por el estrés	5	5	5	STIP1_HUMAN P31948 (SEQ. ID. NO: 14)
4575	6,8	70	Fosfoproteína 1 inducida por el estrés	5	4	5	STIP1_HUMAN P31948 (SEQ. ID. NO: 14)
4538	7,4	51	$\alpha$ -enolasa	5	5	5	ENOA_HUMAN P06733 (SEQ. ID. NO: 20)
5052	6,7	27	Triosafosfato isomerasa	3	2	2	TPIS_HUMAN P60174 (SEQ. ID. NO: 15)
4536	6,1	74	Precursor de la albúmina sérica	4	4	4	ALBU_HUMAN P02768 (SEQ. ID. NO: 1)
5063	5,8	26	Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina	4	1	3	UCHL1_HUMAN P09936 (SEQ. ID. NO: 4)
5064	5,9	26	Isozima L1 de la carboxilo-terminal hidrolasa de ubiquitina	4	1	4	UCHL1_HUMAN P09936 (SEQ. ID. NO: 4)
4463	6,7	85	Zixina	4	3	4	ZYX_HUMAN Q15942 (SEQ. ID. NO: 2)
4539	6,2	73	Precursor de la albúmina sérica	4	4	4	ALBU_HUMAN P02768 (SEQ. ID. NO: 1)
5325	5,4	15	Galectina-1	4	0	1	LEG1_HUMAN P09382 (SEQ. ID. NO: 3)
4734	7,0	51	$\alpha$ -enolasa	4	1	5	ENOA_HUMAN P06733 (SEQ. ID. NO: 20)
5047	6,8	27	Peroxiredoxina-6	2	5	4	PRDX6_HUMAN P30041 (SEQ. ID. NO: 16)
4441	7,4	89	Proteína 2 (proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far)	3	4	3	FUBP2_HUMAN Q92945 (SEQ. ID. NO: 7)
4446	7,2	89	Proteína 2 (proteína 2 de unión al elemento aguas arriba Far)	3	4	2	FUBP2_HUMAN Q92945 (SEQ. ID. NO: 7)
4833	4,9	43	Precursor de la reticulocalbina-1	2	3	5	RCN1_HUMAN Q15293 (SEQ. ID. NO: 17)
4747	5,2	50	$\gamma$ -enolasa  Vimentina	1	3	5	ENOG_HUMAN P009104 (SEQ. ID. NO: 9)  VIME_HUMAN P08670 (SEQ. ID. NO: 19)

#### Valoración con ELISA de anticuerpos anti-STIP1

Los inventores han puesto en evidencia que 56/75 (74,6 %) pacientes esclerodérmicos, 24/74 (32,4 %) pacientes con una HTAPi, 27/37 (73 %) pacientes con una HTAP-ScS y 2/70 (2,8 %) sujetos sanos tenían anticuerpos anti-STIP1. Por lo tanto casi las tres cuartas partes de los pacientes esclerodérmicos, tuvieran o no una HTAP y casi un tercio de los pacientes afectados de HTAPi tenían anticuerpos anti-STIP1, mientras que por regla general estos anticuerpos estaban ausentes en los sujetos sanos.

Efecto de los sueros o de las IgG purificadas de pacientes frente a sujetos sanos sobre la contracción de las CMLV o de los fibroblastos

Los inventores han determinado si los sueros y/o las IgG séricas de pacientes que tienen una ScS y/o una HTAP tenían un efecto sobre la contracción de las CMLV y de los fibroblastos, fenómeno implicado en el remodelado vascular y en la movilidad de las células. Para esto, se han sembrado las células en una matriz de colágeno, y se han incubado en presencia de 1 % de SVF, de sueros, o de IgG purificadas de pacientes que tenían una ScS y/o una HTAP frente a los de sujetos sanos. La retracción cuantificable de la matriz de colágeno refleja la actividad contráctil de las células. El experimento se ha realizado a partir de células sanas y no activadas. Se ha seguido la cinética de contracción de las matrices de colágeno durante 4 días para las CMLV y durante 7 días para los fibroblastos. Los resultados obtenidos con las CMLV se presentan en la figura 9.

#### CMLV

Para estas células, se han analizado los sueros de 15 pacientes de cada condición patológica (ScS, HTAPi, ScS-HTAP) y de 15 sujetos sanos así como las IgG purificadas de 10 de estos 15 pacientes y de 10 de estos 15 sujetos sanos. El SVF utilizado por duplicado, ha permitido ponderar entre sí los diferentes ensayos. La cinética de contracción de las matrices de colágeno se ha seguido durante 4 días, los experimentos preliminares habían puesto en evidencia que las modificaciones observadas más allá de esto eran mínimas (Figura 9B); las superficies de las matrices de colágeno se han medido los días 2 y 4 con ayuda del programa Image J y se han calculado en porcentaje de la superficie de la matriz inicial.

El día 4 (J4), la media de las superficies de las 15 matrices (en % de la superficie inicial) incubadas con el suero era de 27,8 %  $\pm$  6,0 para los ScS, 31,1 %  $\pm$  8,3 para los HTAPi, 29,4 %  $\pm$  4,7 para los ScS-HTAP, y 34,3 %  $\pm$  7,1 para los sujetos sanos. Las 15 superficies de las matrices de colágeno incubadas con el suero de los pacientes ScS diferían significativamente en comparación con las superficies de las 15 matrices incubadas con el suero de los sujetos sanos ( $p = 0,012$ ). En cambio, las diferencias entre las superficies obtenidas en presencia de los otros dos grupos de sueros de pacientes (HTAPi, ScS-HTAP) y el grupo de sueros de los sujetos sanos no eran significativas.

El día 4, la media de las superficies de las 10 matrices (en % de la superficie inicial) incubadas con las IgG purificadas era de 53,9 %  $\pm$  8,2 para los ScS, 48,0 %  $\pm$  3,2 para los HTAPi, 55,8 %  $\pm$  8,9 para los ScS-HTAP, y 34,3 %  $\pm$  8,6 para los sujetos sanos. Se nota una diferencia significativa entre las matrices incubadas con las IgG purificadas de pacientes HTAPi y las incubadas con las IgG de sujetos sanos ( $p = 0,001$ ).

Si se comparan entre sí los dos experimentos (Figura 9B1 vs 9B2), se observa que las matrices incubadas con las IgG purificadas se retraían menos que las incubadas con los sueros.

#### Ejemplo 2

Los inventores han sometido las muestras de los pacientes afectados de una ScS, de una HTAP-ScS o de una HTAPi, así como las muestras de sujetos sanos, a otro análisis de sus reactividades con el fin de afinar los resultados obtenidos y de identificar otros anticuerpos anti-CMLV.

Este estudio ha permitido poner en evidencia reactividades contra la peroxirredoxina-2 (mancha 5122; Swissprot: PRDX2\_HUMAN, n°P32119; SEQ ID NO:21), el precursor mitocondrial de la peróxido-reductasa dependiente de la tioredoxina (Precursor mitocondrial de la peróxido-reductasa dependiente de la tioredoxina; mancha 5096; Swissprot: PRDX3\_HUMAN, n°P30048; SEQ ID NO:22), de la proteína de activación de GTPasa específica de Ran (Proteína de activación de GTPasa específica de Ran; mancha 5024; Swissprot: RANG\_HUMAN, n°P43487; SEQ ID NO:23) y de la proteína B1 del grupo de alta movilidad (mancha 5011; Swissprot: HMGB1\_HUMAN, n°P09429; SEQ ID NO:24). Las reactividades contra la cadena beta de la tubulina y contra la polimerasa I y factor de liberación de la transcripción en la mancha 4672. Entre estas reactividades, las dirigidas contra la peroxirredoxina-2, la cadena beta de la tubulina y la polimerasa I y factor de liberación de la transcripción están específicamente presentes en las IgG de los conjuntos de pacientes, y no en las IgG del conjunto de sujetos sanos. Las reactividades contra el precursor mitocondrial de la peróxido-reductasa dependiente de la tioredoxina, la proteína de activación de GTPasa específica de Ran y la proteína B1 del grupo de alta movilidad han sido identificadas en los conjuntos de pacientes y de sujetos sanos, pero de manera significativamente más elevada en los pacientes.

Además, los resultados que se presentan en el ejemplo 1 han podido ser afinados. Los inventores han podido demostrar así que los anticuerpos anti-actina citoplásmica 2 están presentes en los conjuntos de pacientes y de sujetos sanos, pero de manera significativamente más elevada en los pacientes. Han podido demostrar igualmente



la existencia de reactividad contra la galectina 1 y la zixina en las IgG de los conjuntos de pacientes, y no en las IgG del conjunto de sujetos sanos.

**Referencias**

- Bordron *et al*, 1998, *Arthritis and rheumatism*, 41 (10):1738-47
- 5 Chizzolini *et al*, 2002, *Arthritis and rheumatism*, 46(6):1602-13
- Dorfmueller *et al*, 2003, *Eur Respir J*, 22(2):358-63
- Garcia de la Pena-Lefebvre *et al*, 2004, *Clin Immunol*, 111 (3):241 -51
- Hachulla *et al*, 2005, *Arthritis and rheumatism*, 52(12):3792-800
- Henault *et al*, 2006, *Arthritis and rheumatism*, 54(3):963-73
- 10 Moroi *et al*, 1980, *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3): 1627-31
- Mouthon *et al*, 2005, *Eur Respir J*, 26(6):986-8
- Nicolls MR *et al*, 2005, *Eur Respir J*, 26(6):1110-8
- Rabilloud *et al*, 1990, *Electrophoresis*, 11 (10):785-94
- Rubin, 1997, *N Engl J Med*, 336(2):111 -7
- 15 Servettaz *et al*, *Clinical immunology*, 120(2):212-9
- Tamby *et al*, 2005, *Thorax* 60(9):765-72
- Tamby *et al*, 2006, *Eur Respir J*, 28(4):799-807
- Tamby *et al*, 2007, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1109:221-8
- Terrier *et al*, 2008, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 177: 1128-1134
- 20 Weksler *et al*, 2005 *Faseb J*, 19(13):1872-4

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS UNIVERSITE RENE DESCARTES - PARIS 5  
UNIVERSITE PARIS-SUD 11

5 <120> Procedimiento de diagnóstico de una esclerodermia sistémica o de una hipertensión arterial pulmonar

<130> B762PC00

<160> 24

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 609

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala  
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu  
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val  
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp  
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp  
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala  
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln  
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val  
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys  
145 150 155 160

ES 2 535 719 T3

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro  
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys  
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu  
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys  
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val  
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser  
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly  
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile  
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu  
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp  
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser  
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly  
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val  
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys  
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu  
385 390 395 400

ES 2 535 719 T3

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val  
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
 465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala  
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu  
 530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys  
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala  
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe  
 580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly  
 595 600 605

Leu

<210> 2

<211> 572

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

# ES 2 535 719 T3

Met Ala Ala Pro Arg Pro Ser Pro Ala Ile Ser Val Ser Val Ser Ala  
 1 5 10 15

Pro Ala Phe Tyr Ala Pro Gln Lys Lys Phe Gly Pro Val Val Ala Pro  
 20 25 30

Lys Pro Lys Val Asn Pro Phe Arg Pro Gly Asp Ser Glu Pro Pro Pro  
 35 40 45

Ala Pro Gly Ala Gln Arg Ala Gln Met Gly Arg Val Gly Glu Ile Pro  
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro Glu Asp Phe Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Gly Asp Asp Ala Glu Gly Ala Leu Gly Gly Ala Phe Pro Pro Pro  
 85 90 95

