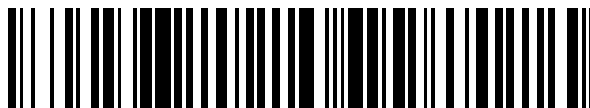


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 620**

21 Número de solicitud: 201631682

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.02.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT JAUME I (40.0%)

Avda. de Vicent Sos Baynat, S/N

12006 Castellón ES;

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL

HERRIKO UNIBERTSITATEA (40.0%) y

ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN

COOPERATIVA EN BIOCENCIAS - CIC BIOGUNE

(20.0%)

72 Inventor/es:

SUAY ANTÓN, Julio José;

SANCHEZ PÉREZ, Ana María;

GOÑI ECHAVE, Isabel;

GURRUCHAGA TORRECILLA, Mariló y

ELORTZA BASTERRIKA, Félix

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO IN VITRO PARA PREDECIR Y/O PRONOSTICAR LA COMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES EN UN SUJETO**

57 Resumen:

Método in vitro para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de biomateriales en un sujeto.

La presente invención se refiere a un conjunto de marcadores, preferentemente proteínas, todas ellas relacionadas con la vía del sistema de activación del complemento, que son particularmente útiles para predecir y/o pronosticar la compatibilidad in vitro de un biomaterial, tal como por ejemplo, prótesis articulares, prótesis dentales, válvulas, stents, etc., en su sujeto. Adicionalmente, la presente invención comprende un método in vitro para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de dichos materiales mediante la determinación del perfil peptídico descrito en la invención, así como un kit y/o dispositivo para llevar a cabo dicho método.

ES 2 602 620 A1

Método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de biomateriales en un sujeto.

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un conjunto de proteínas particularmente útil para predecir y/o pronosticar la compatibilidad *in vitro* de un biomaterial, utilizado como dispositivo médico implantable, como por ejemplo cualquier tipo de prótesis, tales como *stents*, cánulas, marcapasos, implantes dentales etc. Adicionalmente, la presente invención comprende además un método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la compatibilidad, de dichos biomateriales mediante la determinación y cuantificación del perfil peptídico adherido a dichos biomateriales, así como un kit y/o dispositivo para llevar a cabo dicho método.

10

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

El éxito de un implante depende de su aceptabilidad biológica, es decir, que produzca un mínimo daño y una mínima reacción inmune en el sujeto implantado, siendo para ello necesario que el primer requisito que debe cumplir dicho implante sea su compatibilidad, y por supuesto, la no existencia de reacción a cuerpo extraño. En este sentido, las pruebas que tiene que pasar el biomaterial para ser empleado como implante son múltiples y complicadas, incluyendo desde ensayos *in vitro* frente a diferentes líneas celulares (las propias del tejido que vaya a estar en contacto con el implante), para determinar su citotoxicidad, proliferación celular, etc., hasta ensayos *in vivo* con aquellos prototipos que han demostrado unas buenas propiedades *in vitro*. Además, son necesarios estudios preclínicos y ensayos clínicos en humanos. Todo este proceso implica un largo periodo de realización, además del sacrificio de un número significativo de animales, y un enorme coste económico. Adicionalmente, los ensayos clínicos no están exentos de problemática y riesgo para los pacientes que dan su consentimiento para participar en los mismos.

20

25

30

En la actualidad, en la práctica clínica, no existe ningún tipo de ensayo personalizado que permita predecir y/o pronosticar el éxito o fracaso de un implante, sea del tipo que sea, (por ejemplo, implante dental, prótesis de rodilla, de cadera o tornillería diversa en contacto con hueso, tales como estabilizadores de columna vertebral o placas de unión para huesos con rotura, *stents*, válvulas cardíacas, implantes dérmicos...). De la

35

misma forma, tampoco existe actualmente ningún ensayo acelerado que sea capaz de predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial, que se esté desarrollando por parte de los fabricantes productores de implantes y/o biomateriales, teniendo que llevar a cabo todos los ensayos descritos anteriormente para llevar al mercado dicho material. Adicionalmente hay una presión cada vez mayor para reducir el número de animales de experimentación por cuestiones éticas, pero la opción de realizar la selección del biomaterial mediante experimentación *in vitro* es compleja, por la no existencia de una buena correlación entre ambos tipos de experimentación, *in vitro* vs *in vivo*.

