

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 187**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012** **E 12733615 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016** **EP 2721413**

54 Título: **Biomarcadores para enfermedades hepáticas autoinmunes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

16.06.2011 EP 11170252

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2016

73 Titular/es:

**ISTITUTO NAZIONALE DI GENETICA
MOLECOLARE-INGM (100.0%)
Via Francesco Sforza 28
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**BOMBACI, MAURO;
ABRIGNANI, SERGIO y
ZINGARETTI, CHIARA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 569 187 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

Biomarcadores para enfermedades hepáticas autoinmunes y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del inmunodiagnóstico y/o del pronóstico de las enfermedades hepáticas autoinmunes.

10 **Estado de la técnica**

Las enfermedades hepáticas autoinmunes (EHA) son trastornos crónicos y progresivos con una etiología poco conocida. Las EHA más comunes son la hepatitis autoinmune (HAI) y la cirrosis biliar primaria (CBP).

15 La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad necroinflamatoria crónica y una de las enfermedades hepáticas autoinmunes más comunes. La HAI tiene una incidencia de 1-2 por 100.000 al año, y una prevalencia de 1-10/100.000. Al igual que con la mayoría del resto de enfermedades autoinmunes, afecta a las mujeres con mayor frecuencia que a los varones (80 %), con una proporción entre sexos de aproximadamente 3:1 (mujeres con respecto a varones) (Czaja A. J. *et al.*, 2010, *Gastroenterology*; Makol *et al.*, 2011, "Hepatitis research and treatment"). Histológicamente, se caracteriza por: hepatitis de interfase e infiltración de células plasmáticas; suele producirse hipergammaglobulinemia; se puede detectar un número de autoanticuerpos tales como anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpo anti-músculo liso (SMA), anticuerpo microsomal hepático/renal (LKM-1), LC1, anti-actina, anti-ASGPR (Bogdanos D. P. *et al.*, 2009, *Semin Liver Dis*). La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad lentamente progresiva que causa la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos de tamaño pequeño y mediano (Selmi C. *et al.*, 2011, *Imm Cell Bio*). Afecta a las mujeres en el 90 % de los casos. La prevalencia se estima en 0,6-40/100.000. Se ha demostrado que el ácido ursodesoxicólico mejora la bioquímica sérica, la histología y la supervivencia del paciente (Muratori L. *et al.*, 2010, *Dig Liver Dis*; Muratori L. *et al.*, 2008, *Clin Liver Dis*). Se caracteriza por: anticuerpos anti-mitocondriales-AMA- (~90 %) y colestasis intrahepática (aumento de la fosfatasa alcalina -Alk Ph-, exploración ecográfica -US-normal).

30 La detección de los autoanticuerpos AMA se realiza rutinariamente por inmunofluorescencia en cortes de múltiples órganos recién preparados (hígado, riñón, estómago) de roedores, pero esta técnica puede presentar muchos problemas intrínsecos tales como la normalización y la interpretación de los patrones inmunomorfológicos (Bogdanos *et al.*, 2008, *WJG*). Para resolver estos problemas metodológicos, el Grupo Internacional de la Hepatitis Autoinmune estableció un comité representativo a nivel internacional para definir las directrices, y desarrollar procedimientos y normas de referencia para realizar ensayos más fiables (Vergani *et al.*, 2004, *Journal of Hepatology*). En los últimos años, se han identificado y caracterizado algunos autoantígenos de dianas de EHA (Zachou, K., *et al.*, 2004, *J of Autoimm Dis*), pero se sabe poco sobre su papel patogénico, y probablemente todavía se desconocen muchos autoantígenos. Para que los autoanticuerpos tengan un papel patogénico, se han de cumplir dos características: (i) el autoantígeno debe expresarse en el órgano diana y exponerse a los autoanticuerpos; (ii) los autoanticuerpos deben tener actividad funcional. Song Q. *et al.* (2010, *J. Proteoma Res*) describieron la identificación de biomarcadores muy específicos y su validación para la HAI. Este estudio demuestra que se puede usar la combinación de seis autoantígenos para diagnosticar muestras de suero positivas en HAI y que estos autoantígenos se pueden usar eficazmente en ensayos con micromatrices de proteínas, así como en ensayos tradicionales basados en ELISA.

50 El documento US2009/0023162 desvela los métodos para la identificación de anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos atípicos (ANCA), kits adecuados para los mismos y la aplicación de dichos métodos para el diagnóstico de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas y enfermedades hepáticas autoinmunes.

El documento RU 2247387 (C1) proporciona un método que implica la determinación de anticuerpos anti-mitocondriales, inmunoglobulinas tales como IgA, IgM, IgG, gammaglobulinas, anticuerpos anti-gliadina y complejos inmunes circulantes para el diagnóstico de lesiones hepáticas autoinmunes en pacientes con hepatitis crónica.

55 Sin embargo, hasta la fecha, no hay ensayos precoces ni precisos que se puedan usar para identificar individuos portadores o que se encuentren en riesgo de desarrollar la EHA. Un diagnóstico precoz es claramente importante.

Dalekos G. 2002 *European J. Int. Medicine*, vol. 13, n.º 5, pág. 293-303 y Jones D. E. 2000 *Journ. Clin. Pathol.* Vol. 53, n.º 11, pág. 813-821, desvelan algunos autoantígenos en la HAI y la CBP.

60 **Descripción de la invención**

Aunque la identificación de algunos autoanticuerpos se encuentra en documentos de la técnica anterior, todavía existe la necesidad de identificar nuevos biomarcadores, concretamente, autoanticuerpos, para diagnosticar la enfermedad hepática autoinmune (EHA) y/o diferenciar entre las patologías hepáticas autoinmunes y otras patologías del hígado, y/o controlar la eficacia de los tratamientos en pacientes con la enfermedad hepática

autoinmune y la progresión de la enfermedad. En la presente divulgación, un sujeto con enfermedad hepática autoinmune se denomina "paciente con EHA o autoinmunidad hepática" y padece la HAI o la CBP.

5 En la presente divulgación, se identificó un panel de 17 autoantígenos en pacientes con EHA mediante matriz de proteínas. Además, 6 de los 17 autoantígenos se validaron también mediante el método de fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA®) en pacientes diagnosticados de enfermedades hepáticas autoinmunes, y mostraron sensibilidades individuales que variaron del 42 % al 74 %. La evaluación combinada de estos seis autoantígenos muestra una sensibilidad del $82 \% \pm 4 \%$ y casi el $90 \% \pm 3 \%$ de especificidad.

10 Estos seis autoantígenos representan nuevos marcadores de la autoinmunidad hepática, tal como la HAI y la CBP. Estos marcadores pueden mostrar una sensibilidad y una especificidad mucho más elevadas (frente a otras enfermedades tales como el VHC y VHB) en comparación con los marcadores de referencia (CYP2D6 y ASGPR, como se describe en el apartado de Métodos). Por lo tanto, los autoantígenos identificados son herramientas valiosas para el desarrollo de un nuevo ensayo serológico que es fácil de realizar y muy específico de las enfermedades EHA. Este ensayo podría contribuir significativamente a la mejora del diagnóstico de la EHA, y a diferenciar entre la CBP y la HAI.

20 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método *in vitro* de diagnóstico o pronóstico o evaluación del riesgo de desarrollar un trastorno autoinmune hepático perteneciente al grupo de la HAI y la CBP en un sujeto, que comprenda las etapas de:

25 a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 en condiciones apropiadas para la unión de autoanticuerpos, si están presentes en la muestra biológica, a dicha proteína, y
 b) detectar la presencia de autoanticuerpos unidos. En el contexto de la presente divulgación, el término "proteína" incluye:

30 i. la proteína entera, variantes alélicas y sus ortólogos;
 ii. cualquier fragmento inmunológico, sintético o recombinante o proteolítico de una proteína que tenga la capacidad de ser reconocida por y de unirse a anticuerpos dirigidos contra la proteína;
 iii. cualquier equivalente funcional comprendido en el grupo de análogos funcionales sintéticos o recombinantes que tenga la capacidad de ser reconocido por y de unirse a anticuerpos dirigidos contra la proteína.

35 En una realización preferida, la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con la proteína que tiene las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y al menos otra proteína adicional seleccionada del grupo de 16 proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 25, variantes alélicas, ortólogos, fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos.

40 En una realización adicional, la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con tres proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 11, 17, variantes alélicas, ortólogos, fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos.

45 En una realización preferida adicional, la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con cuatro proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 10, 11, 17, variantes alélicas, ortólogos, fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos.

50 En una realización preferida adicional, la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con seis proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 6, 8, 10, 11, 17, variantes alélicas, ortólogos, fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos.

Preferentemente, la muestra biológica está comprendida en el grupo de sangre, suero, plasma, orina, saliva, moco, o fracciones de los mismos.

55 Preferentemente, la muestra biológica es de un adulto o de un adolescente. Preferentemente, la detección de dichos autoanticuerpos unidos se realiza por medio de la unión a ligandos específicos. Más preferentemente, los ligandos se conjugan con medios de detección.

60 También se desvela un método de control de un trastorno hepático autoinmune después del tratamiento con cirugía y/o terapia en un sujeto con dicho trastorno hepático autoinmune, que comprende la etapa de seguir la modulación de los anticuerpos como se desvela.

65 En un aspecto preferido, dichas proteínas o fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos se muestran en una o más micromatrices de proteínas.

Es otro objetivo de la invención proporcionar el uso de una micromatriz de proteínas que comprende al menos las proteínas definidas, o los fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos, para realizar el método de acuerdo con la invención.

5 Es otro objetivo de la invención proporcionar el uso de un soporte sólido para un ensayo de inmunodiagnóstico que comprenda al menos las proteínas definidas, o los fragmentos inmunológicos o equivalentes funcionales de los mismos, para realizar el método de acuerdo con la invención.

10 También se desvela el uso de un kit de inmunodiagnóstico que comprenda el soporte sólido anterior y los medios de detección para realizar el método de acuerdo con la invención.

En la presente divulgación, un sujeto con enfermedad hepática autoinmune se denomina "paciente de EHA o autoinmunidad hepática", y padece cualquier enfermedad hepática autoinmune tal como la HAI y la CBP.

15 Los pacientes con VHC son pacientes diagnosticados de hepatitis C y que presentan anticuerpos autorreactivos, o pacientes con infección por el VHC o pacientes con hepatitis C y enfermedades autoinmunes no hepáticas tales como crioglobulinemia y disfunciones de la tiroides.

20 Descripción detallada de la invención

A continuación, se describirá la invención por medio de ejemplos no limitantes que se refieren a las siguientes figuras.

25 **Figura 1: a)** SDS-PAGE de un conjunto representativo de proteínas humanas recombinantes purificadas teñidas con azul de Coomassie; **b)** análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-marcador de histidina (His); los marcadores del peso molecular se muestran a la izquierda en kDa.

30 **Figura 2: a)** Representación de la curva de IgG humana de control. Los puntos corresponden a la señal media experimental (intensidad media de fluorescencia, eje y) detectada para cada concentración de IgG presentada en el eje x en nanogramos por punto (ng/punto), mientras que la línea continua corresponde a la curva sigmoide resultante interpolada. *Intervalo dinámico*: se refiere a un intervalo de valores que se puede medir mediante una señal (es decir, intensidad media de fluorescencia). *Intervalo lineal*: es el intervalo de concentración en el que la intensidad de la señal es lineal, es decir, directamente proporcional a la concentración de puntos; **b)** número de proteínas detectadas con el mAb anti-His. Aproximadamente el 90 % de las proteínas se aplicaron puntualmente correctamente en los portaobjetos (es decir, aproximadamente el 90 % de las proteínas produjo señales que fueron significativamente superiores a la señal de fondo). Histogramas: las proteínas se consideraron "Presentes" cuando al menos dos de las cuatro réplicas dieron una señal por encima del fondo, de lo contrario, se consideraron "Ausentes"; **c)** se sondó la micromatriz de proteínas humanas que contenía 1.626 proteínas recombinantes marcadas con His con un anticuerpo mAb anti-His seguido de un anticuerpo α -ratón secundario marcado con Alexa-647. Toda la micromatriz incluía 24 rejillas (como la que se muestra en el recuadro ampliado), conteniendo cada una 304 puntos de proteínas e incluyendo también controles positivos (tales como proteínas virales y bacterianas) y negativos (tales como tampón o BSA) (fases de control positivo y de control negativo), así como la curva de calibración de IgG (curva hulgG) para la normalización de los datos. Las proteínas y los controles siempre se aplicaron puntualmente por cuadruplicado, mientras que las IgG se aplicaron puntualmente en ocho réplicas. **d)** correlación entre las intensidades de los puntos de dos portaobjetos diferentes (portaobjetos 1 frente a portaobjetos 45) del mismo lote. El diagrama de dispersión indica una correlación positiva. El coeficiente de correlación es de 0,9, lo que indica una alta reproducibilidad de las señales derivadas de las proteínas aplicadas puntualmente.

35 **Figura 3:** Diferencias en la inmunorreactividad entre muestras de suero. Imagen representativa de las micromatrices de autoantígenos incubadas con **a)** suero de un paciente con EHA y **b)** suero de un donante sano (DS). **c)** Comparación de las intensidades de fluorescencia medias (IFM) de todas las proteínas aplicadas puntualmente frente a dos poblaciones de suero: Donantes Sanos (DS), pacientes con Enfermedades Hepáticas Autoinmunes (EHA). Cada punto representa la IFM de una sola proteína. Se usó un valor de corte ≥ 4.000 para marcar una proteína como positiva. Asteriscos: significación estadística, prueba t de Student (val de $p < 0,01$). **d)** Porcentaje de antígenos reconocidos por más del 15 % de los sueros ensayados; el umbral se determinó basándose en el reconocimiento medio de los DS (barras de la izquierda), y el porcentaje de sueros reactivos para cada población (es decir, sueros que reaccionan con más del 3 % de las proteínas exploradas; el umbral se determinó basándose en la reactividad media de los DS) (barras de la derecha). Asterisco; significación estadística (prueba χ^2 (valor de $p < 0,01$)).

40 **Figura 4: a)** Agrupación jerárquica del grupo de preparación (panel superior) y el grupo de ensayo (panel inferior) con respecto a los 25 autoantígenos seleccionados como reconocidos específicamente por los pacientes con EHA basándose en i) una frecuencia más alta de reconocimiento e ii) intensidades de fluorescencia medias superiores en comparación con donantes sanos. Los sueros se representan en columnas, mientras que las proteínas están en filas. El color rojo indica inmunorreactividad positiva, y el azul, baja o ninguna inmunorreactividad; **b)** Gráfico de barras de las intensidades de fluorescencia medias de los 25 autoantígenos seleccionados del grupo de muestras del descubrimiento (grupo de preparación y de ensayo). No se observaron diferencias significativas entre los sueros de los pacientes con EHA y VHC para diecisiete autoantígenos (en el

recuadro). Asteriscos, p val < 0,01 (prueba t de Student). $P^{(a)}$: p-val de los pacientes con EHA frente a los pacientes con hepatitis C, $P^{(b)}$: p-val de la EHA frente a los donantes sanos.