Pro Pro Pro Ile Glu Glu Ser Phe Pro Pro Ala Pro Leu Glu Glu Glu  
 100 105 110

Ile Phe Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Glu Glu Glu Gly Gly Pro Glu  
 115 120 125

Ala Pro Ile Pro Pro Pro Pro Gln Pro Arg Glu Lys Val Ser Ser Ile  
 130 135 140

Asp Leu Glu Ile Asp Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asp Asp Met Thr Lys  
 145 150 155 160

Asn Asp Pro Phe Lys Ala Arg Val Ser Ser Gly Tyr Val Pro Pro Pro  
 165 170 175

Val Ala Thr Pro Phe Ser Ser Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gly  
 180 185 190

Gly Thr Ala Pro Leu Pro Pro Trp Lys Ser Pro Ser Ser Ser Gln Pro  
 195 200 205

Leu Pro Gln Val Pro Ala Pro Ala Gln Ser Gln Thr Gln Phe His Val  
 210 215 220

Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Val Gln Leu His Val Gln Ser  
 225 230 235 240

ES 2 535 719 T3

Gln Thr Gln Pro Val Ser Leu Ala Asn Thr Gln Pro Arg Gly Pro Pro  
 245 250 255

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Lys Phe Ser Pro Val Thr Pro Lys  
 260 265 270

Phe Thr Pro Val Ala Ser Lys Phe Ser Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser  
 275 280 285

Gly Ser Gln Pro Asn Gln Lys Leu Gly His Pro Glu Ala Leu Ser Ala  
 290 295 300

Gly Thr Gly Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Thr Tyr Ala Gln Gln Arg  
 305 310 315 320

Glu Lys Pro Arg Val Gln Glu Lys Gln His Pro Val Pro Pro Pro Ala  
 325 330 335

Gln Asn Gln Asn Gln Val Arg Ser Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Thr  
 340 345 350

Leu Lys Glu Val Glu Glu Leu Glu Gln Leu Thr Gln Gln Leu Met Gln  
 355 360 365

Asp Met Glu His Pro Gln Arg Gln Asn Val Ala Val Asn Glu Leu Cys  
 370 375 380

Gly Arg Cys His Gln Pro Leu Ala Arg Ala Gln Pro Ala Val Arg Ala  
 385 390 395 400

Leu Gly Gln Leu Phe His Ile Ala Cys Phe Thr Cys His Gln Cys Ala  
 405 410 415

Gln Gln Leu Gln Gly Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Glu Gly Ala Pro Tyr  
 420 425 430

Cys Glu Gly Cys Tyr Thr Asp Thr Leu Glu Lys Cys Asn Thr Cys Gly  
 435 440 445

Glu Pro Ile Thr Asp Arg Met Leu Arg Ala Thr Gly Lys Ala Tyr His  
 450 455 460

Pro His Cys Phe Thr Cys Val Val Cys Ala Arg Pro Leu Glu Gly Thr  
 465 470 475 480

ES 2 535 719 T3

Ser Phe Ile Val Asp Gln Ala Asn Arg Pro His Cys Val Pro Asp Tyr  
 485 490 495

His Lys Gln Tyr Ala Pro Arg Cys Ser Val Cys Ser Glu Pro Ile Met  
 500 505 510

Pro Glu Pro Gly Arg Asp Glu Thr Val Arg Val Val Ala Leu Asp Lys  
 515 520 525

Asn Phe His Met Lys Cys Tyr Lys Cys Glu Asp Cys Gly Lys Pro Leu  
 530 535 540

Ser Ile Glu Ala Asp Asp Asn Gly Cys Phe Pro Leu Asp Gly His Val  
 545 550 555 560

Leu Cys Arg Lys Cys His Thr Ala Arg Ala Gln Thr  
 565 570

<210> 3  
 <211> 135  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val  
 20 25 30

Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro  
 35 40 45

Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys  
 50 55 60

Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe  
 65 70 75 80

Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn  
 85 90 95

Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg  
 100 105 110

10 Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys  
 115 120 125  
 Ile Lys Cys Val Ala Phe Asp  
 130 135

<210> 4

ES 2 535 719 T3

<211> 223  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 4  
 Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu Met Leu Asn Lys Val  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Arg Leu Gly Val Ala Gly Gln Trp Arg Phe Val Asp Val Leu  
 20 25 30  
 Gly Leu Glu Glu Glu Ser Leu Gly Ser Val Pro Ala Pro Ala Cys Ala  
 35 40 45  
 Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Thr Ala Gln His Glu Asn Phe Arg Lys  
 50 55 60  
 Lys Gln Ile Glu Glu Leu Lys Gly Gln Glu Val Ser Pro Lys Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Phe Met Lys Gln Thr Ile Gly Asn Ser Cys Gly Thr Ile Gly Leu Ile  
 85 90 95  
 His Ala Val Ala Asn Asn Gln Asp Lys Leu Gly Phe Glu Asp Gly Ser  
 100 105 110  
 Val Leu Lys Gln Phe Leu Ser Glu Thr Glu Lys Met Ser Pro Glu Asp  
 115 120 125  
 Arg Ala Lys Cys Phe Glu Lys Asn Glu Ala Ile Gln Ala Ala His Asp  
 130 135 140  
 Ala Val Ala Gln Glu Gly Gln Cys Arg Val Asp Asp Lys Val Asn Phe  
 145 150 155 160  
 His Phe Ile Leu Phe Asn Asn Val Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp  
 165 170 175  
 Gly Arg Met Pro Phe Pro Val Asn His Gly Ala Ser Ser Glu Asp Thr  
 180 185 190  
 Leu Leu Lys Asp Ala Ala Lys Val Cys Arg Glu Phe Thr Glu Arg Glu  
 195 200 205  
 Gln Gly Glu Val Arg Phe Ser Ala Val Ala Leu Cys Lys Ala Ala  
 210 215 220

10 <210> 5  
 <211> 793  
 <212> PRT



ES 2 535 719 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

5

ES 2 535 719 T3

Glu Glu Glu Glu Lys Pro Lys Arg Gly Ser Ile Gly Glu Asn Gln Val  
 195 200 205

Glu Val Met Val Glu Glu Lys Thr Thr Glu Ser Gln Glu Glu Thr Val  
 210 215 220

Val Met Ser Leu Lys Asn Gly Gln Ile Ser Ser Glu Glu Pro Lys Gln  
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Arg Glu Gln Gly Ser Asp Glu Ile Ser His His Glu Lys  
 245 250 255

Met Glu Glu Glu Asp Lys Glu Arg Ala Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu  
 260 265 270

Glu Ala Glu Glu Arg Glu Arg Ile Lys Ala Glu Gln Asp Lys Lys Ile  
 275 280 285

Ala Asp Glu Arg Ala Arg Ile Glu Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ala Gln  
 290 295 300

Glu Arg Glu Arg Arg Glu Ala Glu Glu Arg Glu Arg Met Arg Glu Glu  
 305 310 315 320

Glu Lys Arg Ala Ala Glu Glu Arg Gln Arg Ile Lys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335

Arg Ala Ala Glu Glu Arg Gln Arg Ile Lys Glu Glu Glu Lys Arg Ala  
 340 345 350

Ala Glu Glu Arg Gln Arg Ile Lys Glu Glu Glu Lys Arg Ala Ala Glu  
 355 360 365

Glu Arg Gln Arg Ala Arg Ala Glu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Val Glu  
 370 375 380

Glu Gln Lys Arg Asn Lys Gln Leu Glu Glu Lys Lys Arg Ala Met Gln  
 385 390 395 400

Glu Thr Lys Ile Lys Gly Glu Lys Val Glu Gln Lys Ile Glu Gly Lys  
 405 410 415

Trp Val Asn Glu Lys Lys Ala Gln Glu Asp Lys Leu Gln Thr Ala Val  
 420 425 430

ES 2 535 719 T3

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

ES 2 535 719 T3

Ser Lys Ile Asp Ser Arg Leu Glu Gln Tyr Thr Ser Ala Ile Glu Gly  
675 680 685

Thr Lys Ser Ala Lys Pro Thr Lys Pro Ala Ala Ser Asp Leu Pro Val  
690 695 700

Pro Ala Glu Gly Val Arg Asn Ile Lys Ser Met Trp Glu Lys Gly Asn  
705 710 715 720

Val Phe Ser Ser Pro Thr Ala Ala Gly Thr Pro Asn Lys Glu Thr Ala  
725 730 735

Gly Leu Lys Val Gly Val Ser Ser Arg Ile Asn Glu Trp Leu Thr Lys  
740 745 750

Thr Pro Asp Gly Asn Lys Ser Pro Ala Pro Lys Pro Ser Asp Leu Arg  
755 760 765

Pro Gly Asp Val Ser Ser Lys Arg Asn Leu Trp Glu Lys Gln Ser Val  
770 775 780

Asp Lys Val Thr Ser Pro Thr Lys Val  
785 790

<210> 6

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asp Pro Arg Lys Val Asn Glu Leu Arg Ala Phe Val Lys Met Cys  
1 5 10 15

Lys Lys Asp Pro Ser Ile Leu His Thr Gln Glu Met Arg Phe Leu Arg  
20 25 30

Glu Trp Val Glu Ser Met Gly Gly Thr Ala Thr Gln Lys Ala Lys Ser  
35 40 45

Glu Glu Asn Thr Lys Glu Glu Lys Pro Asp Ser Lys Val Glu Glu Asp  
50 55 60

Leu Lys Ala Asp Glu Pro Ser Ser Glu Glu Ser Asp Leu Glu Ile Asp  
65 70 75 80

Lys Glu Gly Val Ile Glu Pro Asp Thr Asp Ala Pro Gln Glu Met Gly  
85 90 95

10

ES 2 535 719 T3

Asp Glu Asn Ala Glu Ile Thr Glu Glu Val Met Asp Gln Ala Asn Asp  
 100 105 110

Lys Lys Val Ala Ala Ile Glu Ala Leu Asn Asp Gly Glu Leu Gln Lys  
 115 120 125

Ala Ile Asp Leu Phe Thr Asp Ala Ile Lys Leu Asn Pro Arg Leu Ala  
 130 135 140

Ile Leu Tyr Ala Lys Arg Ala Ser Val Phe Val Lys Leu Gln Lys Pro  
 145 150 155 160

Asn Ala Ala Ile Arg Asp Cys Asp Arg Ala Ile Glu Ile Asn Pro Asp  
 165 170 175

Ser Ala Gln Pro Tyr Lys Arg Arg Gly Lys Ala His Arg Leu Leu Gly  
 180 185 190

His Trp Glu Glu Ala Ala His Asp Leu Ala Leu Ala Cys Lys Phe Asp  
 195 200 205

Tyr Asp Glu Asp Ala Ser Ala Met Leu Lys Glu Val Gln Pro Arg Ala  
 210 215 220

Gln Lys Ile Ala Glu His Gln Arg Lys Tyr Glu Arg Lys Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

<210> 7  
 <211> 710  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

Met Ser Asp Tyr Ser Thr Gly Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Pro Pro Pro  
 20 25 30

Gly Pro Pro Gly Ala Gly Asp Arg Gly Gly Gly Gly Pro Cys Gly Gly  
 35 40 45

Gly Pro Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Pro Ser Gln Pro Pro Gly Gly  
 50 55 60