Hay que tener en cuenta que para llevar a cabo un proceso de regeneración, preferiblemente regeneración ósea, se requieren ciertas condiciones, como la señalización celular, la presencia de células progenitoras, así como los procesos de vascularización, cicatrización, y en el caso de tejido óseo la osteoinducción. La interacción de la superficie del biomaterial-implante con los sistemas biológicos determina el éxito o el fracaso del implante en el sujeto. Las propiedades superficiales del implante (hidrofilia, rugosidad o energía superficial) afectan a la interacción de este con los fluidos corporales del individuo. Así, esta interacción puede ser positiva y promover la integración del biomaterial-implante (interacción directa entre la superficie del biomaterial y el tejido sin mediar tejido fibroso), o bien negativa dando lugar a una inflamación crónica y aguda, alta producción de macrófagos que constituyen una respuesta denominada reacción a cuerpo extraño, que supone en la mayor parte de los casos el fracaso de la implantación. La comprensión de la secuencia de eventos biológicos que tienen lugar tras la implantación, tales como procesos de coagulación de la sangre, el desarrollo de infecciones, la respuesta inmune al cuerpo extraño, y finalmente el rechazo del implante, es crucial para determinar la compatibilidad de un biomaterial, y por lo tanto, de las prótesis *per se*. En este sentido, la primera capa de proteínas adsorbida sobre el biomaterial y/o implante es la responsable de desencadenar la respuesta celular a este.

En la literatura se pueden encontrar diferentes ensayos *in vitro* en los que se pone en contacto el implante con una muestra obtenida de un individuo y se analiza el patrón de proteínas adsorbidas en la superficie de los implantes para determinar la compatibilidad de éstos en el sujeto. No obstante, por lo visto en literatura, se ha demostrado que existe una correlación mínima y muy pobre entre los resultados

obtenidos *in vitro* respecto a los obtenidos *in vivo*, lo que indica una clara necesidad de un mayor desarrollo de los ensayos *in vitro* pertinentes.

5 En la patente JP4710006B2 se describe un método *in vitro* para evaluar la compatibilidad de un biomaterial, como por ejemplo una prótesis, que comprende poner en contacto dicho biomaterial con el suero de un sujeto al que implantar la prótesis. Se recupera entonces el sobrenadante y se analiza en dicho sobrenadante la presencia/expresión/actividad diferencial de la enzima lactato deshidrogenasa para pronosticar la compatibilidad de dicho biomaterial. Pero este documento no determina
10 ni analiza la existencia de correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* con resultados de compatibilidad *in vivo*.

De la misma manera, en la solicitud de patente US2005170445 se describe un método *in vitro* para determinar la compatibilidad de biomateriales de implante mediante la
15 determinación e identificación de perfiles de expresión de proteínas, específicamente citoquinas y factores de crecimiento, que están asociados con la respuesta del organismo huésped a los biomateriales implantados. Entre las muestras biológicas utilizadas para determinar el perfil de citoquinas y factores de crecimiento que determinan la compatibilidad del material analizado se encuentran: (i) cualquier fluido
20 recogido tras la puesta en contacto del biomaterial con tejido del organismo huésped donde se ha implantado tal biomaterial, o (ii) el sobrenadante de un cultivo celular al que se ha expuesto el biomaterial. Los autores del documento tampoco analizan la existencia de correlación entre los resultados mostrados *in vitro*, con la compatibilidad *in vivo* de dicho material, analizando el perfil peptídico que describen.

25 Müller R. y col. se refieren a un método para evaluar la adsorción de proteínas en la superficie de biomateriales, y valorar su compatibilidad (Müller R. *et al.* Analytical Biochemistry. 2006. Vol. 359 (2): 194-202). Emplean un método basado en grupos amino-marcados, donde el método va acoplado a una reacción de
30 quimioluminiscencia para la determinación directa de las proteínas adsorbidas sobre la superficie de los materiales analizados. Específicamente evalúan la adsorción de albúmina y fibronectina a partir de muestras de suero y saliva humanas. Al igual que se ha comentado anteriormente, en los resultados mostrados, no se indica la existencia de correlación alguna entre los resultados *in vitro* y la medición de
35 compatibilidad de un biomaterial y/o prótesis *in vivo*.