Figura 5: Diagramas de cajas de los resultados del DELFIA para los 17 autoantígenos ensayados. Se muestran las distribuciones de las señales tras la transformación logarítmica natural. Las cajas definen el rango intercuartílico (RIC). Los valores extremos más allá del RIC de 1,5 + mediana se muestran como puntos. También se compararon tres proteínas de control de EHA conocidas (AGPR-1, CYP2D6, PDH) (caja gris). DS: Donantes Sanos; EHA: Enfermedad Hepática Autoinmune, HV: Hepatitis Viral.

Figura 6: Se confirman seis proteínas como autoantígenos de HAI en el ensayo de DELFIA®. Frecuencia de reconocimiento de los seis mejores autoantígenos determinada mediante DELFIA®. Las proteínas se ensayaron con sueros de pacientes de EHA (n = 50 HAI y n = 50 CBP), donantes sanos (n = 50) y pacientes con hepatitis viral VHB o VHC (VH) (n = 74). Cada suero se ensayó 3 veces en experimentos independientes. Asterisco: significación estadística (prueba exacta de Fisher, valor de $p < 0,01$).

Figura 7: La combinación de los seis autoantígenos identifica a los pacientes con EHA con alta sensibilidad y especificidad. (a) Los números de los recuadros indican sueros de HAI y DS que, en el ensayo DELFIA®, reconocen (positivos) o no reconocen (negativos) la combinación de seis (i), cuatro (ii) o tres (iii) de los seis autoantígenos. La sensibilidad (SE) y la especificidad (SP) con intervalos de confianza del 95 % (IC) se indican en la parte inferior de los paneles. Los valores de p se calcularon con pruebas χ^2 . (b) Se calcularon los modelos de regresión logística para los seis, cuatro y tres autoantígenos (curvas rojas) y las tres proteínas de control conocidas (AGPR1, CYP2D6, PDH) (curvas negras), y se representaron como curvas ROC y los valores correspondientes del área bajo la curva (AUC).

Material y métodos

Muestras de suero

Las muestras usadas para el presente estudio se recogieron en cinco hospitales diferentes: i) Policlínico Ospedale Maggiore, Unidad de transfusiones, Milán; ii) Unidad de hepatología, Hospital universitario, Pisa, Italia; iii) Hospital universitario Sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Italia; iv) Centro de enfermedades hepáticas autoinmunes, IRCCS Instituto Clínico Humanitas, Rozzano, Italia; v) Centro para las manifestaciones sistémicas de los virus de hepatitis (MaSVE), Universidad de Florencia, Italia. Para la fase del descubrimiento, se usaron 218 sueros (15 de HAI, 15 de CBP, 78 de DS, 110 de VHC), mientras que para la fase de validación, se usaron 224 sueros (50 de HAI, 50 de CBP, 50 de DS, 50 de VHC, 24 de VHB). La Tabla 1 presenta las características clínicas y las edades de los pacientes y de los donantes inscritos en la presente invención, para el análisis de micromatriz (Ejemplo 2-3).

Tabla 1: Características clínicas de las muestras de suero usadas en la presente invención

	Grupo	Subgrupo ^A	n.º	Fuente*	Edad	Sexo	
					Media ± DE (mediana)	Gen (n.º)	
Descubrimiento	Grupo de preparación	Donantes sanos	39	1	44 ± 10 (46)	m (12) v (27)	
		Enfermedad hepática autoinmune	HAI	8	2	51 ± 20 (52)	m (8) v (0)
			CBP	7	2	50 ± 12 (52)	m (6) v (1)
	Grupo de ensayo	Donantes sanos	39	1,2	44 ± 10 (44)	m (8) v (31)	
		Enfermedad hepática autoinmune	HAI	7	2	49 ± 23 (54)	m (5) v (2)
			CBP	8	2	59 ± 22 (56)	m (8) v (0)
	Hepatitis viral	VHC	110	2,3	55 ± 15 (56)	m (41) v (69)	

Validación	Donantes sanos	DS	50	1	45 ± 9 -47	m (8) v (42)
	Enfermedad hepática autoinmune	HAI	50	2,4	45 ± 21 -49	m (41) v (9)
		CBP	50	2,4	nd ± nd (nd)	m (nd) v (nd)
	Hepatitis viral	VHC	50	5	52 ± 20 -52	m (20) v (30)
		VHB	24	2	51 ± 14 -52	m (8) v (16)

*Origen de las muestras: (1) Unidad de transfusiones, Policlínico Ospedale Maggiore, Milán; (2) Hospital universitario Sant'Orsola-Malpighi, Bologna; (3) Unidad de hepatología, Hospital universitario, Pisa; (4) Centro de enfermedades hepáticas autoinmunes, IRCCS Instituto Clínico Humanitas, Rozzano; (5) Centro para las manifestaciones sistémicas de los virus de hepatitis (MaSVE), Florencia.

^DS: Donante Sano; HAI: Hepatitis AutoInmune; CBP: Cirrosis Biliar Primaria; VHC: pacientes con hepatitis viral C crónica; VHB: pacientes con hepatitis viral B crónica.

Proteínas humanas: selección, expresión y purificación

Se seleccionaron, se clonaron y se expresaron genes cuyos productos traducidos portan a un péptido señal de secreción o al menos un dominio transmembrana en un sistema de producción como productos marcados con histidina según lo descrito (Grifantini R. *et al.*, 2011, *Journal of proteomics*). Se expresaron 1.626 proteínas o dominios de proteínas de longitud completa en *E. coli* y se purificaron de la fracción insoluble bacteriana mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, GE).

En la micromatriz, se usaron proteínas humanas, virales o bacterianas como controles biológicos o técnicos. En particular, se subclonaron los genes que codificaban la proteína del núcleo y proteínas no estructurales NS3 (del VHC de genotipo 1), NS3-4a (del VHC de genotipo 2), NS5b (del VHC de genotipo 1), toxina del tétanos y H1N1 en la cepa DH5α de *E. coli*, y se expresaron en BL21(DE3), respectivamente. Se adquirieron albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano, glutatión-S-transferasa humana y proteína A de *Staphylococcus aureus* en Sigma.

Para los experimentos DELFIA®, la proteína piruvato deshidrogenasa (PDH) se adquirió en Sigma, mientras que los genes codificantes del citocromo P450 2D6 (CYP2D6) y del receptor 1 de asialo-glicoproteína (ASGR-1) de clones de ORF humano Ultimate™ se adquirieron en Invitrogen, y se subclonaron en la cepa DH5α de *E. coli* y se expresaron en BL21(DE3), respectivamente. Todas las proteínas correspondientes se purificaron mediante cromatografía de afinidad en resina de IMAC.

Control de calidad de las proteínas

Las proteínas recombinantes purificadas (10-15 µg de proteína total), obtenidas como se ha descrito anteriormente, se almacenaron a 4 °C y se analizaron mediante SDS-PAGE (sistema de PAGE Criterion de Bio-Rad) seguido de tinción con azul de Coomassie del gel inmediatamente antes de su aplicación puntual, para evaluar su integridad y el nivel de pureza. Las proteínas que mostraron niveles de pureza > 70 % (XRS ChemiDoc™, software Quantity One®, Bio-Rad) se usaron para la preparación de la matriz de proteínas.

Para el análisis de transferencia Western, se resolvieron alícuotas (0,5 µg) de las proteínas en geles de Tricina con gradiente de SDS-PAGE prefabricados al 4-12 % en condiciones reductoras, y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en 1 x PBS más Tween 20 al 0,1 % (TPBS) durante 1 h a temperatura ambiente, se incubaron con el mAb α-His (GE-Healthcare) diluido 1: 1.000 en leche desnatada al 3 % en TPBS al 0,1 % durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavaron tres veces en TPBS al 0,1 % (Fig. 1). El anticuerpo secundario conjugado con HRP (inmunoglobulina de ratón α/HRP, GE-Healthcare) se diluyó 1:1000 en leche desnatada al 3 % en TPBS al 0,1 %, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate Thermo Scientific, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó con un LAS-3000 (Fujifilm, EE.UU.).

Impresión de micromatrices de proteínas

Se generaron micromatrices de proteínas mediante la aplicación puntual de las 1.626 proteínas recombinantes purificadas por afinidad (0,5 mg/ml, en urea 6 M) en 4 réplicas sobre portaobjetos recubiertos con nitrocelulosa (portaobjetos FAST, GE-Healthcare) usando los alfileres de aplicación puntual SMP3® de Stealth (TeleChem Internacional, Sunnyvale, California) y una impresora de contacto de micromatrices Microgrid II (Biorobotics), dando lugar a puntos de aproximadamente 130 µm de diámetro. Como control positivo experimental, para evaluar la sensibilidad y la reproducibilidad de las matrices y para la normalización de la señal, se aplicó puntualmente una curva de IgG humanas a 11 concentraciones diferentes (soluciones de 0,001 a 1 mg/ml) en 8 réplicas (en urea 6 M), y se detectaron con anticuerpo secundario IgG humana α conjugado con Alexa-647 (Invitrogen). Como controles negativos, se imprimió y se usó el tampón de aplicación puntual solo, para evaluar las posibles señales inespecíficas debidas a la contaminación cruzada.

Se realizó un control de calidad del procedimiento de aplicación puntual en el 10 % de los portaobjetos seleccionados al azar, mediante la confirmación de la presencia de las proteínas inmovilizadas totales usando el mAb α-His, seguido de la detección usando un anticuerpo secundario IgG humana-α conjugado con Alexa-647 (Fig. 2). Se dejaron permanecer las micromatrices aplicadas puntualmente a temperatura ambiente durante 1 h antes de su almacenamiento a 4 °C hasta su uso.

Incubación y exploración de la micromatriz de proteínas

La incubación se realizó automáticamente con una estación de hibridación TECAN (SA 4800™ Pro; TECAN, Salzburgo, Austria). Se lavaron previamente los portaobjetos de las micromatrices 3 min en TPBS y Tween 20 al 0,1 %, y se saturaron con tampón de bloqueo de micromatrices BlockIt™ (Arrayit Corporation) durante 45 min a 25 °C con agitación suave. Tras la inyección de 105 µl de suero individual (diluido 1:300 en tampón de bloqueo más Tween 20 al 0,1 %), se realizó la incubación a 25 °C durante 45 min con baja agitación. Se lavaron las micromatrices a 25 °C en TPBS durante tres ciclos de tiempo de lavado de 1 min y de tiempo de inmersión de 30 s.

Tras ello, se incubaron los portaobjetos de las micromatrices a 25 °C durante 1 con IgG humana-α conjugada con Alexa-647 (Invitrogen) diluida a 1:800 en tampón de bloqueo a oscuras. Se volvieron a lavar las micromatrices a 25 °C en TPBS durante dos ciclos de tiempo de lavado de 1 min y de tiempo de inmersión de 30 s, en PBS durante dos ciclos de 1 min: 30 s, y finalmente en agua estéril milliQ durante un ciclo de 15 s.

Finalmente, se secaron los portaobjetos de las micromatrices a 30 °C en atmósfera de nitrógeno durante 2 minutos, y se rastrearon usando un ScanArray Gx PLUS (PerkinElmer, Bridgeport Avenue Shelton, EE.UU.). Se generaron imágenes de 16 bits con el software ScanArray™ a una resolución de 10 µm por pixel, y se procesaron usando el software ImaGene 8.0 (Biodiscovery Inc, CA, EE.UU.). Se usó un láser de 635 nm para excitar el colorante Alexa-647. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada punto, se calcularon las proporciones de la señal con respecto al fondo local con ImaGene, y se consideró la morfología y la desviación de los puntos con respecto a la posición esperada de los puntos usando los ajustes por defecto de ImaGene.

Análisis de los datos

Para cada muestra, se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los puntos por duplicado, tras restar el valor de fondo para cada punto, y posteriormente se normalizó basándose en la curva de IgG humana para permitir la comparación de los datos de un conjunto diferente de experimentos (Bombaci M. *et al.*, 2009, PLoS One). En resumen, los valores de IFM de la IgG, aplicada puntualmente a diferentes concentraciones, se ajustaron mejor mediante una curva sigmoide, usando un estimador de máxima verosimilitud (Harris J. W. *et al.*, 1998, "Handbook of Mathematics and Computational Science"). Se ajustó la curva de IgG media experimental de cada portaobjetos a la curva de IgG sigmoide de referencia, y los valores de IFM con la resta del fondo de cada proteína se normalizaron correspondientemente. Basándose en estos resultados, se seleccionó un valor de IFM normalizado de 4.000 como el umbral de señal más baja para clasificar una proteína como reconocida positivamente por sueros humanos. Para cada proteína, se calculó un Coeficiente de Variación (CV %), sobre los cuatro puntos por duplicado, para la reproducibilidad intraensayo (Bombaci *et al.*, 2009, PLoS One).

Se definió la frecuencia de reconocimiento como el porcentaje de sueros que reaccionan con un determinado antígeno en la matriz de proteínas con una IFM > 4.000, y se calculó para cada grupo de sueros. Se usó el software TIGR Multiexperiment Viewer (versión MeV4.5) (Saeed, A. I., *et al.*, 2006, "Methods in enzymology") para realizar una agrupación jerárquica bidimensional sin supervisión.

Ensayos de fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por lantánidos DELFIA®

El ensayo DELFIA® es un método de fluorescencia resuelta en el tiempo que se puede usar para estudiar la unión de los anticuerpos a proteínas o péptidos en fase sólida. Las proteínas recombinantes purificadas se usaron a una concentración de 20 µg por mililitro (Frulloni L. *et al.*, 2009, *N Engl J Med*) en urea 6 M para recubrir placas DELFIA® (PerkinElmer). A continuación, se bloquearon las placas durante 1 hora a 37 °C con un reactivo de bloqueo

(PerkinElmer). Luego se desechó el tampón de bloqueo, y se diluyeron las muestras de suero en una solución a 1:300 en solución salina tamponada con fosfato más albúmina de suero bovino al 1 % (Sigma), más Tween 20 al 0,1 % (Sigma), y se incubaron en las placas 1 hora a 37° C. Luego, se lavaron las placas 5 veces con tampón de lavado (PerkinElmer). Los anticuerpos unidos se detectaron con suero de IgG humana- α marcada en europio (1:500 en tampón de dilución, PerkinElmer), y se incubaron 30 min a TA a oscuras. Se volvieron a lavar los pocillos en el mismo tampón de lavado. Después de una incubación de 10 min a TA, se leyeron las placas en un instrumento F200 PRO Infinite (Tecan). Se consideraron positivos los valores de intensidad de fluorescencia superiores a la media de tampón más 3 desviaciones estándar.