10

ES 2 535 719 T3

Gly Gly Pro Gly Ile Arg Lys Asp Ala Phe Ala Asp Ala Val Gln Arg  
65 70 75 80

Ala Arg Gln Ile Ala Ala Lys Ile Gly Gly Asp Ala Ala Thr Thr Val  
85 90 95

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

Glu Asp Gly Asp Gln Pro Glu Ser Lys Lys Leu Ala Ser Gln Gly Asp  
115 120 125

Ser Ile Ser Ser Gln Leu Gly Pro Ile His Pro Pro Pro Arg Thr Ser  
130 135 140

Met Thr Glu Glu Tyr Arg Val Pro Asp Gly Met Val Gly Leu Ile Ile  
145 150 155 160

Gly Arg Gly Gly Glu Gln Ile Asn Lys Ile Gln Gln Asp Ser Gly Cys  
165 170 175

Lys Val Gln Ile Ser Pro Asp Ser Gly Gly Leu Pro Glu Arg Ser Val  
180 185 190

Ser Leu Thr Gly Ala Pro Glu Ser Val Gln Lys Ala Lys Met Met Leu  
195 200 205

Asp Asp Ile Val Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Gly Gln Phe His  
210 215 220

Asp Asn Ala Asn Gly Gly Gln Asn Gly Thr Val Gln Glu Ile Met Ile  
225 230 235 240

Pro Ala Gly Lys Ala Gly Leu Val Ile Gly Lys Gly Gly Glu Thr Ile  
245 250 255

Lys Gln Leu Gln Glu Arg Ala Gly Val Lys Met Ile Leu Ile Gln Asp  
260 265 270

Gly Ser Gln Asn Thr Asn Val Asp Lys Pro Leu Arg Ile Ile Gly Asp  
275 280 285

Pro Tyr Lys Val Gln Gln Ala Cys Glu Met Val Met Asp Ile Leu Arg  
290 295 300

Glu Arg Asp Gln Gly Gly Phe Gly Asp Arg Asn Glu Tyr Gly Ser Arg

# ES 2 535 719 T3

```

305          310          315          320

Ile Gly Gly Gly Ile Asp Val Pro Val Pro Arg His Ser Val Gly Val
      325          330          335

Val Ile Gly Arg Ser Gly Glu Met Ile Lys Lys Ile Gln Asn Asp Ala
      340          345          350

Gly Val Arg Ile Gln Phe Lys Gln Asp Asp Gly Thr Gly Pro Glu Lys
      355          360          365

Ile Ala His Ile Met Gly Pro Pro Asp Arg Cys Glu His Ala Ala Arg
      370          375          380

Ile Ile Asn Asp Leu Leu Gln Ser Leu Arg Ser Gly Pro Pro Gly Pro
385          390          395          400

Pro Gly Gly Pro Gly Met Pro Pro Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
      405          410          415

Gln Gly Asn Trp Gly Pro Pro Gly Gly Glu Met Thr Phe Ser Ile Pro
      420          425          430

Thr His Lys Cys Gly Leu Val Ile Gly Arg Gly Gly Glu Asn Val Lys
      435          440          445

Ala Ile Asn Gln Gln Thr Gly Ala Phe Val Glu Ile Ser Arg Gln Leu
      450          455          460

Pro Pro Asn Gly Asp Pro Asn Phe Lys Leu Phe Ile Ile Arg Gly Ser
465          470          475          480

Pro Gln Gln Ile Asp His Ala Lys Gln Leu Ile Glu Glu Lys Ile Glu
      485          490          495

Gly Pro Leu Cys Pro Val Gly Pro Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Ala
      500          505          510

Gly Pro Met Gly Pro Phe Asn Pro Gly Pro Phe Asn Gln Gly Pro Pro
      515          520          525

Gly Ala Pro Pro His Ala Gly Gly Pro Pro Pro His Gln Tyr Pro Pro
      530          535          540

Gln Gly Trp Gly Asn Thr Tyr Pro Gln Trp Gln Pro Pro Ala Pro His
545          550          555          560

```

ES 2 535 719 T3

Asp Pro Ser Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Ala Trp  
 565 570 575

Ala Ala Tyr Tyr Ser His Tyr Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Pro Val Pro  
 580 585 590

Gly Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ala Gln Gly Glu Pro Pro  
 595 600 605

Gln Pro Pro Pro Thr Gly Gln Ser Asp Tyr Thr Lys Ala Trp Glu Glu  
 610 615 620

Tyr Tyr Lys Lys Ile Gly Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gly Ala Pro Pro  
 625 630 635 640

Gln Gln Asp Tyr Thr Lys Ala Trp Glu Glu Tyr Tyr Lys Lys Gln Ala  
 645 650 655

Gln Val Ala Thr Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro Pro Gly Ser Gln Pro  
 660 665 670

Asp Tyr Ser Ala Ala Trp Ala Glu Tyr Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Tyr  
 675 680 685

Tyr Gly Gln Thr Pro Val Pro Gly Pro Gln Pro Pro Pro Thr Gln Gln  
 690 695 700

Gly Gln Gln Gln Ala Gln  
 705 710

<210> 8  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Glu Glu Glu Ile Ala Ala Leu Val Ile Asp Asn Gly Ser Gly Met  
 1 5 10 15

Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro  
 20 25 30

Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met Val Gly Met Gly  
 35 40 45

10



ES 2 535 719 T3

Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile  
50 55 60

Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Val Thr Asn Trp Asp  
65 70 75 80

Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val  
85 90 95

Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro  
100 105 110

Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe Asn  
115 120 125

Thr Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala  
130 135 140

Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val Met Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr  
145 150 155 160

His Thr Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala Ile Leu  
165 170 175

Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile  
180 185 190

Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile  
195 200 205

Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu  
210 215 220

Gln Glu Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr  
225 230 235 240

Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg  
245 250 255

Cys Pro Glu Ala Leu Phe Gln Pro Ser Phe Leu Gly Met Glu Ser Cys  
260 265 270

Gly Ile His Glu Thr Thr Phe Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp  
275 280 285

Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Thr Val Leu Ser Gly Gly Thr Thr

ES 2 535 719 T3

290

295

300

Met Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu  
305 310 315 320

Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys  
325 330 335

Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe  
340 345 350

Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser  
355 360 365

Ile Val His Arg Lys Cys Phe  
370 375

<210> 9

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Ile Glu Lys Ile Trp Ala Arg Glu Ile Leu Asp Ser Arg Gly  
1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly Leu Phe Arg  
20 25 30

Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu  
35 40 45

Leu Arg Asp Gly Asp Lys Gln Arg Tyr Leu Gly Lys Gly Val Leu Lys  
50 55 60

Ala Val Asp His Ile Asn Ser Thr Ile Ala Pro Ala Leu Ile Ser Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Ser Val Val Glu Gln Glu Lys Leu Asp Asn Leu Met Leu Glu  
85 90 95

Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu  
100 105 110

10 Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Ala Glu Arg Glu Leu  
115 120 125

# ES 2 535 719 T3

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Gln Leu Ala Gly Asn Ser Asp Leu Ile  
 130 135 140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly  
 145 150 155 160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Glu  
 165 170 175

Ser Phe Arg Asp Ala Met Arg Leu Gly Ala Glu Val Tyr His Thr Leu  
 180 185 190

Lys Gly Val Ile Lys Asp Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly  
 195 200 205

Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Ser Glu Ala Leu  
 210 215 220

Glu Leu Val Lys Glu Ala Ile Asp Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Ile  
 225 230 235 240

Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Arg Asp Gly Lys  
 245 250 255

Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Thr Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Thr  
 260 265 270

Gly Asp Gln Leu Gly Ala Leu Tyr Gln Asp Phe Val Arg Asp Tyr Pro  
 275 280 285

Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Ala Ala Trp  
 290 295 300

Ser Lys Phe Thr Ala Asn Val Gly Ile Gln Ile Val Gly Asp Asp Leu  
 305 310 315 320

Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Glu Arg Ala Val Glu Glu Lys Ala  
 325 330 335

Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu  
 340 345 350

Ala Ile Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Glu Asn Gly Trp Gly Val Met  
 355 360 365

ES 2 535 719 T3

Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu  
 370 375 380

Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg  
 385 390 395 400

Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Met Arg Ile Glu Glu Glu  
 405 410 415

Leu Gly Asp Glu Ala Arg Phe Ala Gly His Asn Phe Arg Asn Pro Ser  
 420 425 430

Val Leu

<210> 10

<211> 505

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Arg Arg Leu Ala Leu Phe Pro Gly Val Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ser Asp Val Leu Glu Leu Thr Asp  
 20 25 30

Asp Asn Phe Glu Ser Arg Ile Ser Asp Thr Gly Ser Ala Gly Leu Met  
 35 40 45

Leu Val Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala  
 50 55 60

Pro Glu Tyr Glu Ala Ala Ala Thr Arg Leu Lys Gly Ile Val Pro Leu  
 65 70 75 80

Ala Lys Val Asp Cys Thr Ala Asn Thr Asn Thr Cys Asn Lys Tyr Gly  
 85 90 95

Val Ser Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asp Gly Glu Glu Ala  
 100 105 110

Gly Ala Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala Asp Gly Ile Val Ser His Leu  
 115 120 125

Lys Lys Gln Ala Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Arg Thr Glu Glu Glu  
 130 135 140

10

ES 2 535 719 T3

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

ES 2 535 719 T3

Asn Phe Asp Glu Ile Val Asn Asn Glu Asn Lys Asp Val Leu Ile Glu  
385 390 395 400

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Asn Leu Glu Pro Lys Tyr  
405 410 415

Lys Glu Leu Gly Glu Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Ile Val Ile Ala  
420 425 430

Lys Met Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Ser Pro Tyr Glu Val Arg  
435 440 445

Gly Phe Pro Thr Ile Tyr Phe Ser Pro Ala Asn Lys Lys Leu Asn Pro  
450 455 460

Lys Lys Tyr Glu Gly Gly Arg Glu Leu Ser Asp Phe Ile Ser Tyr Leu  
465 470 475 480

Gln Arg Glu Ala Thr Asn Pro Pro Val Ile Gln Glu Glu Lys Pro Lys  
485 490 495

Lys Lys Lys Lys Ala Gln Glu Asp Leu  
500 505

<210> 11

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Gln Ala Tyr Ser Ser Ser Gln Arg Val Ser Ser Tyr Arg Arg  
1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Ala Pro Gly Phe Pro Leu Gly Ser Pro Leu Ser Ser  
20 25 30

Pro Val Phe Pro Arg Ala Gly Phe Gly Ser Lys Gly Ser Ser Ser Ser  
35 40 45

Val Thr Ser Arg Val Tyr Gln Val Ser Arg Thr Ser Gly Gly Ala Gly  
50 55 60

Gly Leu Gly Ser Leu Arg Ala Ser Arg Leu Gly Thr Thr Arg Thr Pro  
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Gly Ala Gly Glu Leu Leu Asp Phe Ser Leu Ala Asp Ala

ES 2 535 719 T3

			85					90					95		
Val	Asn	Gln	Glu	Phe	Leu	Thr	Thr	Arg	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Glu	Leu
			100					105					110		
Gln	Glu	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Ala	Asn	Tyr	Ile	Glu	Lys	Val	Arg	Phe
		115					120					125			
Leu	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Asn	Arg	Leu	Lys
	130					135					140				
Gly	Arg	Glu	Pro	Thr	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg
145					150					155					160
Glu	Leu	Arg	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Thr	Asn	Gln	Arg	Ala	Arg	Val
				165					170					175	
Asp	Val	Glu	Arg	Asp	Asn	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Lys	Ala
			180					185					190		
Lys	Leu	Gln	Glu	Glu	Ile	Gln	Leu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu
		195					200					205			
Ala	Ala	Phe	Arg	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Arg	Ile	Asp
	210					215					220				
Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	Ile	Ala	Phe	Leu	Lys
225					230					235					240
Lys	Val	His	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Glu	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu	Gln	Glu
			245						250					255	
Gln	Gln	Val	Gln	Val	Glu	Met	Asp	Met	Ser	Lys	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala
			260					265					270		
Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Arg	Ala	Gln	Tyr	Glu	Thr	Ile	Ala	Ala	Lys	Asn
		275					280					285			
Ile	Ser	Glu	Ala	Glu	Glu	Trp	Tyr	Lys	Ser	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Thr
	290					295					300				
Gln	Ala	Ala	Asn	Lys	Asn	Asn	Asp	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Lys	Gln	Glu
305					310					315					320
Met	Met	Glu	Tyr	Arg	His	Gln	Ile	Gln	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ile	Asp
				325					330					335	

ES 2 535 719 T3

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

Glu Asp Arg Phe Ala Ser Glu Ala Ser Gly Tyr Gln Asp Asn Ile Ala  
 355 360 365

Arg Leu Glu Glu Glu Ile Arg His Leu Lys Asp Glu Met Ala Arg His  
 370 375 380

Leu Arg Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Val  
 385 390 395 400

Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile  
 405 410 415

Asn Leu Pro Ile Gln Thr Tyr Ser Ala Leu Asn Phe Arg Glu Thr Ser  
 420 425 430

Pro Glu Gln Arg Gly Ser Glu Val His Thr Lys Lys Thr Val Met Ile  
 435 440 445

Lys Thr Ile Glu Thr Arg Asp Gly Glu Val Val Ser Glu Ala Thr Gln  
 450 455 460

Gln Gln His Glu Val Leu  
 465 470

<210> 12  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12  
 Met Ser His His Pro Ser Gly Leu Arg Ala Gly Phe Ser Ser Thr Ser  
 1 5 10 15

Tyr Arg Arg Thr Phe Gly Pro Pro Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ala Phe  
 20 25 30

Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Arg Phe Ser Ser Ser Arg Leu Leu Gly Ser  
 35 40 45

Ala Ser Pro Ser Ser Ser Val Arg Leu Gly Ser Phe Arg Ser Pro Arg  
 50 55 60



ES 2 535 719 T3

Ala Gly Ala Gly Ala Leu Leu Arg Leu Pro Ser Glu Arg Leu Asp Phe  
65 70 75 80

Ser Met Ala Glu Ala Leu Asn Gln Glu Phe Leu Ala Thr Arg Ser Asn  
85 90 95

Glu Lys Gln Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Arg Phe Ala Asn Phe Ile  
100 105 110

Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Ala Ala Leu Arg Gly Glu  
115 120 125

Leu Ser Gln Ala Arg Gly Gln Glu Pro Ala Arg Ala Asp Gln Leu Cys  
130 135 140

Gln Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Gly Arg  
145 150 155 160

Glu Arg Asp Arg Val Gln Val Glu Arg Asp Gly Leu Ala Glu Asp Leu  
165 170 175

Ala Ala Leu Lys Gln Arg Leu Glu Glu Glu Thr Arg Lys Arg Glu Asp  
180 185 190

Ala Glu His Asn Leu Val Leu Phe Arg Lys Asp Val Asp Asp Ala Thr  
195 200 205

Leu Ser Arg Leu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser Leu Met Asp Glu  
210 215 220

Ile Glu Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu Glu Leu Arg Asp Leu Gln  
225 230 235 240

Val Ser Val Glu Ser Gln Gln Val Gln Gln Val Glu Val Glu Ala Thr  
245 250 255

Val Lys Pro Glu Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ile Arg Ala Gln Tyr  
260 265 270

Glu Ser Ile Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys  
275 280 285

Ser Lys Tyr Ala Asp Leu Ser Asp Ala Ala Asn Arg Asn His Glu Ala  
290 295 300

Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Met Asn Glu Ser Arg Arg Gln Ile Gln

ES 2 535 719 T3

305                          310                          315                          320

Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Gly Leu Arg Gly Thr Asn Glu Ala Leu  
                                325                          330                          335

Leu Arg Gln Leu Arg Glu Leu Glu Glu Gln Phe Ala Leu Glu Ala Gly  
                                340                          345                          350

Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Ala Arg Leu Glu Glu Glu Leu Arg Gln Leu  
                                355                          360                          365

Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asn  
                                370                          375                          380

Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu  
385                          390                          395                          400

Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Val Pro Val His Ser Phe Ala Ser  
                                405                          410                          415

Leu Asn Ile Lys Thr Thr Val Pro Glu Val Glu Pro Pro Gln Asp Ser  
                                420                          425                          430

His Ser Arg Lys Thr Val Leu Ile Lys Thr Ile Glu Thr Arg Asn Gly  
                                435                          440                          445

Glu Val Val Thr Glu Ser Gln Lys Glu Gln Arg Ser Glu Leu Asp Lys  
                                450                          455                          460

Ser Ser Ala His Ser Tyr  
465                          470

<210> 13  
<211> 449  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
Met Met Leu Gly Thr Glu Gly Gly Glu Gly Phe Val Val Lys Val Arg  
1                          5                          10                          15

Gly Leu Pro Trp Ser Cys Ser Ala Asp Glu Val Gln Arg Phe Phe Ser  
                                20                          25                          30

Asp Cys Lys Ile Gln Asn Gly Ala Gln Gly Ile Arg Phe Ile Tyr Thr  
                                35                          40                          45

ES 2 535 719 T3

Arg Glu Gly Arg Pro Ser Gly Glu Ala Phe Val Glu Leu Glu Ser Glu  
50 55 60

Asp Glu Val Lys Leu Ala Leu Lys Lys Asp Arg Glu Thr Met Gly His  
65 70 75 80

Arg Tyr Val Glu Val Phe Lys Ser Asn Asn Val Glu Met Asp Trp Val  
85 90 95

Leu Lys His Thr Gly Pro Asn Ser Pro Asp Thr Ala Asn Asp Gly Phe  
100 105 110

Val Arg Leu Arg Gly Leu Pro Phe Gly Cys Ser Lys Glu Glu Ile Val  
115 120 125

Gln Phe Phe Ser Gly Leu Glu Ile Val Pro Asn Gly Ile Thr Leu Pro  
130 135 140

Val Asp Phe Gln Gly Arg Ser Thr Gly Glu Ala Phe Val Gln Phe Ala  
145 150 155 160

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

Gly His Arg Tyr Ile Glu Ile Phe Lys Ser Ser Arg Ala Glu Val Arg  
180 185 190

Thr His Tyr Asp Pro Pro Arg Lys Leu Met Ala Met Gln Arg Pro Gly  
195 200 205

Pro Tyr Asp Arg Pro Gly Ala Gly Arg Gly Tyr Asn Ser Ile Gly Arg  
210 215 220

Gly Ala Gly Phe Glu Arg Met Arg Arg Gly Ala Tyr Gly Gly Gly Tyr  
225 230 235 240

Gly Gly Tyr Asp Asp Tyr Asn Gly Tyr Asn Asp Gly Tyr Gly Phe Gly  
245 250 255

Ser Asp Arg Phe Gly Arg Asp Leu Asn Tyr Cys Phe Ser Gly Met Ser  
260 265 270

Asp His Arg Tyr Gly Asp Gly Gly Ser Thr Phe Gln Ser Thr Thr Gly  
275 280 285

ES 2 535 719 T3

His Cys Val His Met Arg Gly Leu Pro Tyr Arg Ala Thr Glu Asn Asp  
 290 295 300

Ile Tyr Asn Phe Phe Ser Pro Leu Asn Pro Val Arg Val His Ile Glu  
 305 310 315 320

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Val Thr Gly Glu Ala Asp Val Glu Phe Ala  
 325 330 335

Thr His Glu Asp Ala Val Ala Ala Met Ser Lys Asp Lys Ala Asn Met  
 340 345 350

Gln His Arg Tyr Val Glu Leu Phe Leu Asn Ser Thr Ala Gly Ala Ser  
 355 360 365

Gly Gly Ala Tyr Glu His Arg Tyr Val Glu Leu Phe Leu Asn Ser Thr  
 370 375 380

Ala Gly Ala Ser Gly Gly Ala Tyr Gly Ser Gln Met Met Gly Gly Met  
 385 390 395 400

Gly Leu Ser Asn Gln Ser Ser Tyr Gly Gly Pro Ala Ser Gln Gln Leu  
 405 410 415

Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gln Ser Ser Met Ser Gly  
 420 425 430

Tyr Asp Gln Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Phe Gln Ser Asn Ile  
 435 440 445

Ala

<210> 14

<211> 543

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Gln Val Asn Glu Leu Lys Glu Lys Gly Asn Lys Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

Val Gly Asn Ile Asp Asp Ala Leu Gln Cys Tyr Ser Glu Ala Ile Lys  
 20 25 30

Leu Asp Pro His Asn His Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Ala Tyr  
 35 40 45

ES 2 535 719 T3

Ala Lys Lys Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Tyr Glu Asp Gly Cys Lys Thr  
50 55 60

Val Asp Leu Lys Pro Asp Trp Gly Lys Gly Tyr Ser Arg Lys Ala Ala  
65 70 75 80

Ala Leu Glu Phe Leu Asn Arg Phe Glu Glu Ala Lys Arg Thr Tyr Glu  
85 90 95

Glu Gly Leu Lys His Glu Ala Asn Asn Pro Gln Leu Lys Glu Gly Leu  
100 105 110

Gln Asn Met Glu Ala Arg Leu Ala Glu Arg Lys Phe Met Asn Pro Phe  
115 120 125

Asn Met Pro Asn Leu Tyr Gln Lys Leu Glu Ser Asp Pro Arg Thr Arg  
130 135 140

Thr Leu Leu Ser Asp Pro Thr Tyr Arg Glu Leu Ile Glu Gln Leu Arg  
145 150 155 160

Asn Lys Pro Ser Asp Leu Gly Thr Lys Leu Gln Asp Pro Arg Ile Met  
165 170 175

Thr Thr Leu Ser Val Leu Leu Gly Val Asp Leu Gly Ser Met Asp Glu  
180 185 190

Glu Glu Glu Ile Ala Thr Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Lys Lys Glu  
195 200 205

Thr Lys Pro Glu Pro Met Glu Glu Asp Leu Pro Glu Asn Lys Lys Gln  
210 215 220

Ala Leu Lys Glu Lys Glu Leu Gly Asn Asp Ala Tyr Lys Lys Lys Asp  
225 230 235 240

Phe Asp Thr Ala Leu Lys His Tyr Asp Lys Ala Lys Glu Leu Asp Pro  
245 250 255

Thr Asn Met Thr Tyr Ile Thr Asn Gln Ala Ala Val Tyr Phe Glu Lys  
260 265 270

Gly Asp Tyr Asn Lys Cys Arg Glu Leu Cys Glu Lys Ala Ile Glu Val  
275 280 285

ES 2 535 719 T3

Gly Arg Glu Asn Arg Glu Asp Tyr Arg Gln Ile Ala Lys Ala Tyr Ala  
 290 295 300

Arg Ile Gly Asn Ser Tyr Phe Lys Glu Glu Lys Tyr Lys Asp Ala Ile  
 305 310 315 320