10 Análisis estadístico

Se compararon los resultados de los experimentos de micromatrices de proteínas y de DELFIA® de sueros de pacientes y donantes sanos mediante la prueba χ^2 de dos colas, la prueba t de Student o las pruebas exactas de Fisher. Se usó la prueba de ANOVA para todos los demás análisis. Se usó la corrección de Benjamini-Hochberg para múltiples ensayos para el análisis de los datos de las micromatrices. El análisis estadístico se llevó a cabo con el uso del software GraphPad Prism 5, versión 5.01. Para evaluar el rendimiento de las combinaciones de autoantígenos en la diferenciación de los pacientes con EHA de los donantes sanos o los pacientes con VHC, se realizó un análisis de regresión logística con R. We, las señales de 6, 4 o 3 autoantígenos we seleccionados respectivamente crearon modelos de regresión logística. Las probabilidades se calcularon de la siguiente manera: $p = \exp((\sum(b_i x_i) + c) / (1 + \sum(b_i x_i) + c))$, donde p es la probabilidad de cada caso, $i = 1$ a n ; b es el coeficiente de regresión de un autoantígeno d_i , x es la intensidad de la señal y c es una constante generada por el modelo. Se usó el paquete ROCR para obtener las curvas ROC de los modelos y los valores del área bajo la curva (AUC) (Sing T. *et al.* 2005, "Bioinformatics").

25 Ejemplos

Ejemplo 1 - Diseño y desarrollo de una micromatriz de la proteínas humanas

Para estudiar el perfil serológico de los pacientes diagnosticados con enfermedades hepáticas autoinmunes frente a un panel de proteínas propias, los autores desarrollaron una matriz de proteínas mediante la impresión de 1.626 productos recombinantes humanos (véanse los detalles en el apartado de "Materiales y métodos") correspondientes a 1.371 proteínas humanas distintas distribuidas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Ubicación subcelular predicha de las proteínas recombinantes humanas usadas para la construcción de las micromatrices (Grifantini *et al.*, 2011).

Compartimento	% de proteínas
Membrana celular	46
Secretado	23
Membrana intracelular	11
Citoplasma	11
Membrana mitocondrial	4
Núcleo	4
Mitocondria	1

En resumen, primero se seleccionaron 1.329 de las 1.371 proteínas a través de un análisis bioinformático de todo el genoma humano como secuencias traducidas portadoras de i) péptidos de señal; ii) al menos un dominio transmembrana; e iii) que tenían función biológica desconocida. Cuarenta y dos de las 1.371 proteínas tenían una función inmunológica bien conocida, número de CD asignado y estaban todas expuestas a la superficie. La mayoría de las proteínas humanas impresas se expresaron como fusiones N-terminales marcadas con His mientras que 48 proteínas se expresaron como fusiones marcadas doblemente, con una glutatión S-transferasa (GST) N-terminal y con histidinas C-terminales. Las proteínas obtenidas tras la purificación por afinidad de la fracción insoluble bacteriana mostraron niveles de pureza > 70 %, estimados por exploración densitométrica de geles de SDS-PAGE (véase "Materiales y métodos") (Figura 1a). Por otra parte, se realizó un análisis de transferencia Western en muestras aleatorias de proteínas con el mAb anti-His. Aproximadamente el 80 % de las proteínas sondadas dio una señal positiva. Además, para casi el 90 % de estas últimas proteínas, los pesos moleculares de las bandas detectadas por transferencia Western correspondieron a los observados mediante SDS-PAGE (Figura 1 b).

Se prepararon matrices de proteínas mediante la impresión sobre cuatro duplicados de portaobjetos de vidrio cubiertos de nitrocelulosa de cada proteína. Además, se incluyeron en la matriz varios controles biológicos y técnicos, incluyendo proteínas humanas, virales y bacterianas ("Materiales y métodos"). Los duplicados se distribuyeron aleatoriamente para obtener una reproducibilidad óptima de la señal. Por otra parte, también se imprimieron once cantidades diferentes de IgG humanas a una concentración conocida (de $8,24 \times 10^{-4}$ a 7×10^{-1} ng de proteína inmovilizada/punto) en la matriz en ocho duplicados (Figura 2a). La calidad de las proteínas

inmovilizadas en las matrices se determinó mediante el sondeo del 10 % de los portaobjetos con un mAb anti-His, y el 89 % de las proteínas produjeron señales que fueron significativamente superiores al fondo (Figura 2b). El diseño final de la matriz de proteínas consistió en 24 rejillas, cada una de 304 puntos, para un total de 7.296 puntos (Figura 2c). La correlación entre las intensidades de los puntos de dos portaobjetos diferentes de un mismo lote indica una alta reproducibilidad de las señales derivadas de las proteínas aplicadas puntualmente (Figura 2d).

Ejemplo 2- Los pacientes afectados por enfermedades hepáticas autoinmunes muestran mayor auto-inmunorreactividad en comparación con los donantes sanos

En un intento por determinar un panel de autoantígenos reconocidos diferencialmente por sueros de pacientes con EHA en comparación con los individuos sanos (DS), se sondaron las micromatrices de proteínas con un conjunto de muestras (definido como *Conjunto de preparación* como se indica en la Tabla 1 en el apartado de “Materiales y métodos”) que comprendía 15 sueros de pacientes con EHA y 39 sueros de donantes sanos. Las características clínicas de cada grupo de sueros se resumen en la Tabla 1.

Se evaluó la reactividad de los sueros mediante la detección de la IgG total unida a cada punto de proteína usando IgG humana- α conjugada con Alexa-647 y la medición de los valores de intensidad de fluorescencia (IF) para cada proteína. Para comparar los datos de los diferentes experimentos, se usó un método de normalización, como se ha descrito anteriormente (Bombaci M *et al.*, 2009, PLoS One). En resumen, se ajustó la curva de IgG media experimental de cada portaobjetos a una curva de IgG sigmoide de referencia, y los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) con la resta del fondo de cada proteína se normalizaron correspondientemente. Basándose en estos resultados, se seleccionó un valor de IFM normalizado de 4.000 como el umbral de señal más baja para clasificar una proteína como reconocida positivamente por sueros humanos.

En primer lugar, se evaluó la reactividad total de los pacientes frente a sueros de donantes sanos. En la Figura 3a y b, se muestran las imágenes representativas de una rejilla ampliada de la micromatriz sondada con sueros obtenidos de donantes sanos y de pacientes con EHA. Como se representa en la Figura 3c, la autorreactividad más potente se observó contra todas las proteínas presentes en las matrices de los sueros de pacientes con EHA, pero no en los sueros de control (grupo de DS).

También se observaron divergencias significativas entre los pacientes y los donantes sanos en cuanto a las frecuencias de reconocimiento, lo que indica niveles diferenciales de IgG específicos de la proteína. Figura 3D: en detalle, el porcentaje de proteínas reconocidas por más del 15 % de los sueros ensayados con IFM > 4.000 fue del aproximadamente 8 % (132 proteínas) en el caso de los dos grupos de pacientes, pero solo del 3 % (41 proteínas) en el caso de los donantes sanos (izquierda). Por otra parte, el 53 % de los pacientes con EHA contiene anticuerpos que reaccionan intensamente con al menos el 3 % de las proteínas de las matrices, mientras que solo el 18 % de los 39 controles resultó tener dichos anticuerpos (panel de la derecha). En ambos casos, las diferencias observadas entre la reactividad de los pacientes y de los donantes sanos fueron estadísticamente significativas (prueba de chi-cuadrado, valor de $p < 0,01$).

Ejemplo 3- Selección e identificación del perfil de autoantígenos reconocidos específicamente

Una vez establecido previamente que los pacientes con EHA del *Grupo de preparación* presentaban una mayor autorreactividad en comparación con los donantes sanos, los autores seleccionaron los autoantígenos reconocidos específicamente por dichos pacientes. Tras la normalización, cada autoantígeno de la micromatriz de proteínas se clasificó de acuerdo con (i) la frecuencia de reconocimiento e (ii) la intensidad de fluorescencia media de los pacientes con EHA en comparación con los donantes sanos. Para considerarse de posible interés, las respuestas específicas del antígeno tenían que producirse con una intensidad de señal significativamente mayor en los sueros de los pacientes que en los sueros de los donantes sanos (valor p de la prueba $T < 0,01$). En particular, las proteínas debían ser reconocidas en menos del 10 % de los sueros de los donantes sanos y en al menos el 25 % de los sueros de los grupos de pacientes (valor p de la prueba de Fisher $< 0,01$). Mediante el uso de dicha metodología, los autores identificaron 25 proteínas distintas (Tabla 3) que mostraban una inmunorreactividad superior con los pacientes de EHA en comparación con los sueros de control.

Tabla 3: Breve descripción de las secuencias humanas enumeradas

SEQ ID NO	ID_prot	N.º de acceso de la proteína	Secuencia de aminoácidos
N.º: 1	YM0078	ENSP00000379111	PRAPGNLTVHTNVSDTLLLTWWSNPYPDPNYLYNHLTYAVNIWSEN DPADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKGISYRVRVRAWAQCYNNTW SEWSPST
N.º: 2	YM0120	ENSP00000386923	SNWGCYGNIQSLDTPGASCGIGRRHGLNYCGVRASERLAEIDMP YLLKYQPMMQTIGQKYCMDPAVIAGVLSRKSPGDKILVNMGDRTS MVQDPGSQAPTSWISQVSTTEVLTRIKEIQRRFPTWTPDQY LRGGLCAYS GGAGYVRSSQDLSCDFCNDVLARAKYLKRHGF

N.º: 3	YM0736	ENSP00000350556	MFVDNRIQKSMLLDLNKEIMNELGVTVVGDIIALKHAKVVHRQDM CKAATESVPCSPSPLAGEIRRGTSAASRMITNSLNHDSPPSTPPR RPDTSTSKISVTVSNKMAAKSAKATAALARREEESLAVPAKRRRV TAEMEGKYVINMPKGTTPRTRKILEQQQAAKGLHRTSVFDRLGAE TKADTTTGSKPTGVFSRLGATPETDEDLAWDSDNDSSSSVLQYA GVLKKLGRGPAK
N.º: 4	YM1414	ENSP00000404259	SQGVCSKQTLVVPLHYNESYSQPVKPYLTLCAGRRICSTYRTMY RVMWREVRREVQQTHAVCCQGWKKRHPGALTCEA
N.º: 5	YM1451	ENSP00000343084	HEAHKTSLSWVKHDQDWANVSNMTFSNGKLRVKGIYYRNADICS RHRVTSAGLTLQDLQLWCNLRVARGQIPSTL
N.º: 6	YM1503	ENSP00000375259	GVAEFHMSLTVSCPDPSTDPQGRHNREPILGRDDDFMCKQVK FRMCVVGDRDQNAQSSVRYTGPLYRRKIRTEFLFVVFLELRETKP QVNKNVQGRPS
N.º: 7	YM1535	ENSP00000288466	MVFVLTYPMPKGEVKKTHLHLASFSPSEVSCFTNKAQAKNCSV EGCPSEWSSPRNLRSTKISIGTIRATGGCLCSGTVLHFPIPGSASQ ASL
N.º: 8	YM1602	XP_934154	ATGILICMTKNLESVHSIVLAHSCYHHEKPRPDCCFQQKIRDTKS KVELPRHAHARLTNPQLTHRSMKINDCCIKPLRFGVTCYAAFCDN N
N.º: 9	YM1651	ENSP00000343493	AREEEITPVVSIAYKVLEVFPKGRWVLTCCAPQPPPPITYSLCGTK NIKVAKKVVKTHEPASFNLVTLKSSPDLLTYFCWASSTSGAHVD SARLQMHWELWSKPVSELNANFTLQDRGAGPRVEMICQASSGS PPITNSLIGKDGQVHLQQRPCHRQPANFSFLPSQTSDFWFCQAA NNANVQHSALTVPVPPGGDQKMEDWQGPLESPIALPLYRSTRRL SEEEFGGFRINGE
N.º: 10	YM1652	ENSP00000413076	VAKKVVKTHEPASFNLVTLKSSPDLLTYFCWASSTSGAHVDSAR LQMHWELWSKPVSELNANFTLQDRGAGPRVEMICQASSGSPIT NSLIGKDGQVHLQQRPCHRQPANFSFLPSQTSDFW
N.º: 11	YM1672	ENSP00000315731	AQYSSDRCSWKGSGLTHEAHRKEVEQVYLCAAGAVEWMYPTG ALIVNLRPNTFSPARHLTVCIRSFDTSSGANIYEKLGELRLLVPDG DGRPGRVQCQGLEQGGFVEATPQQDIGRRTTGQYELVRRHR ASDLHELAPCRPCSDTEVLLAVCTSDFAVRGSIQQVTHEPERQD SAIHLRVSRLYRQKSRVFEPVPEGDGHWQGRVRTLLECGVRPGH GDFLFTGHMHFGEAR
N.º: 12	YM1708	ENSP00000392824	MFGVLEGAQANSENWIAPSGPWALGLWSSLYFLLFSTLEGRGGR VLSQSCSMAVAASWISRENARSVKRSYMQSSPQRPKEPRNQR TSHTTPVC
N.º: 13	YM1801	ENSP00000367965	SGFTALHWAAKSGDGEMALQLVEVARRSGAPVDVNARSHGGYT PLHLAALHGHEAVALLVRLGAQVHVRDHSGRRAYQYLRPGSS YALRRLGDPGLRGTTPEPATGGGSGSLAARRPVQVAATILSSTT SAFLGVLADDLMLQDLARGLKSSFSKFLSASPMAPRKKTKIRG GLPAFSEISRRPTPGPLAGLVPSFPPTT
N.º: 14	YM1882	ENSP00000395006	SLIVFMEQVHRGIKGLVRDSHGKIPNAIISVEGINHDIRTANDGDY WRLNLPGEYVVTAKAEGFTASTKNCMVGYDMGATRCDFTLSTKN MARIREIMEKFGKQPVSLPARRLKLGRQKRRQRG
N.º: 15	YM1980	ENSP00000362968	GSLSPTKYNLLELKESCIRNQDCETGCCQRAPDNCESHCAEKGS EGSLCQTQVFFGQYRACPLRNLTCSIYSKNEKWLISYAGRCQKIG RQKLAKKMF
N.º: 16	YM 1989	ENSP00000415977	SQLELIDLSSNPFHCDCQLLPLHRWLTGLNLRVGATCATPPNARG QRVKA AAAVFEDCPGWAARKAKRTPASRPSARRTPIKGRQCGA DKVGHGAGGV
N.º: 17	YM2046	ENSP00000360191	GEAGGSLRWEPHCQQPLPDRVPSTAILPPRLNPGWISTGCEVR PGPEFLTRAYTFYPSRLFRAHQFYEDPFCGEPASLLVKGKVR RRASWVTRGATEADYHLHKVGIV
N.º: 18	YM2213	ENSP00000414589	ATKLVTCAPRQFVAVGAFAGRAWLFPASLGASFSKLRSSQRS RDFRGLFLRAERRAGGFTS