His Phe Tyr Asn Lys Ser Leu Ala Glu His Arg Thr Pro Asp Val Leu  
 325 330 335

Lys Lys Cys Gln Gln Ala Glu Lys Ile Leu Lys Glu Gln Glu Arg Leu  
 340 345 350

Ala Tyr Ile Asn Pro Asp Leu Ala Leu Glu Glu Lys Asn Lys Gly Asn  
 355 360 365

Glu Cys Phe Gln Lys Gly Asp Tyr Pro Gln Ala Met Lys His Tyr Thr  
 370 375 380

Glu Ala Ile Lys Arg Asn Pro Lys Asp Ala Lys Leu Tyr Ser Asn Arg  
 385 390 395 400

Ala Ala Cys Tyr Thr Lys Leu Leu Glu Phe Gln Leu Ala Leu Lys Asp  
 405 410 415

Cys Glu Glu Cys Ile Gln Leu Glu Pro Thr Phe Ile Lys Gly Tyr Thr  
 420 425 430

Arg Lys Ala Ala Ala Leu Glu Ala Met Lys Asp Tyr Thr Lys Ala Met  
 435 440 445

Asp Val Tyr Gln Lys Ala Leu Asp Leu Asp Ser Ser Cys Lys Glu Ala  
 450 455 460

Ala Asp Gly Tyr Gln Arg Cys Met Met Ala Gln Tyr Asn Arg His Asp  
 465 470 475 480

Ser Pro Glu Asp Val Lys Arg Arg Ala Met Ala Asp Pro Glu Val Gln  
 485 490 495

Gln Ile Met Ser Asp Pro Ala Met Arg Leu Ile Leu Glu Gln Met Gln  
 500 505 510

Lys Asp Pro Gln Ala Leu Ser Glu His Leu Lys Asn Pro Val Ile Ala  
 515 520 525  
 Gln Lys Ile Gln Lys Leu Met Asp Val Gly Leu Ile Ala Ile Arg  
 530 535 540

<210> 15  
 <211> 249  
 <212> PRT

ES 2 535 719 T3

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Pro Ser Arg Lys Phe Phe Val Gly Gly Asn Trp Lys Met Asn  
 1 5 10 15

Gly Arg Lys Gln Ser Leu Gly Glu Leu Ile Gly Thr Leu Asn Ala Ala  
 20 25 30

Lys Val Pro Ala Asp Thr Glu Val Val Cys Ala Pro Pro Thr Ala Tyr  
 35 40 45

Ile Asp Phe Ala Arg Gln Lys Leu Asp Pro Lys Ile Ala Val Ala Ala  
 50 55 60

Gln Asn Cys Tyr Lys Val Thr Asn Gly Ala Phe Thr Gly Glu Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Gly Met Ile Lys Asp Cys Gly Ala Thr Trp Val Val Leu Gly His  
 85 90 95

Ser Glu Arg Arg His Val Phe Gly Glu Ser Asp Glu Leu Ile Gly Gln  
 100 105 110

Lys Val Ala His Ala Leu Ala Glu Gly Leu Gly Val Ile Ala Cys Ile  
 115 120 125

Gly Glu Lys Leu Asp Glu Arg Glu Ala Gly Ile Thr Glu Lys Val Val  
 130 135 140

Phe Glu Gln Thr Lys Val Ile Ala Asp Asn Val Lys Asp Trp Ser Lys  
 145 150 155 160

Val Val Leu Ala Tyr Glu Pro Val Trp Ala Ile Gly Thr Gly Lys Thr  
 165 170 175

Ala Thr Pro Gln Gln Ala Gln Glu Val His Glu Lys Leu Arg Gly Trp  
 180 185 190

Leu Lys Ser Asn Val Ser Asp Ala Val Ala Gln Ser Thr Arg Ile Ile  
 195 200 205

Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala Thr Cys Lys Glu Leu Ala Ser Gln  
 210 215 220

Pro Asp Val Asp Gly Phe Leu Val Gly Gly Ala Ser Leu Lys Pro Glu  
 225 230 235 240

Phe Val Asp Ile Ile Asn Ala Lys Gln  
 245

ES 2 535 719 T3

<210> 16  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 16  
 Met Pro Gly Gly Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Thr Val Gly Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser  
 20 25 30  
 Trp Gly Ile Leu Phe Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr  
 35 40 45  
 Thr Glu Leu Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg  
 50 55 60  
 Asn Val Lys Leu Ile Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Trp Ser Lys Asp Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu  
 85 90 95  
 Lys Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile  
 100 105 110  
 Leu Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys  
 130 135 140  
 Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala  
 165 170 175  
 Thr Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr  
 180 185 190  
 Ile Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr  
 195 200 205  
 Lys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro  
 210 215 220

10

<210> 17  
 <211> 331  
 <212> PRT



# ES 2 535 719 T3

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Arg Gly Gly Arg Gly Arg Arg Leu Gly Leu Ala Leu Gly Leu  
1                                   5                                   10                                   15

Leu Leu Ala Leu Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala Lys Pro Thr  
                                  20                                   25                                   30

Val Arg Lys Glu Arg Val Val Arg Pro Asp Ser Glu Leu Gly Glu Arg  
                  35                                   40                                   45

Pro Pro Glu Asp Asn Gln Ser Phe Gln Tyr Asp His Glu Ala Phe Leu  
50                                   55                                   60

Gly Lys Glu Asp Ser Lys Thr Phe Asp Gln Leu Thr Pro Asp Glu Ser  
65                                   70                                   75                                   80

Lys Glu Arg Leu Gly Lys Ile Val Asp Arg Ile Asp Asn Asp Gly Asp  
                                  85                                   90                                   95

Gly Phe Val Thr Thr Glu Glu Leu Lys Thr Trp Ile Lys Arg Val Gln  
                                  100                                   105                                   110

Lys Arg Tyr Ile Phe Asp Asn Val Ala Lys Val Trp Lys Asp Tyr Asp  
115                                   120                                   125

Arg Asp Lys Asp Asp Lys Ile Ser Trp Glu Glu Tyr Lys Gln Ala Thr  
130                                   135                                   140

Tyr Gly Tyr Tyr Leu Gly Asn Pro Ala Glu Phe His Asp Ser Ser Asp  
145                                   150                                   155                                   160

ES 2 535 719 T3

His His Thr Phe Lys Lys Met Leu Pro Arg Asp Glu Arg Arg Phe Lys  
 165 170 175

Ala Ala Asp Leu Asn Gly Asp Leu Thr Ala Thr Arg Glu Glu Phe Thr  
 180 185 190

Ala Phe Leu His Pro Glu Glu Phe Glu His Met Lys Glu Ile Val Val  
 195 200 205

Leu Glu Thr Leu Glu Asp Ile Asp Lys Asn Gly Asp Gly Phe Val Asp  
 210 215 220

Gln Asp Glu Tyr Ile Ala Asp Met Phe Ser His Glu Glu Asn Gly Pro  
 225 230 235 240

Glu Pro Asp Trp Val Leu Ser Glu Arg Glu Gln Phe Asn Glu Phe Arg  
 245 250 255

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

Ile Leu Pro Gln Asp Tyr Asp His Ala Gln Ala Glu Ala Arg His Leu  
 275 280 285

Val Tyr Glu Ser Asp Lys Asn Lys Asp Glu Lys Leu Thr Lys Glu Glu  
 290 295 300

Ile Leu Glu Asn Trp Asn Met Phe Val Gly Ser Gln Ala Thr Asn Tyr  
 305 310 315 320

Gly Glu Asp Leu Thr Lys Asn His Asp Glu Leu  
 325 330

<210> 18  
 <211> 654  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala  
 1 5 10 15

Arg Ala Glu Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val Gly  
 20 25 30

ES 2 535 719 T3

Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn Gly  
 35 40 45

Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser  
 50 55 60

Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala  
 65 70 75 80

Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys  
 85 90 95

Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp Ile  
 100 105 110

Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr Ile  
 115 120 125

Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu Glu  
 130 135 140

Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr  
 145 150 155 160

Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe  
 165 170 175

Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly  
 180 185 190

Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala  
 195 200 205

Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe Asp  
 210 215 220

Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly  
 225 230 235 240

Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu  
 245 250 255

Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys Lys  
 260 265 270

Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu

# ES 2 535 719 T3

275	280	285
Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His Gln 290 295 300		
Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Tyr Glu Gly Glu Asp Phe Ser Glu 305 310 315 320		
Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg 325 330 335		
Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu Lys 340 345 350		
Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile 355 360 365		
Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro 370 375 380		
Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val 385 390 395 400		
Gln Ala Gly Val Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu 405 410 415		
Leu Asp Val Cys Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val 420 425 430		
Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser 435 440 445		
Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Lys 450 455 460		
Val Tyr Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly 465 470 475 480		
Thr Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln 485 490 495		
Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu Arg Val Thr 500 505 510		
Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn 515 520 525		

ES 2 535 719 T3

Asp Gln Asn Arg Leu Thr Pro Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Asn Asp  
 530 535 540

Ala Glu Lys Phe Ala Glu Glu Asp Lys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Asp  
 545 550 555 560

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

Gly Asp Lys Glu Lys Leu Gly Gly Lys Leu Ser Ser Glu Asp Lys Glu  
 580 585 590

Thr Met Glu Lys Ala Val Glu Glu Lys Ile Glu Trp Leu Glu Ser His  
 595 600 605

Gln Asp Ala Asp Ile Glu Asp Phe Lys Ala Lys Lys Lys Glu Leu Glu  
 610 615 620

Glu Ile Val Gln Pro Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala Gly Pro  
 625 630 635 640

Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp Glu Leu  
 645 650

<210> 19  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 19  
 Met Ser Thr Arg Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Arg Met Phe Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Thr Ala Ser Arg Pro Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Val Thr  
 20 25 30

Thr Ser Thr Arg Thr Tyr Ser Leu Gly Ser Ala Leu Arg Pro Ser Thr  
 35 40 45

Ser Arg Ser Leu Tyr Ala Ser Ser Pro Gly Gly Val Tyr Ala Thr Arg  
 50 55 60

Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro Gly Val Arg Leu Leu  
 65 70 75 80

ES 2 535 719 T3

Gln Asp Ser Val Asp Phe Ser Leu Ala Asp Ala Ile Asn Thr Glu Phe  
85 90 95

Lys Asn Thr Arg Thr Asn Glu Lys Val Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp  
100 105 110

Arg Phe Ala Asn Tyr Ile Asp Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn  
115 120 125

Lys Ile Leu Leu Ala Glu Leu Glu Gln Leu Lys Gly Gln Gly Lys Ser  
130 135 140

Arg Leu Gly Asp Leu Tyr Glu Glu Glu Met Arg Glu Leu Arg Arg Gln  
145 150 155 160

Val Asp Gln Leu Thr Asn Asp Lys Ala Arg Val Glu Val Glu Arg Asp  
165 170 175

Asn Leu Ala Glu Asp Ile Met Arg Leu Arg Glu Lys Leu Gln Glu Glu  
180 185 190

Met Leu Gln Arg Glu Glu Ala Glu Asn Thr Leu Gln Ser Phe Arg Gln  
195 200 205

Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Val  
210 215 220

Glu Ser Leu Gln Glu Glu Ile Ala Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu  
225 230 235 240