N.º: 19	YM2273	ENSP00000374868	SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWYLHQEGKAPQ RLLYDSYSSVVLESISPDKYDYGSTRKNLRMLRNLIENDSG VYYCATWDGHSDDPPYTLLKTCLVAASPREEGMRWALLVLLAF LSPAPPTVFCARDHFLVEWDLSEFERIFYSFSSGPFPSKAPERKA CSQKSSNLEGRMKSIVTRPTGSSAEITCDLTVINAVYIHWYLLQEG KTPQHLLHYDV
N.º: 20	YM2279	ENSP00000374896	AGVTQTPKFHVLKGTQSMTELLCAQDMNHEMYRYRQDPGKGLR LIYYSVAAALTDKGEVPGYVNSRNTEDFLKLESAAPSQTSVY FCASSYSTALQGCLLSAHKKGKGRCCPPPPPKTQGCPVQRSLHQE PWNPEWPQVARTV
N.º: 21	YM2315	ENSP00000374919	AKVTQTPGHLVKGKQKTKMDCTPEKGFVYVYQQNQNKEFM LLISFQNEQVLQETEMHKKRFSSQCPKNAPCSLAILSSEPGDTALY LCASSQSTALKCQFLLAHKLVTDPAQEAGDVLGWKGV TENNWS LKPQCNTLQGG
N.º: 22	YM2671	ENSP00000327628	RDKMRMQRIKVCERPSIDLCHHCSYFQKCE TNKICCSAFCGNIC MSIL
N.º: 23	YM2741	ENSP00000363414	PERWFPGSCHVFGQGHQLFHIFLVLCTLAQLEAVALDYEARPIY EPLHTHWPHN
N.º: 24	YM2779	ENSP00000395093	QLLMYQQHTSHYDLERKGGYLMFSIDFCPFSVMRLRSLPSPQR YTRQERYRARPPRVLERSGFHNENSLAIYQGLVYLLWLHVSVDH PYADPVHDPTWRWWANNKQDQDYFFLASNWRSAAGVSIEMD SYEKIYNLESAYELPERIFLDKGTEYSFAIFLSAQGHSFRTOSELGT AFQLHSQVDVGVVLADPGCIEASVKQEVLINRNSVLSITLKDKKL CYDQGISGHHLME
N.º: 25	YM2814	ENSP00000258969	VVEELKLSHNPLKSIPDNFQSFGRYLETLWLDNTNLEKFSDBGAFI GVTTLLKHVHLENNRLNQLPSNFPFDSLETALTNPNWKCTCQLRC LRRWLEAKASRPDATCASPAKFKGQHIRTDAFRSCKFPTKRSK KAGRH

Para confirmar los resultados anteriores, se usó un conjunto diferente de proteínas aplicadas puntualmente en la micromatriz. Esta micromatriz incluye ahora todas las proteínas identificadas como más reactivas del grupo de preparación incluyendo las 24 proteínas indicadas anteriormente (Tabla 4).

5

Tabla 4: Proteínas impresas en la micromatriz enfocada

N.º	N.º de acceso de la proteína	Descripción	Id de la matriz de proteínas
1	ENSP00000292144	Molécula CD3g, gamma (complejo CD3-TCR)	YM0066
2	ENSP00000418364	Molécula CD80	YM0071
3	ENSP00000377248	Molécula CD86	YM0072
4	ENSP00000228434	Molécula CD69	YM0073
5	ENSP00000216223	Receptor de interleucina 2, beta	YM0076
6	ENSP00000379111	Receptor de interleucina 4	YM0078
7	ENSP00000345501	Integrina, beta 7	YM0079
8	ENSP00000390133	Receptor de transferrina (p90, CD71)	YM0083
9	ENSP00000262817	Precursor de tipo proteína de transmembrana 59	YM0099
10	ENSP00000361001	Proteína que contiene el dominio mano EF KIAA0494	YM0100
11	ENSP00000363041	Proteína 1 que contiene el dominio sulfuro de hierro CDGSH	YM0107
12	ENSP00000296955	Precursor de la proteína 1 que contiene el dominio discoidina, CUB y LCCL	YM0117
13	ENSP00000386923	Precursor de la proteína 1 de tipo lisozima g	YM0120
14	ENSP00000302046	Precursor de la ribonucleasa K6	YM0125
15	ENSP00000317385	Proteína 2 de tipo GLIPR1	YM0724

ES 2 569 187 T3

16	ENSP00000334044	Proteína de tipo ubiquitina 4B	YM0728
17	ENSP00000350556	Proteína sin caracterizar C19orf47	YM0736
18	ENSP00000312599	Proteína transmembrana 70, Precursor mitocondrial	YM0757
19	ENSP00000334308	Nesprina-3	YM0838
20	ENSP00000258436	Proteína 9 que contiene el dominio de la superfamilia de facilitadores principales	YM0872
21	ENSP00000357480	Precursor del receptor de Nogo-B	YM0887
22	ENSP00000412308	Proteína sin caracterizar C18orf19	YM0908
23	ENSP00000364502	Proteína FAM70B	YM0972
24	ENSP00000294258	Proteína de dedo de cinc de tipo 1	YM1020
25	ENSP00000262262	Molécula CD33	YM1046
26	ENSP00000364621	Proteína 3 que contiene el dominio Sushi	YM1073
27	ENSP00000266943	Precursor del miembro 3 de la familia 46 de vehículos de solutos	YM1077
28	ENSP00000292301	Receptor 2 de quimiocinas (motivo C-C)	YM1099
29	ENSP00000317300	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa 4	YM1129
30	ENSP00000326267	Proteína que contiene el dominio mano EF C14orf143	YM1131
31	ENSP00000356048	Proteína 3 de tipo sinaptotagmina	YM1134
32	ENSP00000342493	Regulador de la proteína 3 de la dinámica de microtúbulos	YM1183
33	ENSP00000352601	Precursor de la proteína 10 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad	YM1204
34	ENSP00000347152	Precursor de la proteína 1 de tipo atractina	YM1208
35	ENSP00000416040	Proteína de UPF0606 KIAA1549	YM1214
36	ENSP00000248668	Precursor de la proteína 1 que contiene repeticiones ricas en leucina y el dominio fibronectina de tipo III	YM1217
37	ENSP00000357631	Proteína de tipo regulador 1 del alargamiento de la transcripción	YM1340
38	ENSP00000311657	Proteína 2 que contiene el dominio GRAM	YM1342
39	ENSP00000360822	Miembro 1 de la subfamilia T de canales de potasio	YM1343
40	ENSP00000418985	Miembro 23 de la familia 22 de vehículos de solutos	YM1351
41	ENSP00000311307	Precursor de la proteína sin caracterizar C4orf26	YM1401
42	ENSP00000404259	Precursor de la proteína 8 que contiene el dominio de tipo EGF	YM1414
43	ENSP00000384553	Precursor de la proteína 3 de dedo de cinc/RING	YM1423
44	ENSP00000343084	Proteína sin caracterizar putativa	YM1451
45	ENSP00000374125	Precursor de la lectina 15 de tipo Ig de unión al ácido siálico	YM1477
46	ENSP00000375259	Fragmento DKFZp667F0711 de proteína sin caracterizar putativa	YM1503
47	ENSP00000263569	Precursor Gi24 del receptor de plaquetas	YM1526
48	ENSP00000247618	Cadena ligera 1 de quinesina	YM1529
49	ENSP00000368502	Precursor de la proteína de tipo secretoglobina	YM1534
50	ENSP00000288466	Proteína dedo de cinc 618	YM1535
51	ENSP00000359571	Precursor de la proteína sin caracterizar CXorf66	YM1536
52	ENSP00000315554	Proteína de maduración de espermátidas 1	YM1537
53	ENSP00000415978	Proteína FAM74A1/A2	YM1542

ES 2 569 187 T3

54	ENSP00000325525	Precursor del receptor 3DL2 de tipo inmunoglobulina similar a linfocitos citolíticos (receptor de linfocitos NK de MHC de clase I) (Transcripción 4 asociada a linfocitos citolíticos naturales) (NKAT-4) (clon CL-5 del receptor de linfocitos citolíticos naturales p70)	YM1546
55	ENSP00000406884	HCG2023280cDNA FLJ30064 fis, clon ADRGL2000323;	YM1587
56	NP_001034884	Proteína sin caracterizar putativa	YM1593
57	ENSP00000374867	Proteína hipotética LOC648852	YM1594
58	ENSP00000397690	Precursor de la proteína sin caracterizar putativa UNQ6190/PR020217	YM1599
59	XP_934154	Proteína sin caracterizar putativa	YM1602
60	ENSP00000343493	Precursor de la proteína sin caracterizar C17orf99	YM1651
61	ENSP00000413076	Precursor de la proteína sin caracterizar C17orf99	YM1652
62	ENSP00000368396	proteína HSD24 de UPF0631	YM1668
63	ENSP00000328061	Proteína sin caracterizar C17orf74	YM1671
64	ENSP00000315731	Precursor de la de la proteína de tipo meteorina	YM1672
65	ENSP00000331466	Precursor de la proteína transmembrana 95	YM1674
66	ENSP00000331466	Precursor de la proteína transmembrana 95	YM1675
67	ENSP00000304670	Proteína 1 que contiene el dominio transmembrana y dedo RING	YM1684
68	ENSP00000303437	Proteína 1 que contiene el dominio t-SNARE	YM1693
69	ENSP00000392824	LP5624	YM1708
70	ENSP00000346747	Proteína sin caracterizar putativa	YM1720
71	ENSP00000262424	Precursor 2 que contiene el dominio LCCL de la proteína secretora rica en cisteína	YM1770
72	ENSP00000360577	Precursor mitocondrial 2 de la proteína que contiene la Enoyl-CoA hidratasa	YM1778
73	ENSP00000367965	Precursor 43 de la proteína que contiene el dominio de repeticiones de la anquirina	YM1801
74	ENSP00000354240	Precursor de RPE-espondina	YM1810
75	O TTHUMP00000028326	Proteína sin caracterizar putativa	YM1824
76	ENSP00000395006	Precursor de la proteína X2 de tipo carboxipeptidasa	YM1882
77	ENSP00000298966	proteína C11orf75 de UPF0443	YM1909
78	ENSP00000350961	Proteína transmembrana C9orf123	YM1914
79	ENSP00000378605	Miembro 30 de la subfamilia C de homólogos de DnaJ	YM1925
80	OTTHUMP00000028097	Proteína sin caracterizar putativa	YM1957
81	ENSP00000368662	Precursor de la de la proteína de tipo uroplaquina-3	YM1960
82	ENSP00000405827	Proteína sin caracterizar putativa	YM1971
83	ENSP00000362968	Precursor de la proteína C6orf127 de tipo colipasa	YM1980
84	ENSP00000409535	Precursor del miembro B de la familia 18 de dominios de lectina de tipo C	YM1985
85	ENSP00000415977	Precursor de la de la proteína de tipo condroadherina	YM1989
86	ENSP00000412448		YM2013
87	ENSP00000414449		YM2036
88	ENSP00000360191	Precursor de tipo proteína APCDD1	YM2046

ES 2 569 187 T3

89	ENSP00000321517	Proteína sin caracterizar putativa	YM2054
90	ENSP00000339578	Receptor de la hélice transmembrana siete	YM2071
91	ENSP00000397696	HSAL5836	YM2094
92	ENSP00000366415	Proteína sin caracterizar putativa	YM2100
93	ENSP00000345107	Proteína sin caracterizar putativa	YM2110
94	ENSP00000344029	Precursor de la proteína sin caracterizar putativa UNQ9165/PR028630	YM2111
95	ENSP00000409458	Proteína sin caracterizar putativa	YM2136
96	ENSP00000398103	Proteína sin caracterizar putativa UNQ6493/PR021345	YM2140
97	ENSP00000372305	Proteína sin caracterizar putativa	YM2144
98	ENSP00000411889	Precursor de la proteína sin caracterizar putativa UNQ6490/PR021339	YM2151
99	ENSP00000349132	Proteína FAM75A3	YM2168
100	ENSP00000406884	HCG2023280cDNA FLJ30064 fis, clon ADRGL2000323;	YM2202
101	ENSP00000414589	VGSA 5840	YM2213
102	ENSP00000389279	AHPA9419	YM2214
103	ENSP00000358798	Proteína 3 del modulador de la homeostasis del calcio	YM2223
104	ENSP00000374897		YM2237
105	ENSP00000373765	monooxigenasa, pseudogen 2 de tipo DBH (MOXD2)	YM2250
106	ENSP00000374869		YM2251
107	ENSP00000304930	Precursor de la proteína 1 que contiene el dominio esclerostina	YM2255
108	ENSP00000409076	Precursor de la proteína sin caracterizar KIAA1644	YM2271
109	ENSP00000374868	Proteína sin caracterizar putativa ENSP00000374868	YM2273
110	ENSP00000374880		YM2276
111	ENSP00000374896	Proteína sin caracterizar putativa ENSP00000374896	YM2279
112	ENSP00000400516	Precursor del transductor de señales de células hematopoyéticas	YM2284
113	ENSP00000382000	Proteína de tipo proteína 15 de transcripción de regiones duplicadas CMT1A	YM2286
114	ENSP00000311857		YM2289
115	ENSP00000331418		YM2297
116	ENSP00000374919	Proteína sin caracterizar putativa ENSP00000374919	YM2315
117	O TTHUMP00000076641	Proteína sin caracterizar putativa	YM2322
118	OTTHUMP00000076959	Proteína sin caracterizar putativa	YM2326
119	ENSP00000222033	Precursor de la proteína 4 de dedo de cinc/RING	YM2335
120	ENSP00000251473	Proteína de tipo 2 relacionada con la fosfatasa de fosfatos lipídicos	YM2355
121	ENSP00000291934	Precursor de la proteína transmembrana 190	YM2388
122	ENSP00000393015	Precursor de la serina proteasa 23	YM2441
123	ENSP00000414523	Precursor de la proteína 1 neuronal transmembrana de repeticiones ricas en leucina	YM2448
124	ENSP00000363345	Homólogo del cotransportador del estroma tímico	YM2453
125	ENSP00000307164	Precursor de la proteína 1 expresada en próstata y testículos	YM2511
126	ENSP00000355243	Precursor de la protocadherina-7	YM2570

127	ENSP00000264661	Miembro 4 de la subfamilia H de canales abiertos por voltaje de potasio	YM2576
128	ENSP00000266646	Precursor de la cadena E de inhibina beta	YM2613
129	ENSP00000344847	Una disintegrina y metaloproteínasa con precursor de los motivos 12 tromboespondina	YM2616
130	ENSP00000298690	Precursor de la ribonucleasa 7	YM2626
131	ENSP00000321345	Receptor de interleucina 23	YM2646
132	ENSP00000361735	Precursor de la proteína 8 del dominio núcleo del disulfuro cuatro INAP	YM2665
133	ENSP00000327628	Precursor de la proteína INFDC108	YM2671
134	ENSP00000259216	Precursor de la de la proteína críptica	YM2707
135	ENSP00000349131	Precursor de R-espondina-3	YM2726
136	ENSP00000347451	Precursor de la proteína 1 que interacciona con el receptor nogo que contiene el dominio de tipo inmunoglobulina y repeticiones ricas en leucina	YM2728
137	ENSP00000363414	Receptor alfa de la progesterona de la membrana	YM2741
138	ENSP00000385766	Precursor de la proteína 32 que contiene repeticiones ricas en leucina	YM2767
139	ENSP00000395093	Precursor de la proteína sin caracterizar C19orf15	YM2779
140	ENSP00000258969	Precursor de la condroadherina	YM2814
141	ENSP00000272134	Factor 1 de determinación de izquierda a derecha	YM2826
142	ENSP00000215885	Precursor de la fosfolipasa secretora A2 del grupo 3	YM2831
143	ENSP00000255039	Precursor de la proteína 2 del enlace de hialuronano y proteoglicano	YM2843
144	ENSP00000380417	Precursor de la interleucina-25	YM2854

Para confirmar los resultados anteriores, los autores sondaron la micromatriz de proteínas enfocada con un segundo conjunto de muestras de suero (*Conjunto de ensayo* como se indica en la Tabla 1 "Materiales y métodos") que comprendía otros 15 sueros de pacientes con EHA y 39 muestras de suero de sujetos sanos. Siguiendo la misma normalización y usando los criterios descritos anteriormente (véase "Materiales y métodos"), los autores confirmaron que los 25 autoantígenos fueron diferencialmente reconocidos por los pacientes en comparación con los donantes sanos con significación estadística. Curiosamente, en el análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, estos autoantígenos permitieron una buena diferenciación de las dos poblaciones de sueros de ambos grupos de muestras, como se muestra en la Figura 4a.