Glu Ile Gln Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Glu Gln His Val Gln Ile  
245 250 255

Asp Val Asp Val Ser Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Val  
260 265 270

Arg Gln Gln Tyr Glu Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu  
275 280 285

Glu Trp Tyr Lys Ser Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg  
290 295 300

Asn Asn Asp Ala Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Ser Thr Glu Tyr Arg  
305 310 315 320

Arg Gln Val Gln Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Ala Leu Lys Gly Thr

ES 2 535 719 T3

325

330

335

Asn Glu Ser Leu Glu Arg Gln Met Arg Glu Met Glu Glu Asn Phe Ala  
340 345 350

Val Glu Ala Ala Asn Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu Gln Asp Glu  
355 360 365

Ile Gln Asn Met Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln  
370 375 380

Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr  
385 390 395 400

Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Leu Pro Leu Pro  
405 410 415

Asn Phe Ser Ser Leu Asn Leu Arg Glu Thr Asn Leu Asp Ser Leu Pro  
420 425 430

Leu Val Asp Thr His Ser Lys Arg Thr Leu Leu Ile Lys Thr Val Glu  
435 440 445

Thr Arg Asp Gly Gln Val Ile Asn Glu Thr Ser Gln His His Asp Asp  
450 455 460

Leu Glu  
465

<210> 20

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly  
1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe Thr Ser Lys Gly Leu Phe Arg  
20 25 30

Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu  
35 40 45

Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys  
50 55 60

ES 2 535 719 T3

Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys  
65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu  
85 90 95

Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu  
100 105 110

Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val  
115 120 125

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Ser Glu Val Ile  
130 135 140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly  
145 150 155 160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ala  
165 170 175

Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu  
180 185 190

Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly  
195 200 205

Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Gly Leu  
210 215 220

Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Val  
225 230 235 240

Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys  
245 250 255

Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser  
260 265 270

Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro  
275 280 285

Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp  
290 295 300



ES 2 535 719 T3

Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu  
305 310 315 320

Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser  
325 330 335

Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu  
340 345 350

Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ala Asn Gly Trp Gly Val Met  
355 360 365

Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu  
370 375 380

Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg  
385 390 395 400

Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Glu  
405 410 415

Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Asn Phe Arg Asn Pro Leu  
420 425 430

Ala Lys

<210> 21

<211> 198

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ala Ser Gly Asn Ala Arg Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Lys  
1 5 10 15

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

Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr  
35 40 45

Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asn Arg Ala Glu Asp  
50 55 60

Phe Arg Lys Leu Gly Cys Glu Val Leu Gly Val Ser Val Asp Ser Gln  
65 70 75 80

ES 2 535 719 T3

Phe Thr His Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu  
85 90 95

Gly Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Ala Asp Val Thr Arg Arg Leu Ser  
100 105 110

Glu Asp Tyr Gly Val Leu Lys Thr Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly  
115 120 125

Leu Phe Ile Ile Asp Gly Lys Gly Val Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn  
130 135 140

Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Gln  
145 150 155 160

Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp  
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asn Val Asp Asp Ser Lys Glu  
180 185 190

Tyr Phe Ser Lys His Asn  
195

<210> 22

<211> 256

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His  
1 5 10 15

Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro  
20 25 30

Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser  
35 40 45

Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala  
50 55 60

Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly  
65 70 75 80

ES 2 535 719 T3

Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val  
85 90 95

Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile  
100 105 110

Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu  
115 120 125

Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile  
130 135 140

Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu  
145 150 155 160

Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu  
165 170 175

Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn  
180 185 190

Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser  
195 200 205

Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr  
210 215 220

His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile  
225 230 235 240

Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln  
245 250 255

<210> 23

<211> 201

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ala Ala Lys Asp Thr His Glu Asp His Asp Thr Ser Thr Glu  
1 5 10 15

Asn Thr Asp Glu Ser Asn His Asp Pro Gln Phe Glu Pro Ile Val Ser  
20 25 30

Leu Pro Glu Gln Glu Ile Lys Thr Leu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Leu  
35 40 45

ES 2 535 719 T3

Phe Lys Met Arg Ala Lys Leu Phe Arg Phe Ala Ser Glu Asn Asp Leu  
 50 55 60

Pro Glu Trp Lys Glu Arg Gly Thr Gly Asp Val Lys Leu Leu Lys His  
 65 70 75 80

Lys Glu Lys Gly Ala Ile Arg Leu Leu Met Arg Arg Asp Lys Thr Leu  
 85 90 95

Lys Ile Cys Ala Asn His Tyr Ile Thr Pro Met Met Glu Leu Lys Pro  
 100 105 110

Asn Ala Gly Ser Asp Arg Ala Trp Val Trp Asn Thr His Ala Asp Phe  
 115 120 125

Ala Asp Glu Cys Pro Lys Pro Glu Leu Leu Ala Ile Arg Phe Leu Asn  
 130 135 140

Ala Glu Asn Ala Gln Lys Phe Lys Thr Lys Phe Glu Glu Cys Arg Lys  
 145 150 155 160

Glu Ile Glu Glu Arg Glu Lys Lys Ala Gly Ser Gly Lys Asn Asp His  
 165 170 175

Ala Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Glu Ala Leu Ser Val Lys Glu Glu  
 180 185 190

Thr Lys Glu Asp Ala Glu Glu Lys Gln  
 195 200

<210> 24  
 <211> 215  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento *in vitro* de detección de una esclerodermia sistémica (ScS) o de una hipertensión arterial pulmonar asociada a una esclerodermia (HTAP-ScS) o de una hipertensión arterial pulmonar idiopática (HTAPi) en un sujeto, que comprende la determinación de la presencia y/o de la cantidad de al menos un anticuerpo elegido del grupo constituido por los anticuerpos anti-galectina-1, anti-proteína FAM10A4, anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés, y anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa, en una muestra biológica procedente de un paciente,
- siendo indicativa de una ScS o de una HTAPi, la presencia de un anticuerpo anti-precursor de la proteína de 78 kDa regulada por la glucosa;
- 10 siendo indicativa de una HTAP-ScS o de una HTAPi, la presencia de un anticuerpo anti-proteína FAM10A4;
- siendo indicativa de una ScS, la presencia de un anticuerpo anti-galectina-1;
- o siendo indicativa de una ScS, de una HTAP-ScS o de una HTAPi, la presencia de una cantidad superior a un valor control de un anticuerpo anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la muestra biológica es una muestra de sangre o de suero.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el cual la cantidad de dicho al menos un anticuerpo se determina por un inmunoensayo.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el cual el inmunoensayo es una valoración ELISA.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el paciente es un ser humano.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el paciente sufre de una esclerodermia sistémica, con o sin hipertensión arterial pulmonar asociada.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el paciente sufre de una hipertensión arterial pulmonar idiopática.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la hipertensión arterial pulmonar está asociada a una hipertensión portal, a una cardiopatía congénita, o a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o es una hipertensión pulmonar post-embólica.
- 25 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el paciente es un sujeto predispuesto a desarrollar una esclerodermia sistémica o una hipertensión arterial pulmonar asociada a una esclerodermia o una hipertensión arterial pulmonar idiopática
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el cual el sujeto es portador de una o varias mutaciones en el gen que codifica BMPRII, endoglin o ALK1.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho al menos un anticuerpo, un anticuerpo anti-galectina 1.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho al menos un anticuerpo, un anticuerpo anti-fosfoproteína 1 inducida por el estrés.