Habiendo identificado 25 autoantígenos altamente reconocidos por los pacientes de EHA, los autores se preguntaban si los pacientes con enfermedades hepáticas no autoinmunes tenían un patrón de reconocimiento solapado. Por lo tanto, probaron la misma micromatriz con sueros de 110 pacientes con infección crónica por el VHC (Tabla 1). La Figura 4b muestra las IFM de los 25 autoantígenos de cada grupo de individuos (EHA, DS y VHC, respectivamente), y pone de relieve que, si bien se observó cierta reactividad en los pacientes afectados por el VHC, 17 autoantígenos reaccionan preferentemente y con mayor fuerza con los sueros de pacientes de EHA, con significación estadística (valor de $p < 0,01$).

Ejemplo 4 - La validación de los autoantígenos seleccionados con un conjunto de muestras independiente confirma que 6 proteínas son nuevos biomarcadores potenciales de EHA.

Tras la identificación de un total de 17 autoantígenos específicos de los pacientes autoinmunes mediante micromatriz de proteínas, los autores validaron los resultados obtenidos usando el método de fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por lantánidos (DELFI[®]) ("Materiales y métodos").

Mediante este ensayo, los autores exploraron un conjunto de muestras independiente (*Conjunto de validación*, como se indica en la Tabla 1, "Materiales y métodos") que comprendía 100 pacientes de EHA (50 de HAI y 50 de CBP), 50 donantes sanos y 74 pacientes de hepatitis viral crónica (50 de VHC y 24 de HBV) medido mediante fluorescencia resuelta en el tiempo. Todos los sueros se ensayaron a una dilución de 1:300 como se describe en "Materiales y métodos", y las respuestas de IgG específicas del antígeno a cada uno de los 17 autoantígenos seleccionados se midieron por fluorescencia resuelta en el tiempo. La reproducibilidad de los resultados se confirmó usando una

muestra duplicada de los sueros seleccionados.

Los 17 antígenos presentaron una intensidad de fluorescencia media superior en comparación con los DS y los pacientes de hepatitis viral crónica (Figura 5). Se consideraron positivos los valores de intensidad de fluorescencia superiores a la media más tres desviaciones estándar de las señales del tampón entre los donantes sanos. Como se muestra en la Tabla 5, 6 de los 17 antígenos presentaron una frecuencia de reconocimiento significativamente mayor por parte de los pacientes de EHA en comparación con los donantes sanos, y también fueron significativas en comparación con los pacientes de hepatitis viral (Figura 6), considerándose, por tanto, los mejores candidatos.

Tabla 5: Frecuencias de reconocimiento de antígenos individuales identificados como biomarcadores de EHA candidatos en el conjunto de muestras de validación

Descripción	Id de proteína	Conjunto ^A	Sueros positivos %		
			DS (n = 50)	EHA (n = 100)	HV (n = 74)
<i>Receptor de asialo-glicoproteína</i>	AGPR		50	70	53
<i>Citocromo P4502D6</i>	Cyp450		56	72	55
<i>Piruvato deshidrogenasa</i>	PDH		0	55	4
<i>Dominio del receptor de interleucina-4</i>	YM0078	xo●	2	74	14
<i>Proteína no caracterizada putativa</i>	YM1503	x	6	48	14
<i>Proteína no caracterizada putativa</i>	YM1602	x	8	44	14
<i>Proteína no caracterizada C17orf99</i>	YM1652	xo	4	47	15
<i>Precursor de la proteína de tipo meteorina</i>	YM1672	xo●	0	48	22
<i>Precursor de tipo proteína APC001</i>	YM2046	xo●	2	63	28

DS: Donantes Sanos; EHA: pacientes de Enfermedades Hepáticas Autoinmunes; VH: pacientes con Hepatitis Viral. ^AAntígenos usados para los ensayos de combinación que comprendían 6 (x), 4 (o) y 3 (●) marcadores respectivamente. SE % = porcentaje de sueros de HAI positivos; SP % = porcentaje de sueros de DS o HV negativos.

Estos 6 antígenos principales mostraron una alta sensibilidad (del 44 al 74 % de los pacientes de EHA positivos) y especificidad (del 92 al 100 % de los DS negativos). Curiosamente, la sensibilidad individual resultó ser comparable con la obtenida por los presentes inventores mediante 3 marcadores de EHA conocidos, CYP2D6 (citocromo peroxidasa 2D6), AGPR-1 (Receptor 1 de asialo-glicoproteína) y PDH (piruvato deshidrogenasa), (Jensen, D. M., 1978, *The New England journal of medicine*; Van de Water J. et al., 1993, *The Journal of clinical investigation*), mientras que la especificidad individual fue mucho mejor para los presentes candidatos en comparación con los puntos de referencia.

Seguidamente, los autores evaluaron el poder de diferenciación de combinaciones de los seis autoantígenos. Por lo tanto, se ensayaron combinaciones de tres (YM0078, YM1672, YM2046), cuatro (YM0078, YM1652, YM1672, YM2046) o seis proteínas (YM1672, YM0078, YM2046, YM1652, YM1503, YM1602). La Figura 7a muestra que las combinaciones permiten una clara diferenciación entre los pacientes de EHA y los donantes sanos, con sensibilidades del 77 % ± 4 (86, 81 y 79 %, para los conjuntos de 3, 4 y 6) y especificidades del 91 % ± 8 (96, 92 y 82 % respectivamente). Por otra parte, la Figura 7b muestra las curvas ROC de los modelos de regresión logística obtenidos con las mismas combinaciones de nuevos antígenos en comparación con la combinación de las tres proteínas de control conocidas, e ilustra que cualquiera de los conjuntos de nuevos antígenos es superior al conjunto de las tres proteínas de control conocidas.

Referencias

1. Czaja, A. J. y Manns, M. P. 2010. *Gastroenterology* 139:58-72 e54.
2. Makol, A., Watt, K. D. y Chowdhary, V. R. 2011. 2011:390916.
3. Bogdanos D. P., Mieli-Vergani G., Vergani D. 2009. 29(3):241-53.
4. Selmi, C., Mackay, I. R. y Gershwin, M. E. 2011. 89:70-80.
5. Muratori L., Muratori P., Granito A., Pappas G., Cassani F., Lenzi M. 2010. *Dig Liver Dis* 42(11):757-64.
6. Muratori, L., Granito, A., Muratori, P., Pappas, G. y Bianchi, F. B. 2008. *Clinics in liver disease* 12:261-276; vii.
7. Bogdanos, D. P., Invernizzi, P., Mackay, I. R. y Vergani, D. 2008. *World journal of Gastroenterology* : WJG 14:3374-3387.
8. Vergani, D., Alvarez, F., Bianchi, F. B., Cancado, E. L., Mackay, I. R., Manns, M. P., Nishioka, M. y Penner, E. 2004. *Journal of hepatology* 41:677-683.
9. Zachou, K., Rigopoulou, E. y Dalekos, G. N. 2004. *Journal of autoimmune diseases* 1:2.
10. Song, Q., Liu, G., Hu, S., Zhang, Y., Tao, Y., Han, Y., Zeng, H., Huang, W., Li, F., Chen, P., et al. 2010. 9:30-39.
11. Grifantini, R., Pagani, M., Pierleoni, A., Grandi, A., Parri, M., Campagnoli, S., Pileri, P., Cattaneo, D., Canidio, E., Pontillo, A., et al. 2011. *Journal of proteomics* 75:532-547.

12. Bombaci, M., Grifantini, R., Mora, M., Reguzzi, V., Petracca, R., Meoni, E., Balloni, S., Zingaretti, C., Falugi, F., Manetti, A. G., *et al.* 2009. *PloS one* 4:e6332.

13. Harris, J. W. y Stocker, H. 1998. "Handbook of Mathematics and Computational Science". Nueva York: Springer- Verlag.

14. Saeed, A. I., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A. y Quackenbush, J. 2006. *Methods in enzymology* 411:134-193.

15. Frulloni, L., Lunardi, C., Simone, R., Dolcino, M., Scattolini, C., Falconi, M., Benini, L., Vantini, I., Corrocher, R. y Puccetti, A. 2009. *The New England journal of medicine* 361:2135-2142.

16. Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N. y Lengauer, T. 2005. "ROCR: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*" 21:3940-3941.

17. Jensen, D. M., McFarlane, I. G., Portmann, B. S., Eddleston, A. L. y Williams, R. 1978. *The New England journal of medicine* 299:1-7.

18. Van de Water, J., Turchany, J., Leung, P. S., Lake, J., Munoz, S., Surh, C. D., Coppel, R., Ansari, A., Nakanuma, Y. y Gershwin, M. E. 1993. *The Journal of clinical investigation* 91:2653-2664.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Istituto Nazionale di Genetica Molecolare - INGM

<120> BIOMARCADORES PARA ENFERMEDADES HEPÁTICAS AUTOINMUNES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> PCT117422

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr
20 25 30

Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala
35 40 45

Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile
50 55 60

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

Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser
85 90 95

Thr

<210> 2

<211> 175

ES 2 569 187 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

5

```

Ser Asn Trp Gly Cys Tyr Gly Asn Ile Gln Ser Leu Asp Thr Pro Gly
1          5          10          15

Ala Ser Cys Gly Ile Gly Arg Arg His Gly Leu Asn Tyr Cys Gly Val
20          25          30

Arg Ala Ser Glu Arg Leu Ala Glu Ile Asp Met Pro Tyr Leu Leu Lys
35          40          45

Tyr Gln Pro Met Met Gln Thr Ile Gly Gln Lys Tyr Cys Met Asp Pro
50          55          60

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

Leu Val Asn Met Gly Asp Arg Thr Ser Met Val Gln Asp Pro Gly Ser
85          90          95

Gln Ala Pro Thr Ser Trp Ile Ser Glu Ser Gln Val Ser Gln Thr Thr
100         105         110

Glu Val Leu Thr Thr Arg Ile Lys Glu Ile Gln Arg Arg Phe Pro Thr
115         120         125

Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Cys Ala Tyr Ser Gly
130         135         140

Gly Ala Gly Tyr Val Arg Ser Ser Gln Asp Leu Ser Cys Asp Phe Cys
145         150         155         160

Asn Asp Val Leu Ala Arg Ala Lys Tyr Leu Lys Arg His Gly Phe
165         170         175
    
```

<210> 3
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 3

ES 2 569 187 T3

Met Phe Val Asp Asn Arg Ile Gln Lys Ser Met Leu Leu Asp Leu Asn
1 5 10 15

Lys Glu Ile Met Asn Glu Leu Gly Val Thr Val Val Gly Asp Ile Ile
20 25 30

Ala Ile Leu Lys His Ala Lys Val Val His Arg Gln Asp Met Cys Lys
35 40 45

Ala Ala Thr Glu Ser Val Pro Cys Ser Pro Ser Pro Leu Ala Gly Glu
50 55 60

Ile Arg Arg Gly Thr Ser Ala Ala Ser Arg Met Ile Thr Asn Ser Leu
65 70 75 80

Asn His Asp Ser Pro Pro Ser Thr Pro Pro Arg Arg Pro Asp Thr Ser
85 90 95

Thr Ser Lys Ile Ser Val Thr Val Ser Asn Lys Met Ala Ala Lys Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Thr Ala Ala Leu Ala Arg Arg Glu Glu Glu Ser Leu Ala
115 120 125

Val Pro Ala Lys Arg Arg Arg Val Thr Ala Glu Met Glu Gly Lys Tyr
130 135 140

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

Glu Gln Gln Gln Ala Ala Lys Gly Leu His Arg Thr Ser Val Phe Asp
165 170 175

Arg Leu Gly Ala Glu Thr Lys Ala Asp Thr Thr Thr Gly Ser Lys Pro
180 185 190

Thr Gly Val Phe Ser Arg Leu Gly Ala Thr Pro Glu Thr Asp Glu Asp
195 200 205

Leu Ala Trp Asp Ser Asp Asn Asp Ser Ser Ser Ser Val Leu Gln Tyr
210 215 220

Ala Gly Val Leu Lys Lys Leu Gly Arg Gly Pro Ala Lys
225 230 235

ES 2 569 187 T3

<210> 4
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Ser Gln Gly Val Cys Ser Lys Gln Thr Leu Val Val Pro Leu His Tyr
 1 5 10 15

Asn Glu Ser Tyr Ser Gln Pro Val Tyr Lys Pro Tyr Leu Thr Leu Cys
 20 25 30

Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ser Thr Tyr Arg Thr Met Tyr Arg Val Met
 35 40 45

Trp Arg Glu Val Arg Arg Glu Val Gln Gln Thr His Ala Val Cys Cys
 50 55 60

Gln Gly Trp Lys Lys Arg His Pro Gly Ala Leu Thr Cys Glu Ala

65 70 75

10 <210> 5
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 5

His Glu Ala His Lys Thr Ser Leu Ser Ser Trp Lys His Asp Gln Asp
 1 5 10 15

Trp Ala Asn Val Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val
 20 25 30

Lys Gly Ile Tyr Tyr Arg Asn Ala Asp Ile Cys Ser Arg His Arg Val
 35 40 45

Thr Ser Ala Gly Leu Thr Leu Gln Asp Leu Gln Leu Trp Cys Asn Leu
 50 55 60

Arg Ser Val Ala Arg Gly Gln Ile Pro Ser Thr Leu
 65 70 75

20 <210> 6
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 6

ES 2 569 187 T3

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

5 <210> 7
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

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

10 <210> 8
 <211> 92
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

ES 2 569 187 T3

<400> 8

Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Met Thr Lys Asn Leu Glu Ser Val His
 1 5 10 15

Ser Ile Val Leu Ala His Ser Cys Tyr His His Glu Asn Lys Pro Arg
 20 25 30

Pro Asp Cys Cys Phe Gln Gln Lys Ile Arg Asp Thr Lys Ser Lys Val
 35 40 45

Glu Leu Pro Arg His Ala His Ala Arg Leu Thr Asn Pro Gln Leu Thr
 50 55 60

His Arg Ser Met Lys Ile Asn Asp Cys Cys Ile Lys Pro Leu Arg Phe
 65 70 75 80

Gly Val Thr Cys Tyr Ala Ala Phe Cys Asp Asn Asn
 85 90

5 <210> 9
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

ES 2 569 187 T3

Ala Arg Glu Glu Glu Ile Thr Pro Val Val Ser Ile Ala Tyr Lys Val
 1 5 10 15

Leu Glu Val Phe Pro Lys Gly Arg Trp Val Leu Ile Thr Cys Cys Ala
 20 25 30

Pro Gln Pro Pro Pro Pro Ile Thr Tyr Ser Leu Cys Gly Thr Lys Asn
 35 40 45

Ile Lys Val Ala Lys Lys Val Val Lys Thr His Glu Pro Ala Ser Phe
 50 55 60

Asn Leu Asn Val Thr Leu Lys Ser Ser Pro Asp Leu Leu Thr Tyr Phe
 65 70 75 80

Cys Trp Ala Ser Ser Thr Ser Gly Ala His Val Asp Ser Ala Arg Leu
 85 90 95

Gln Met His Trp Glu Leu Trp Ser Lys Pro Val Ser Glu Leu Arg Ala
 100 105 110

Asn Phe Thr Leu Gln Asp Arg Gly Ala Gly Pro Arg Val Glu Met Ile
 115 120 125

Cys Gln Ala Ser Ser Gly Ser Pro Pro Ile Thr Asn Ser Leu Ile Gly
 130 135 140

Lys Asp Gly Gln Val His Leu Gln Gln Arg Pro Cys His Arg Gln Pro
 145 150 155 160

Ala Asn Phe Ser Phe Leu Pro Ser Gln Thr Ser Asp Trp Phe Trp Cys
 165 170 175

Gln Ala Ala Asn Asn Ala Asn Val Gln His Ser Ala Leu Thr Val Val
 180 185 190

Pro Pro Gly Gly Asp Gln Lys Met Glu Asp Trp Gln Gly Pro Leu Glu
 195 200 205

Ser Pro Ile Leu Ala Leu Pro Leu Tyr Arg Ser Thr Arg Arg Leu Ser
 210 215 220

Glu Glu Glu Phe Gly Gly Phe Arg Ile Gly Asn Gly Glu
 225 230 235

<210> 10
 <211> 124

ES 2 569 187 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

5

```

Val Ala Lys Lys Val Val Lys Thr His Glu Pro Ala Ser Phe Asn Leu
1           5           10           15

Asn Val Thr Leu Lys Ser Ser Pro Asp Leu Leu Thr Tyr Phe Cys Trp
           20           25           30

Ala Ser Ser Thr Ser Gly Ala His Val Asp Ser Ala Arg Leu Gln Met
           35           40           45

His Trp Glu Leu Trp Ser Lys Pro Val Ser Glu Leu Arg Ala Asn Phe
           50           55           60

Thr Leu Gln Asp Arg Gly Ala Gly Pro Arg Val Glu Met Ile Cys Gln
65           70           75           80

Ala Ser Ser Gly Ser Pro Pro Ile Thr Asn Ser Leu Ile Gly Lys Asp
           85           90           95

Gly Gln Val His Leu Gln Gln Arg Pro Cys His Arg Gln Pro Ala Asn
           100          105          110

Phe Ser Phe Leu Pro Ser Gln Thr Ser Asp Trp Phe
           115          120
    
```

<210> 11
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 11

```

Ala Gln Tyr Ser Ser Asp Arg Cys Ser Trp Lys Gly Ser Gly Leu Thr
1           5           10           15

His Glu Ala His Arg Lys Glu Val Glu Gln Val Tyr Leu Arg Cys Ala
           20           25           30

Ala Gly Ala Val Glu Trp Met Tyr Pro Thr Gly Ala Leu Ile Val Asn
           35           40           45
    
```

15

ES 2 569 187 T3

Leu Arg Pro Asn Thr Phe Ser Pro Ala Arg His Leu Thr Val Cys Ile
50 55 60

Arg Ser Phe Thr Asp Ser Ser Gly Ala Asn Ile Tyr Leu Glu Lys Thr
65 70 75 80

Gly Glu Leu Arg Leu Leu Val Pro Asp Gly Asp Gly Arg Pro Gly Arg
85 90 95

Val Gln Cys Phe Gly Leu Glu Gln Gly Gly Leu Phe Val Glu Ala Thr
100 105 110

Pro Gln Gln Asp Ile Gly Arg Arg Thr Thr Gly Phe Gln Tyr Glu Leu
115 120 125

Val Arg Arg His Arg Ala Ser Asp Leu His Glu Leu Ser Ala Pro Cys
130 135 140

Arg Pro Cys Ser Asp Thr Glu Val Leu Leu Ala Val Cys Thr Ser Asp
145 150 155 160

Phe Ala Val Arg Gly Ser Ile Gln Gln Val Thr His Glu Pro Glu Arg
165 170 175

Gln Asp Ser Ala Ile His Leu Arg Val Ser Arg Leu Tyr Arg Gln Lys
180 185 190

Ser Arg Val Phe Glu Pro Val Pro Glu Gly Asp Gly His Trp Gln Gly
195 200 205

Arg Val Arg Thr Leu Leu Glu Cys Gly Val Arg Pro Gly His Gly Asp
210 215 220

Phe Leu Phe Thr Gly His Met His Phe Gly Glu Ala Arg
225 230 235

<210> 12
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 12

Met Phe Gly Val Leu Glu Gly Ala Gln Ala Asn Ser Glu Asn Trp Ile
1 5 10 15

Ala Pro Ser Gly Pro Trp Ala Leu Gly Leu Trp Ser Ser Leu Tyr Phe
20 25 30

5

10

ES 2 569 187 T3

Leu Leu Phe Ser Thr Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Val Leu Ser Gln
 35 40 45
 Ser Cys Ser Met Ala Val Ala Ala Ala Ser Trp Ile Ser Arg Glu Asn
 50 55 60
 Ala Arg Ser Val Lys Arg Ser Tyr Met Gln Ser Ser Pro Gln Arg Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Pro Arg Asn Gln Arg Thr Ser His Thr Thr Pro Val Cys
 85 90 95

<210> 13
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

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

10

ES 2 569 187 T3

Phe Leu Ser Ala Ser Pro Met Ala Pro Arg Lys Lys Thr Lys Ile Arg
 165 170 175

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

Pro Leu Ala Gly Leu Val Pro Ser Phe Pro Pro Thr Thr
 195 200 205

<210> 14
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

Ser Leu Ile Val Phe Met Glu Gln Val His Arg Gly Ile Lys Gly Leu
 1 5 10 15

Val Arg Asp Ser His Gly Lys Gly Ile Pro Asn Ala Ile Ile Ser Val
 20 25 30

Glu Gly Ile Asn His Asp Ile Arg Thr Ala Asn Asp Gly Asp Tyr Trp
 35 40 45

Arg Leu Leu Asn Pro Gly Glu Tyr Val Val Thr Ala Lys Ala Glu Gly
 50 55 60

Phe Thr Ala Ser Thr Lys Asn Cys Met Val Gly Tyr Asp Met Gly Ala
 65 70 75 80

Thr Arg Cys Asp Phe Thr Leu Ser Lys Thr Asn Met Ala Arg Ile Arg
 85 90 95

Glu Ile Met Glu Lys Phe Gly Lys Gln Pro Val Ser Leu Pro Ala Arg
 100 105 110

Arg Leu Lys Leu Arg Gly Gln Lys Arg Arg Gln Arg Gly
 115 120 125

10

<210> 15
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 15

ES 2 569 187 T3

Gly Ser Leu Ser Pro Thr Lys Tyr Asn Leu Leu Glu Leu Lys Glu Ser
 1 5 10 15

Cys Ile Arg Asn Gln Asp Cys Glu Thr Gly Cys Cys Gln Arg Ala Pro
 20 25 30

Asp Asn Cys Glu Ser His Cys Ala Glu Lys Gly Ser Glu Gly Ser Leu
 35 40 45

Cys Gln Thr Gln Val Phe Phe Gly Gln Tyr Arg Ala Cys Pro Cys Leu
 50 55 60

Arg Asn Leu Thr Cys Ile Tyr Ser Lys Asn Glu Lys Trp Leu Ser Ile
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Arg Cys Gln Lys Ile Gly Arg Gln Lys Leu Ala Lys Lys
 85 90 95

Met Phe Phe

<210> 16
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

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

Cys Gln Leu Leu Pro Leu His Arg Trp Leu Thr Gly Leu Asn Leu Arg
 20 25 30

Val Gly Ala Thr Cys Ala Thr Pro Pro Asn Ala Arg Gly Gln Arg Val
 35 40 45

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

Lys Ala Lys Arg Thr Pro Ala Ser Arg Pro Ser Ala Arg Arg Thr Pro
 65 70 75 80

Ile Lys Gly Arg Gln Cys Gly Ala Asp Lys Val Gly His Gly Ala Gly
 85 90 95

Gly Val

10

ES 2 569 187 T3

<400> 19

Ser Ser Asn Leu Glu Gly Arg Thr Lys Ser Val Ile Arg Gln Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Glu Ile Thr Cys Asp Leu Ala Glu Gly Ser Thr Gly Tyr
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Leu His Gln Glu Gly Lys Ala Pro Gln Arg Leu Leu
 35 40 45

Tyr Tyr Asp Ser Tyr Thr Ser Ser Val Val Leu Glu Ser Gly Ile Ser
 50 55 60

Pro Gly Lys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ser Thr Arg Lys Asn Leu Arg Met
 65 70 75 80

Ile Leu Arg Asn Leu Ile Glu Asn Asp Ser Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Thr Trp Asp Gly His Ser Asp Ser Asp Pro Pro Tyr Thr Thr Leu Lys
 100 105 110

Thr Cys Leu Val Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Gly Met Arg Trp Ala
 115 120 125

Leu Leu Val Leu Leu Ala Phe Leu Ser Pro Ile Pro Ala Pro Pro Thr
 130 135 140

Val Phe Cys Ala Arg Asp His Phe Leu Val Glu Trp Asp Leu Ser Phe
 145 150 155 160

Glu Arg Ile Phe Tyr Ser Phe Ser Ser Gly Pro Phe Pro Ser Lys Ala
 165 170 175

Pro Glu Arg Lys Ala Cys Ser Gln Lys Ser Ser Asn Leu Glu Gly Arg
 180 185 190

Met Lys Ser Val Thr Arg Pro Thr Gly Ser Ser Ala Glu Ile Thr Cys
 195 200 205

Asp Leu Thr Val Ile Asn Ala Val Tyr Ile His Trp Tyr Leu Gln Gln
 210 215 220

Glu Gly Lys Thr Pro Gln His Leu Leu His Tyr Asp Val
 225 230 235

ES 2 569 187 T3

<210> 20
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe His Val Leu Lys Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Met Thr Leu Leu Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Tyr
 20 25 30

Arg Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser
 35 40 45

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

Val Ser Arg Ser Asn Thr Glu Asp Phe Pro Leu Lys Leu Glu Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Ser Thr
 85 90 95

Ala Leu Gln Gly Cys Leu Leu Ser Ala His Lys Gly Lys Gly Arg Cys
 100 105 110

Cys Pro Pro Pro Pro Pro Lys Thr Gln Gly Cys Pro Val Gln Arg Ser
 115 120 125

Leu His Gln Glu Pro Trp Asn Pro Glu Trp Pro Gln Val Ala Arg Thr
 130 135 140

Val
 145

10 <210> 21
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 21

ES 2 569 187 T3

Ala Lys Val Thr Gln Thr Pro Gly His Leu Val Lys Gly Lys Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Thr Lys Met Asp Cys Thr Pro Glu Lys Gly His Thr Phe Val Tyr
 20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Asn Gln Asn Lys Glu Phe Met Leu Leu Ile Ser Phe
 35 40 45

Gln Asn Glu Gln Val Leu Gln Glu Thr Glu Met His Lys Lys Arg Phe
 50 55 60

Ser Ser Gln Cys Pro Lys Asn Ala Pro Cys Ser Leu Ala Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Glu Pro Gly Asp Thr Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr Ala Leu Lys Cys Gln Phe Leu Leu Ala His Lys Leu Val Thr Asp
 100 105 110

Pro Ala Gln Glu Ala Gly Asp Val Leu Gly Trp Lys Gly Val Thr Glu
 115 120 125

Asn Asn Trp Ser Gln Leu Lys Pro Gln Cys Asn Leu Thr Gln Gly
 130 135 140

<210> 22
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

Arg Asp Lys Met Arg Met Gln Arg Ile Lys Val Cys Glu Lys Arg Pro
 1 5 10 15

Ser Ile Asp Leu Cys Ile His His Cys Ser Tyr Phe Gln Lys Cys Glu
 20 25 30

Thr Asn Lys Ile Cys Cys Ser Ala Phe Cys Gly Asn Ile Cys Met Ser
 35 40 45

Ile Leu
 50

10

<210> 23
 <211> 55
 <212> PRT

ES 2 569 187 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

5

Pro Glu Arg Trp Phe Pro Gly Ser Cys His Val Phe Gly Gln Gly His
1 5 10 15

Gln Leu Phe His Ile Phe Leu Val Leu Cys Thr Leu Ala Gln Leu Glu
20 25 30

Ala Val Ala Leu Asp Tyr Glu Ala Arg Arg Pro Ile Tyr Glu Pro Leu
35 40 45

His Thr His Trp Pro His Asn
50 55

<210> 24

<211> 237

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 24

ES 2 569 187 T3

Gln Leu Leu Met Tyr Gln Gln His Thr Ser His Tyr Asp Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Lys Gly Gly Tyr Leu Met Leu Ser Phe Ile Asp Phe Cys Pro Phe Ser
 20 25 30