35

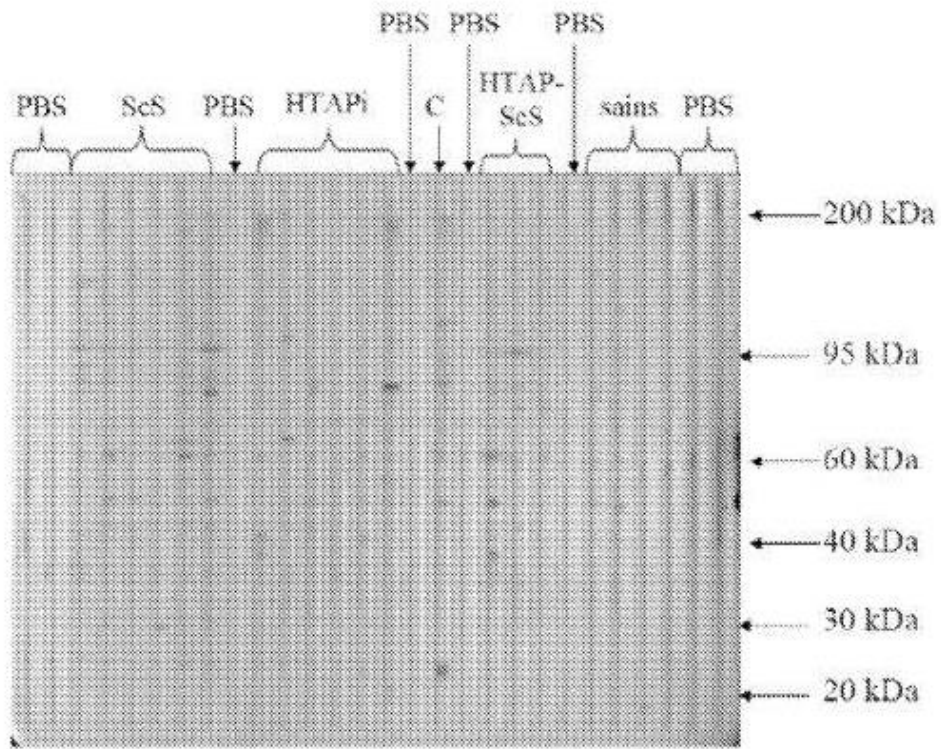


Figura 1

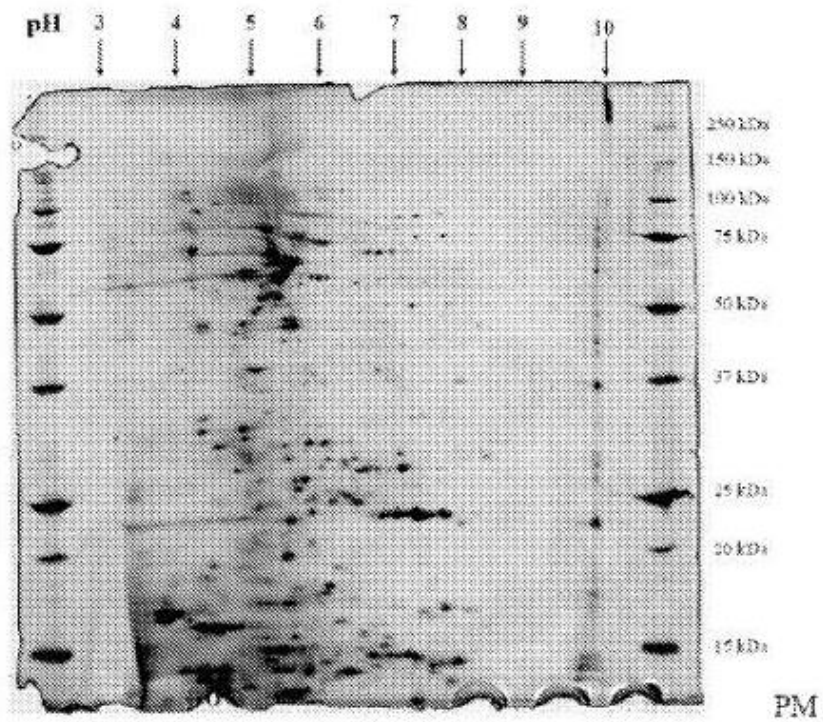


Figura 2

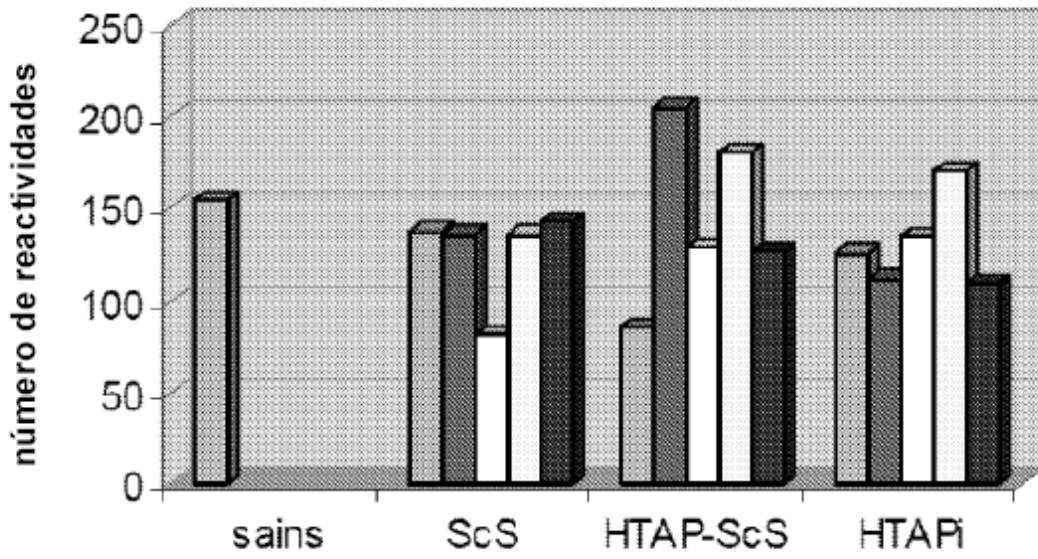


Figura 3

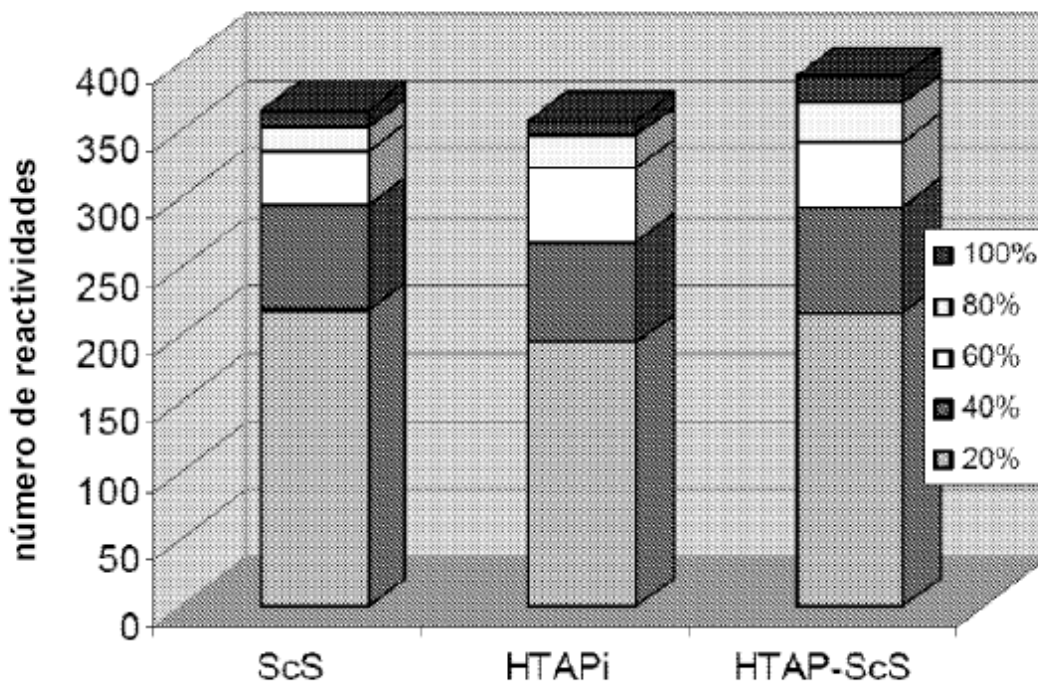


Figura 4

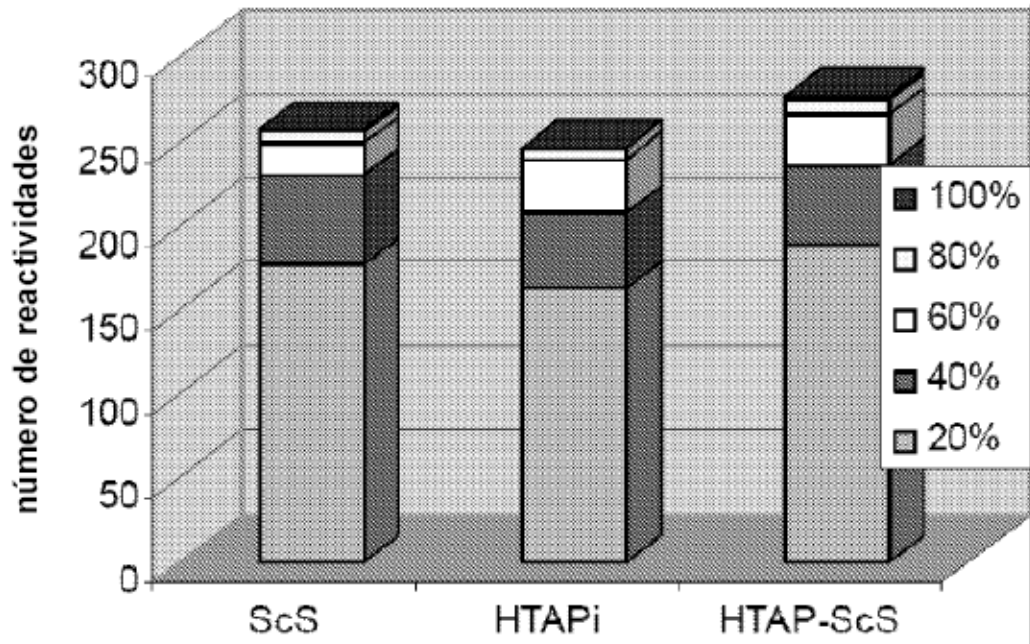


Figura 5

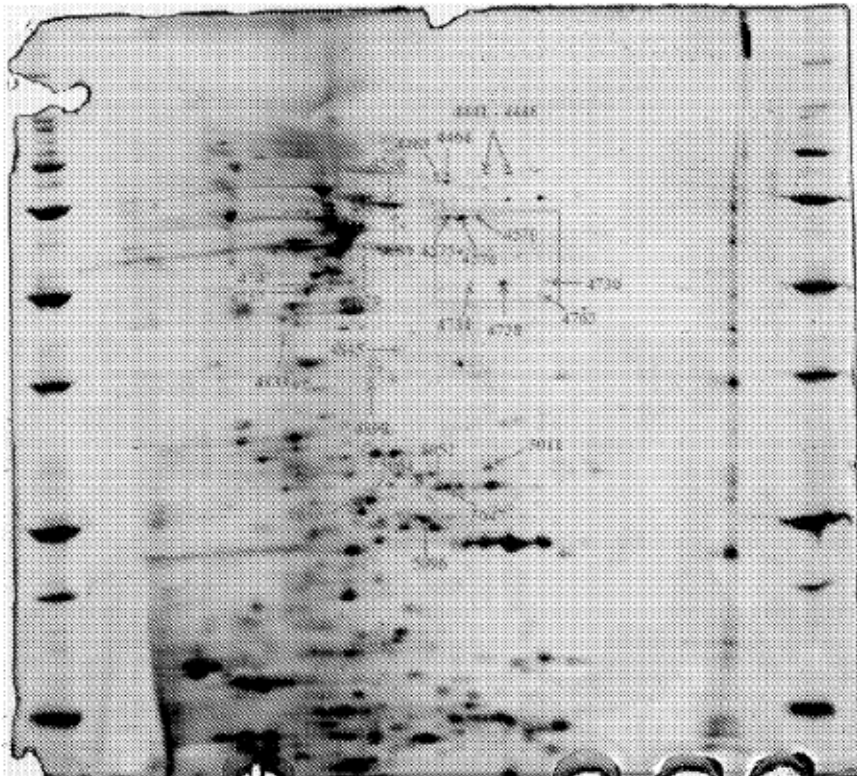


Figura 6



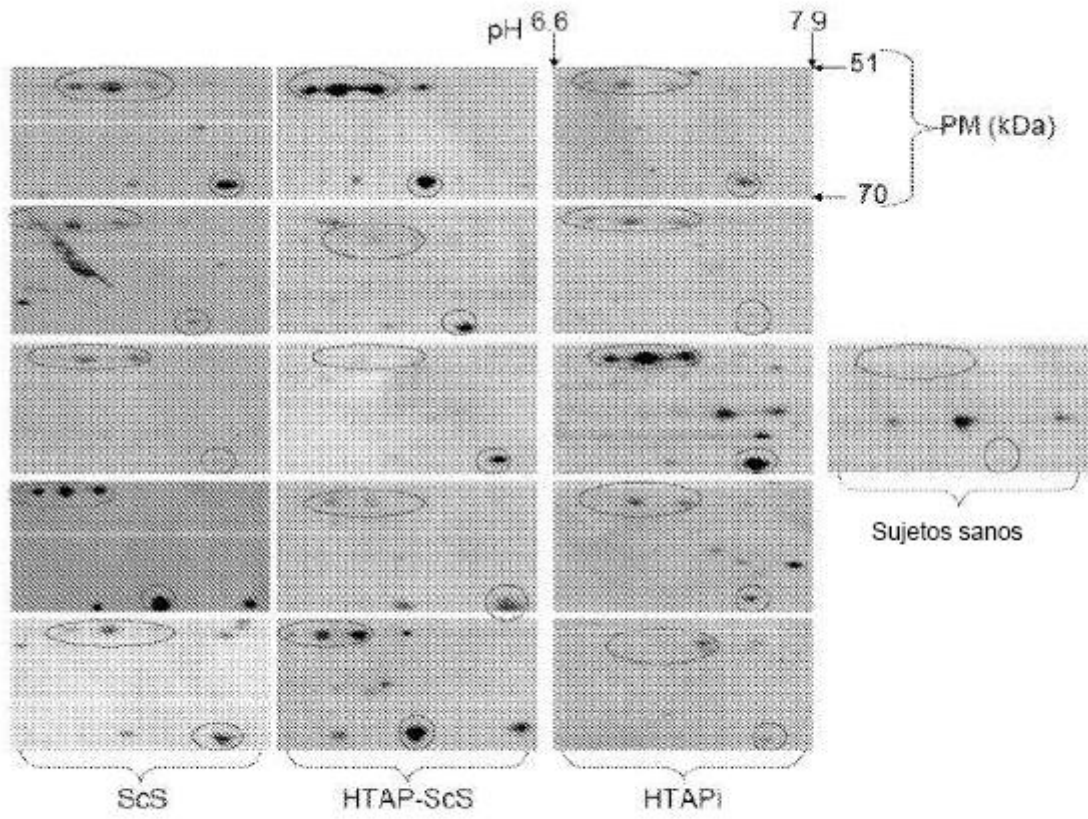


Figura 7

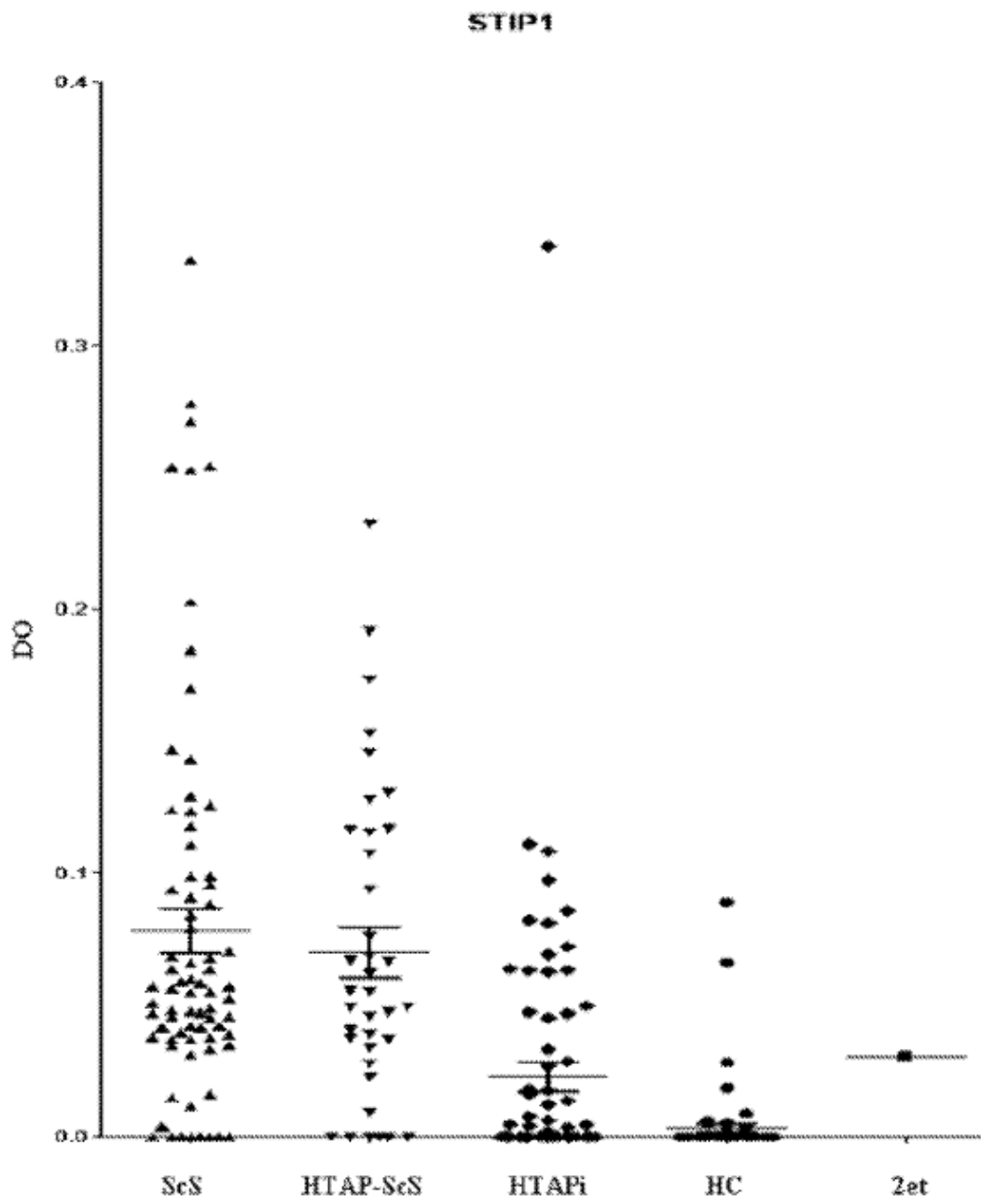


Figura 8

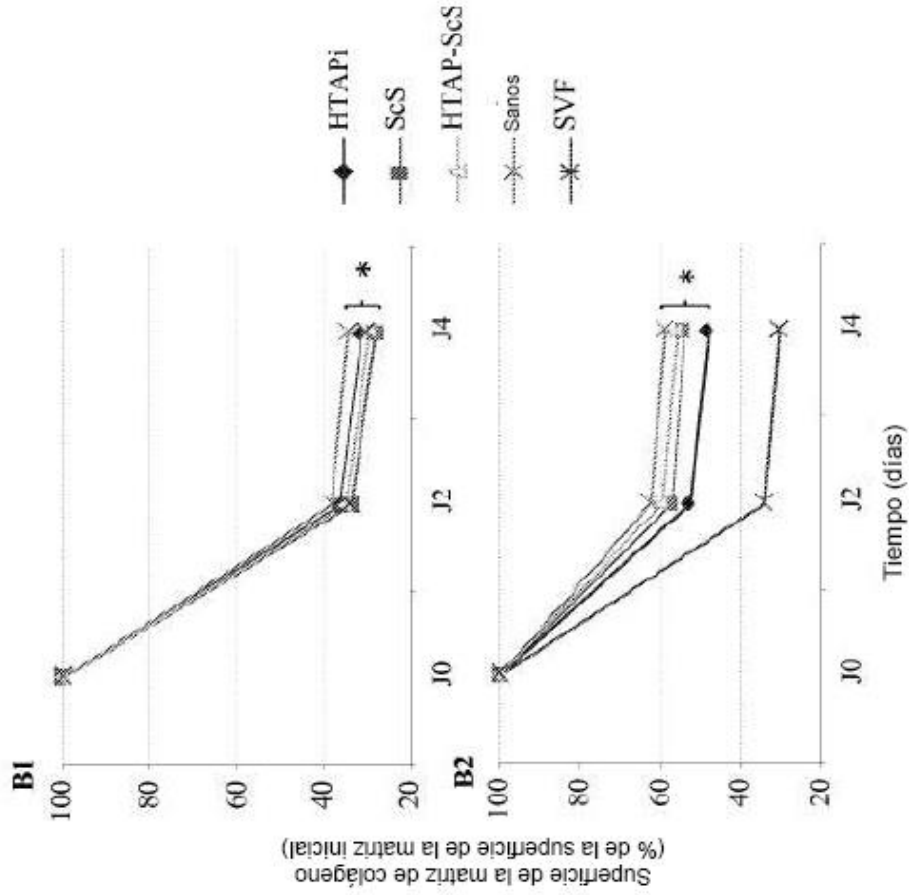
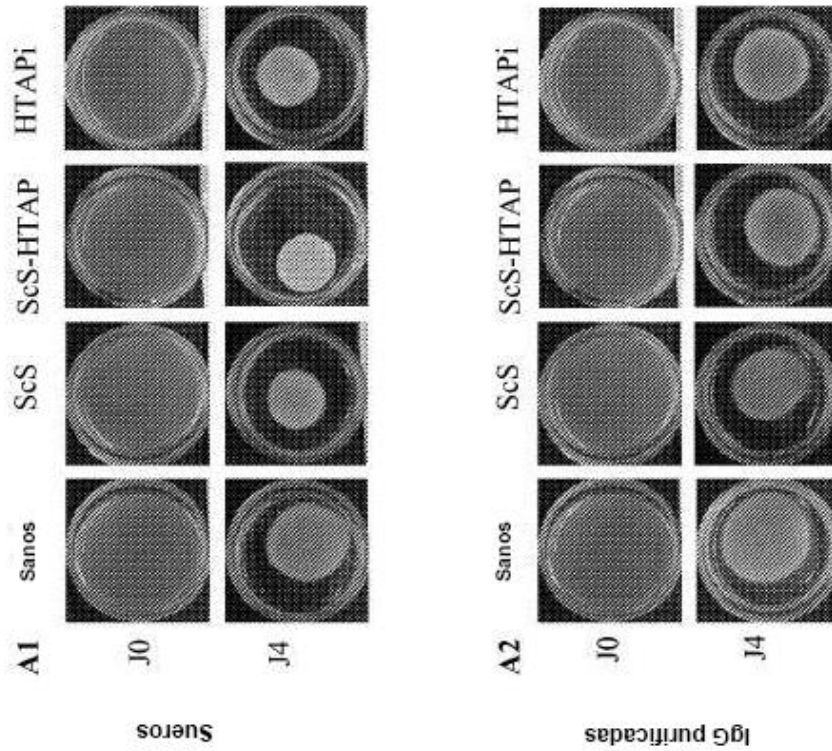


Figura 9



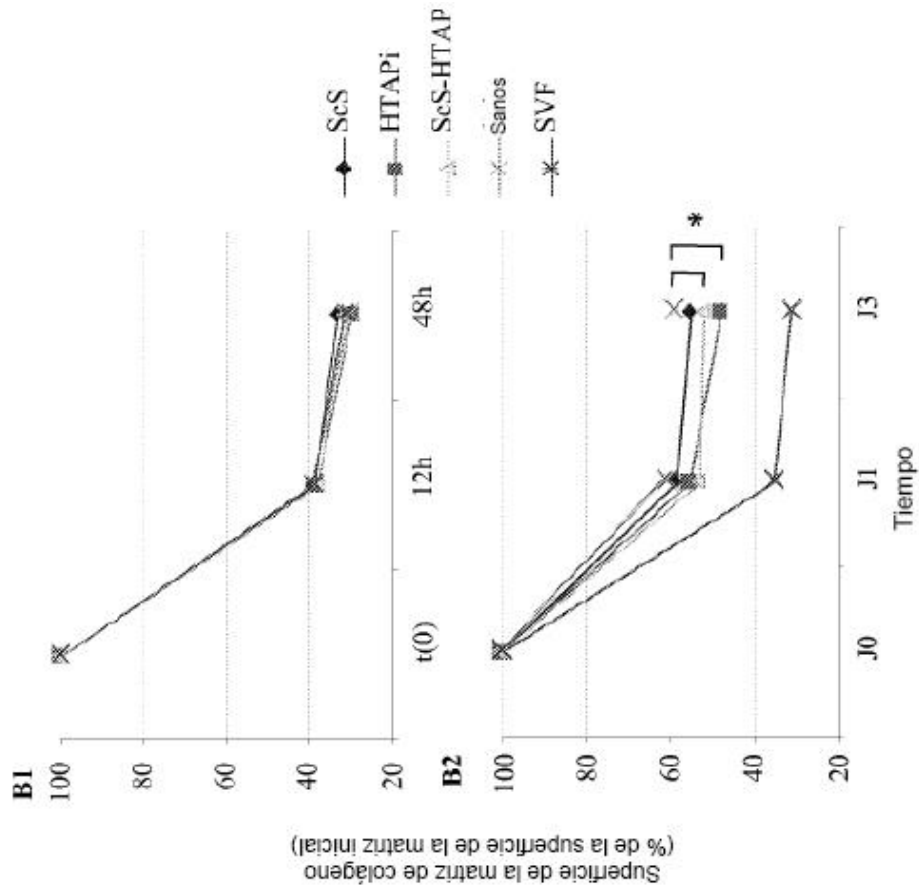


Figura 10