Val Met Arg Leu Arg Ser Leu Pro Ser Pro Gln Arg Tyr Thr Arg Gln
 35 40 45

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

His Asn Glu Asn Ser Leu Ala Ile Tyr Gln Gly Leu Val Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

Leu Trp Leu His Ser Val Tyr Asp Lys Pro Tyr Ala Asp Pro Val His
 85 90 95

Asp Pro Thr Trp Arg Trp Trp Ala Asn Asn Lys Gln Asp Gln Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Leu Ala Ser Asn Trp Arg Ser Ala Gly Gly Val Ser Ile
 115 120 125

Glu Met Asp Ser Tyr Glu Lys Ile Tyr Asn Leu Glu Ser Ala Tyr Glu
 130 135 140

Leu Pro Glu Arg Ile Phe Leu Asp Lys Gly Thr Glu Tyr Ser Phe Ala
 145 150 155 160

Ile Phe Leu Ser Ala Gln Gly His Ser Phe Arg Thr Gln Ser Glu Leu
 165 170 175

Gly Thr Ala Phe Gln Leu His Ser Gln Val Asp Val Gly Val Val Leu
 180 185 190

Ala Asp Pro Gly Cys Ile Glu Ala Ser Val Lys Gln Glu Val Leu Ile
 195 200 205

Asn Arg Asn Ser Val Leu Phe Ser Ile Thr Leu Lys Asp Lys Lys Leu
 210 215 220

Cys Tyr Asp Gln Gly Ile Ser Gly His His Leu Met Glu
 225 230 235

<210> 25
 <211> 140

ES 2 569 187 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

5

```

Val Val Glu Glu Leu Lys Leu Ser His Asn Pro Leu Lys Ser Ile Pro
1          5          10          15

Asp Asn Ala Phe Gln Ser Phe Gly Arg Tyr Leu Glu Thr Leu Trp Leu
          20          25          30

Asp Asn Thr Asn Leu Glu Lys Phe Ser Asp Gly Ala Phe Leu Gly Val
          35          40          45

Thr Thr Leu Lys His Val His Leu Glu Asn Asn Arg Leu Asn Gln Leu
          50          55          60

Pro Ser Asn Phe Pro Phe Asp Ser Leu Glu Thr Leu Ala Leu Thr Asn
65          70          75          80

Asn Pro Trp Lys Cys Thr Cys Gln Leu Arg Gly Leu Arg Arg Trp Leu
          85          90          95

Glu Ala Lys Ala Ser Arg Pro Asp Ala Thr Cys Ala Ser Pro Ala Lys
          100          105          110

Phe Lys Gly Gln His Ile Arg Asp Thr Asp Ala Phe Arg Ser Cys Lys
          115          120          125

Phe Pro Thr Lys Arg Ser Lys Lys Ala Gly Arg His
          130          135          140
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* de diagnóstico o pronóstico o evaluación del riesgo de desarrollar un trastorno autoinmune hepático perteneciente al grupo de la hepatitis autoinmune (HAI) y la cirrosis biliar primaria (CBP) en un sujeto, que comprende las etapas de:
- 10 a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con una proteína que tenga la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, en condiciones apropiadas para la unión de autoanticuerpos, si están presentes en la muestra biológica, a dicha proteína, y
b) detectar la presencia de autoanticuerpos unidos.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con la proteína de la reivindicación 1 y al menos una proteína adicional seleccionada del grupo de 16 proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 22, 25.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con tres proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 11, 17.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con cuatro proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 10, 11, 17.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa a) se realiza poniendo en contacto dicha muestra biológica con seis proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 6, 8, 10, 11, 17.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica está comprendida en el grupo de sangre, suero, plasma, orina, saliva, moco o fracciones de los mismos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es de un adulto o de un adolescente.
- 30 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de dichos autoanticuerpos unidos se realiza por medio de la unión a ligandos específicos.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los ligandos están conjugados con medios de detección.
10. Uso de una micromatriz de proteínas que comprende al menos las proteínas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 11. Uso de un soporte sólido para un ensayo de inmunodiagnóstico que comprende al menos las proteínas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9.

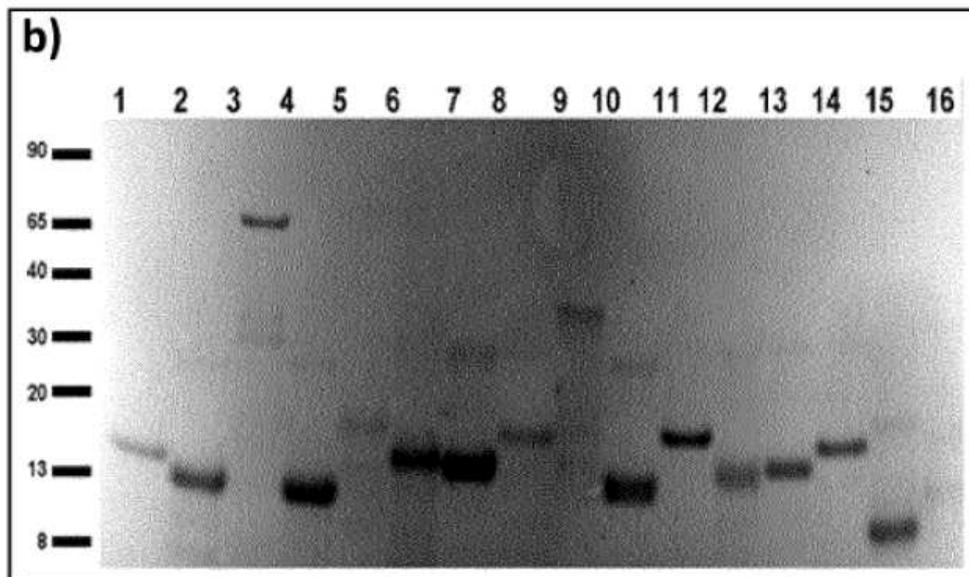
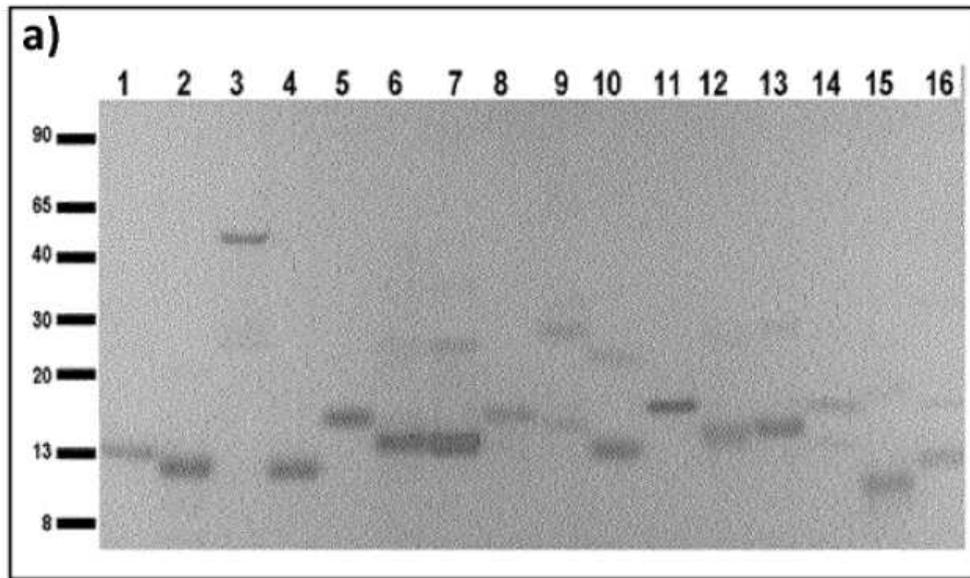
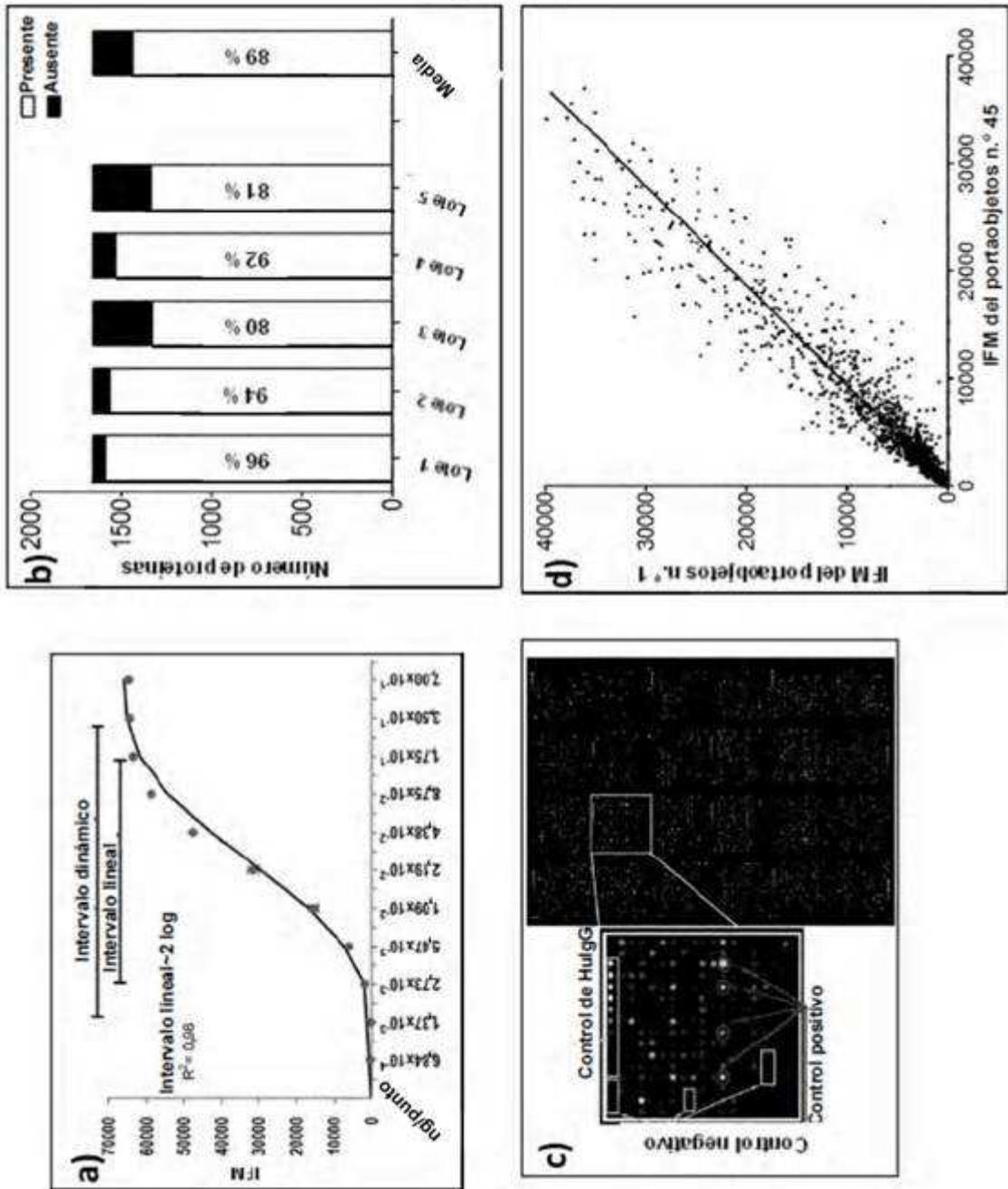


Figura 1

Figura 2



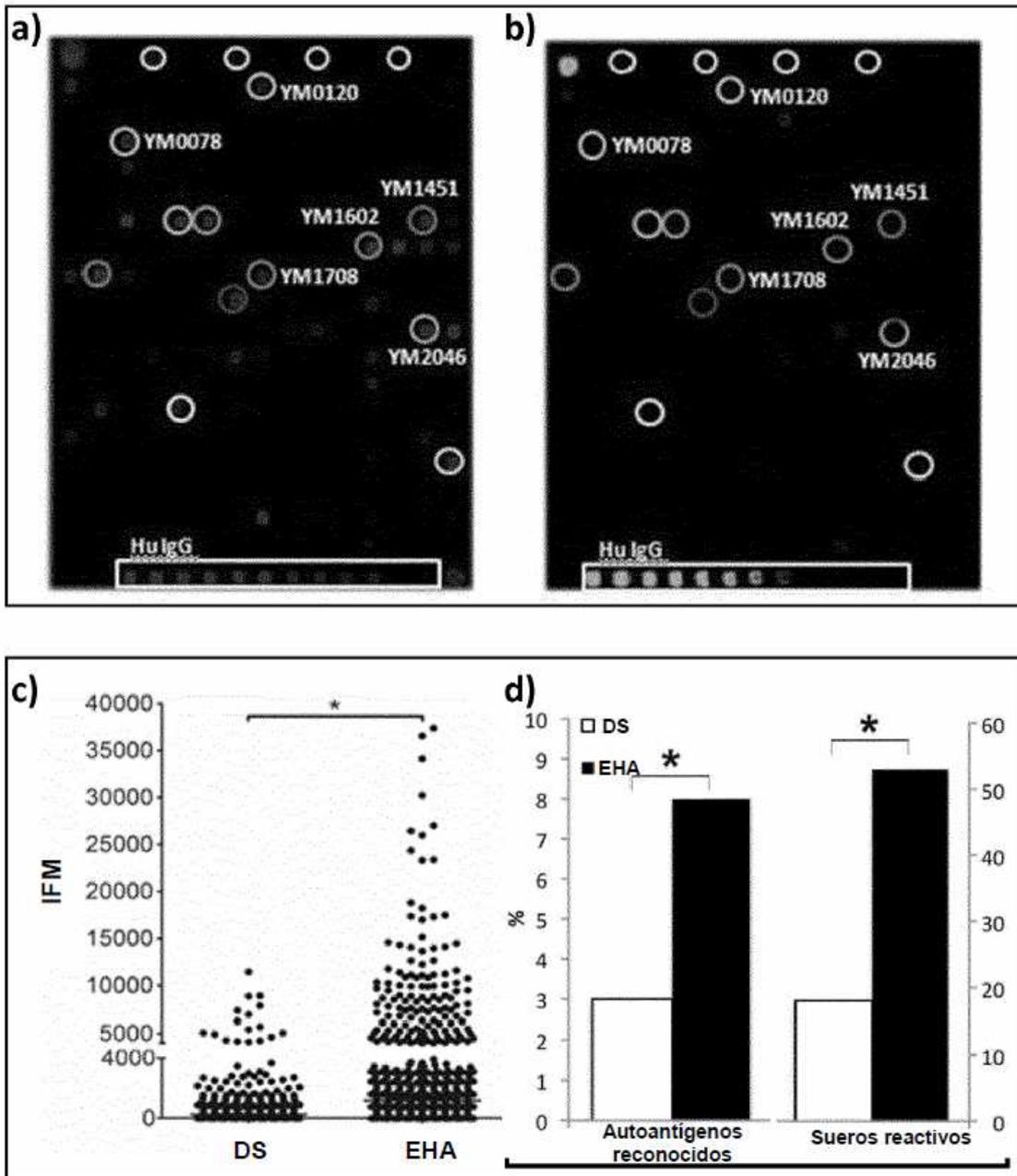


Figura 3

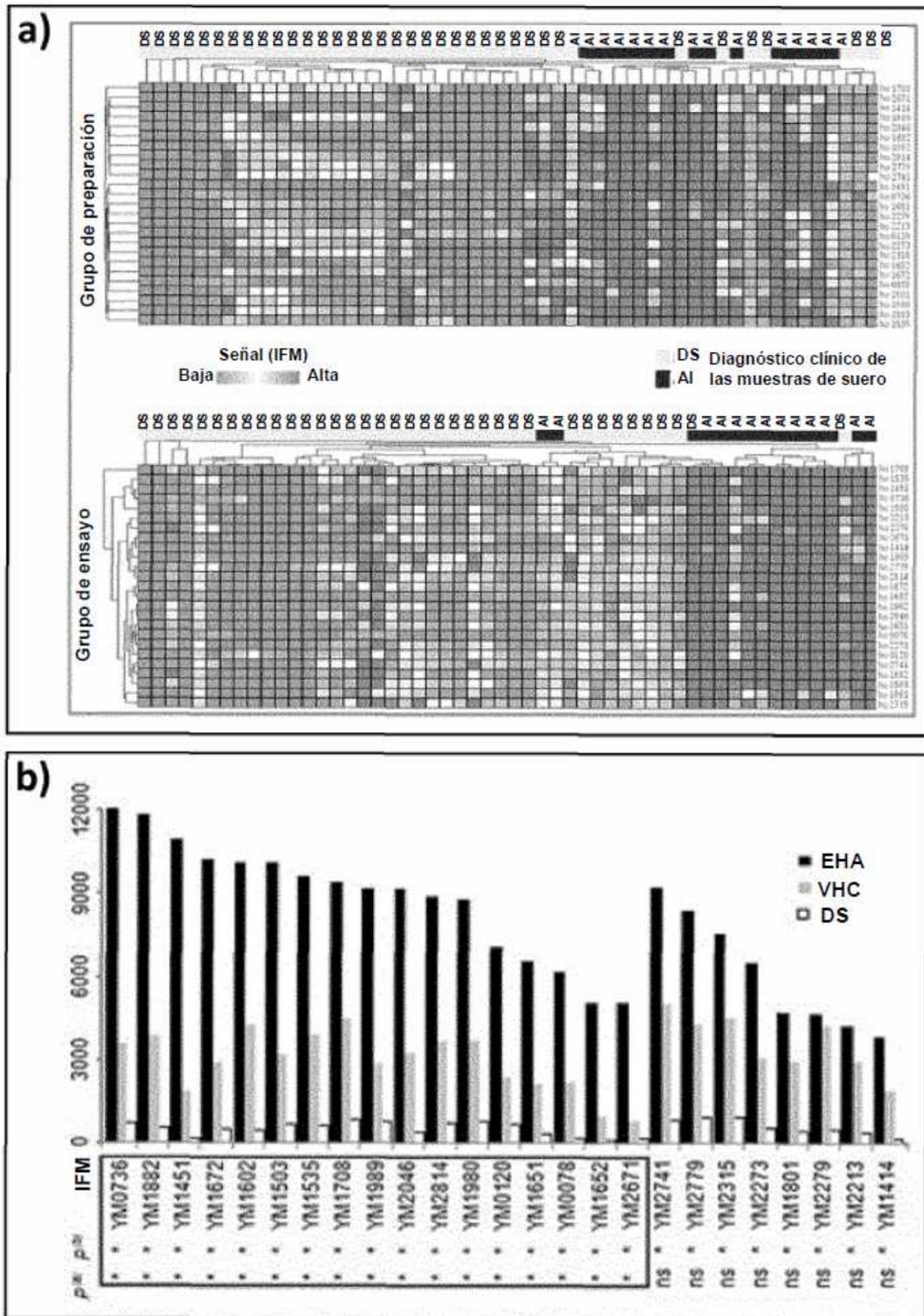


Figura 4

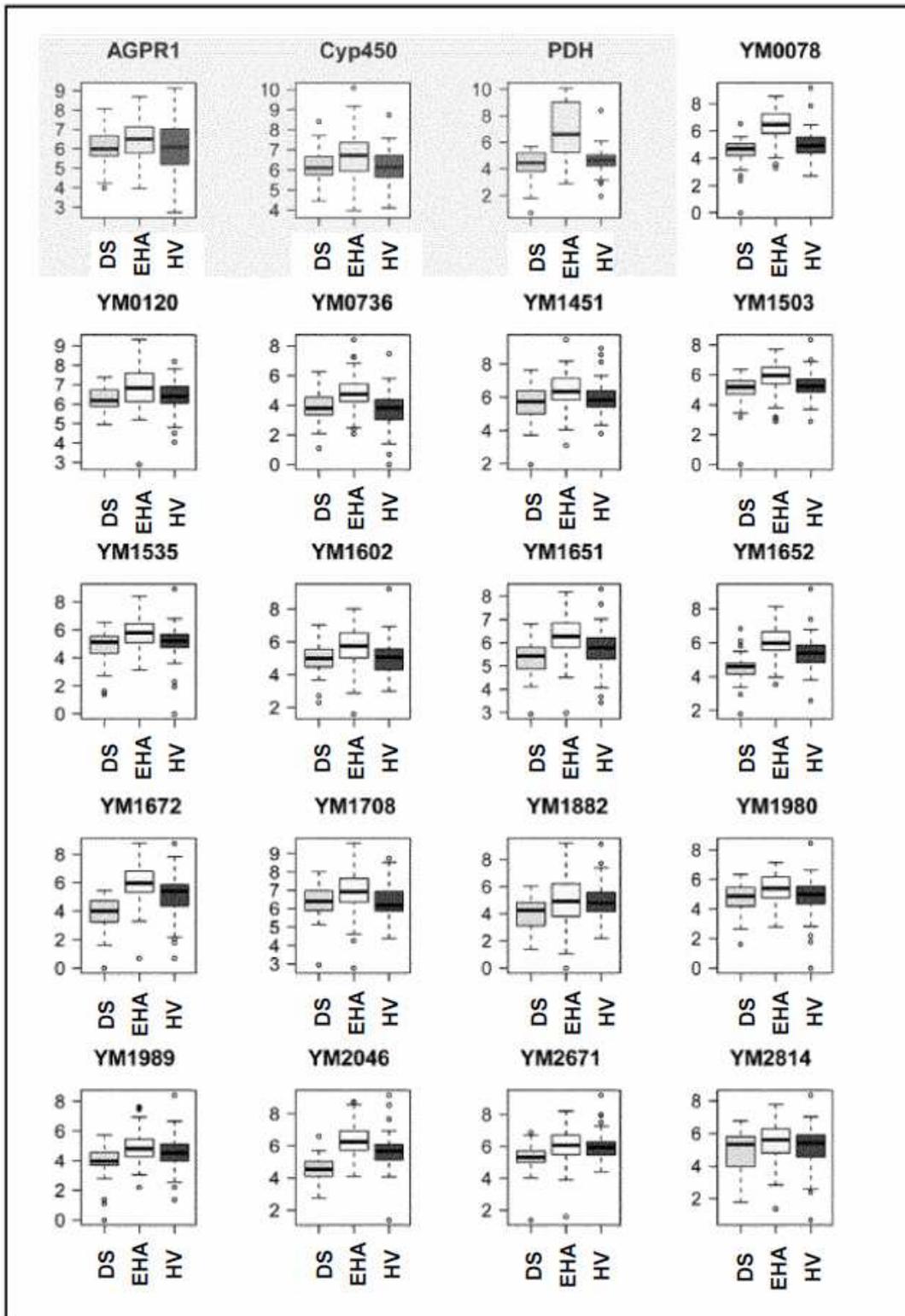


Figura 5

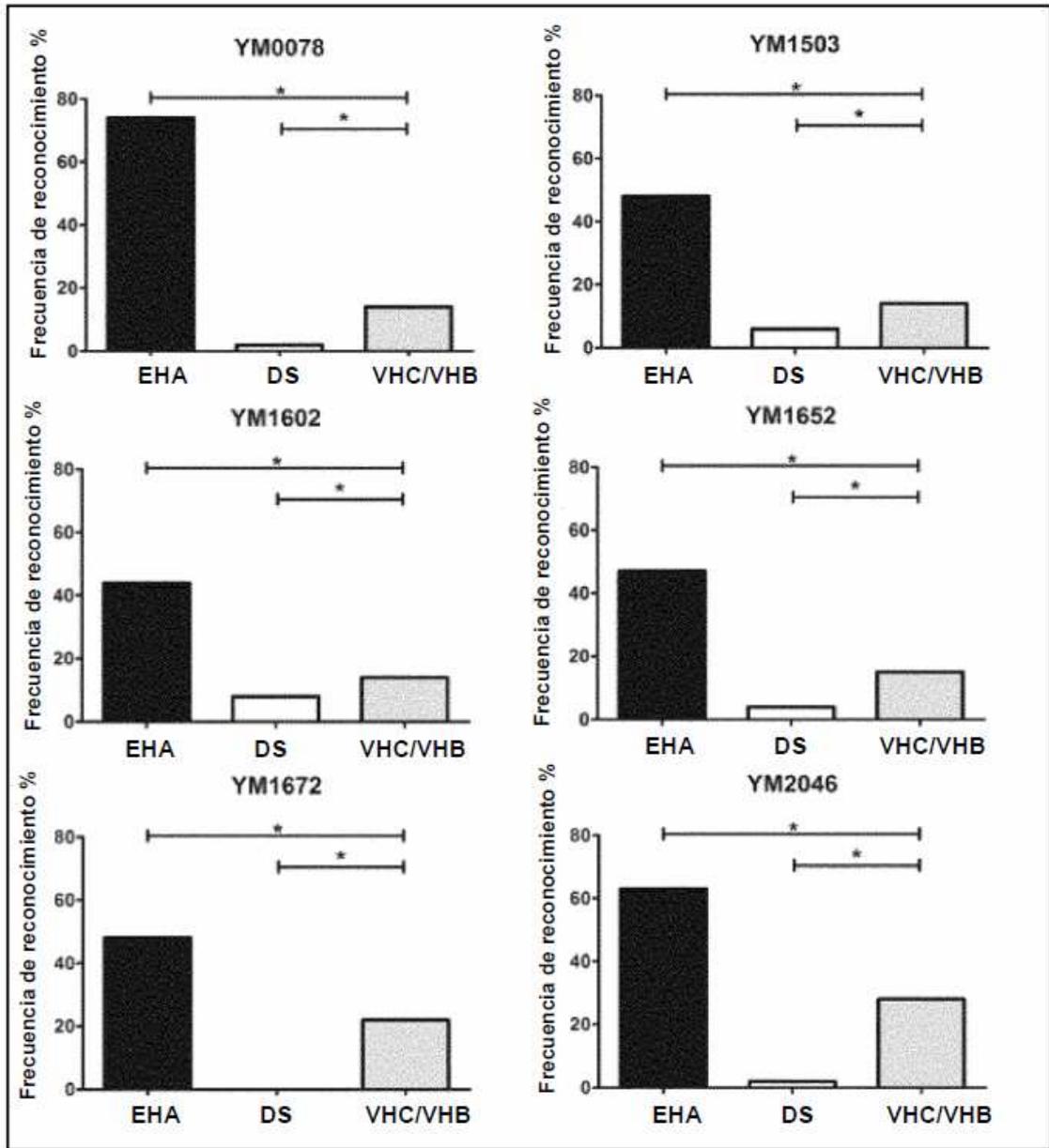


Figura 6

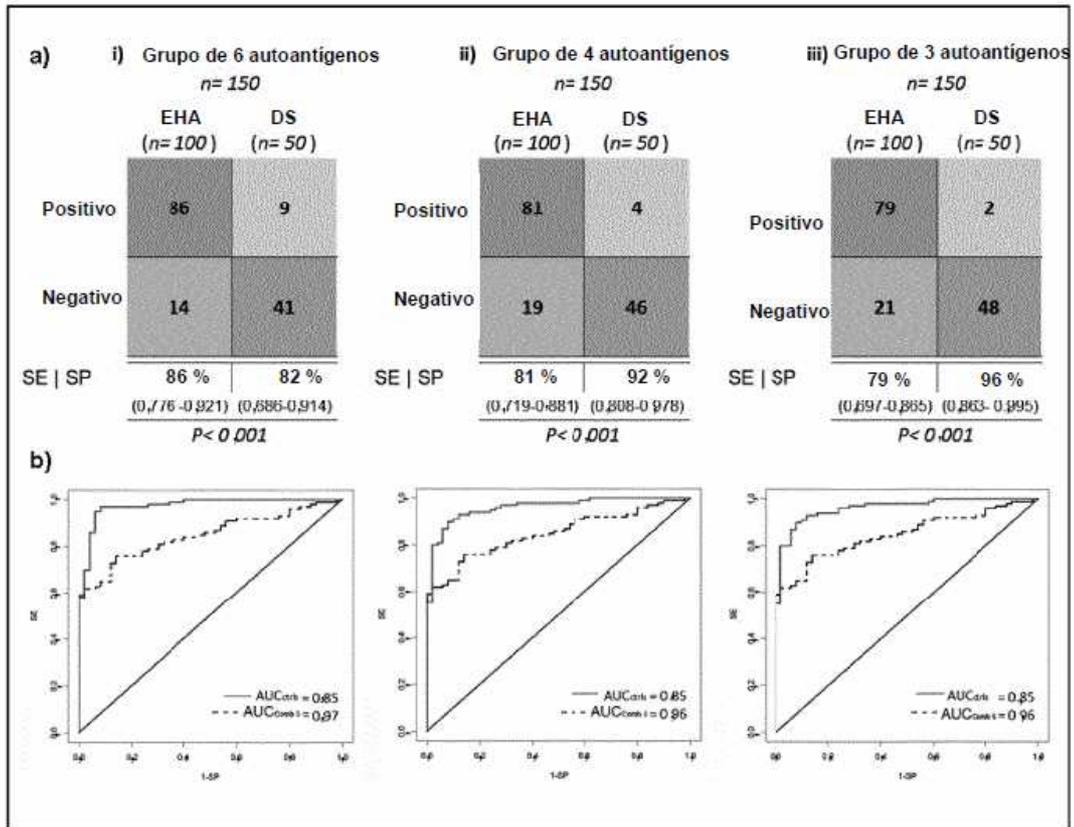


Figura 7