El grupo de Weber N. y col. (Weber N. *et al.* Journal of Biomedical Materials Research. 2004, 68(3): 496-503) describe una técnica rápida para determinar la compatibilidad de materiales que se basa en el análisis de los cambios en la estructura polimérica del material de recubrimiento de la prótesis y su influencia sobre la adsorción de fibrinógeno sobre la superficie de dicho biomaterial, concluyendo que la adsorción selectiva de proteínas del plasma en los materiales en contacto con la sangre, o tejido, afecta a todas las interacciones posteriores relacionadas con la compatibilidad de las superficies artificiales. En este estudio, haciendo uso de la fluorescencia, se ha desarrollado una técnica de cribado utilizando un formato de 384 pocillos para analizar las interacciones polímero-fibrinógeno y predecir y/o pronosticar así la compatibilidad del biomaterial, pero al igual que en los casos mencionados anteriormente no hay ningún tipo de correlación establecida entre los resultados mostrados y la medición de biocompatibilidad *in vivo*.

Teniendo en cuenta lo anterior, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar métodos *in vitro* fiables, rápidos y comparables con los resultados obtenidos a nivel *in vivo*, que permitan determinar la compatibilidad de biomateriales y/o prótesis recubiertas por dichos biomateriales, para su traslado más rápido a la clínica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presenta invención han identificado un perfil de marcadores, preferiblemente marcadores proteicos, la mayoría de ellos relacionados con la vía del sistema de activación del complemento, donde su determinación y/o cuantificación es capaz de predecir y/o pronosticar la biocompatibilidad de biomateriales, preferiblemente biomateriales implantables, y más preferiblemente tales como por ejemplo, prótesis articulares y/o dentales, catéteres, etc..

En particular, los inventores han identificado y cuantificado los marcadores seleccionados de la lista que consiste en: proteína C reactiva (CRP), componente amiloide P sérico (SAMP), subunidad C del subcomponente C1q del complemento (C1QC), subunidad B del subcomponente C1q del complemento (C1QB), componente C7 del complemento (CO7) y el subcomponente C1s del complemento (C1S), vitronectina (VTN), inmunoglobulina Lambda-2 región cadena C (LAC 2) e inmunoglobulina Kappa variable 4-1 (KV402), preferiblemente como marcadores

proteicos asociados a la predicción y/o pronóstico de la compatibilidad de los biomateriales. Estas proteínas son por lo tanto marcadores de la compatibilidad de biomateriales en un sujeto. Por lo tanto, la identificación y cuantificación *in vitro* de la presencia de este conjunto de marcadores, supone una mejora sustancial del actual estado de la técnica, ya que hasta ahora no se ha determinado ningún tipo de patrón de proteínas que puedan ser determinadas y cuantificadas *in vitro* y que predigan qué resultado va a ser obtenido *in vivo*.

Así, un primer objeto de la invención, es el uso *in vitro* de la identificación y cuantificación de la presencia de al menos uno de los marcadores seleccionados de entre cualquiera de la lista que consiste en: CRP (SEQ ID NO: 1), SAMP (SEQ ID NO: 2), C1QC (SEQ ID NO: 3), C1QB (SEQ ID NO: 4), CO7 (SEQ ID NO: 5), C1S (SEQ ID NO: 6), VTN (SEQ ID NO: 7), LAC 2 (SEQ ID NO: 8), KV402 (SEQ ID NO: 9) y/o cualquier combinación de los mismos, para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial que ha estado en contacto con una muestra biológica aislada de un sujeto.

En una realización particular del primer objeto de la invención, este se caracteriza por que el(los) marcador(es) que se identifican y cuantifican se encuentran adsorbidos al biomaterial, una vez que este ha estado en contacto con la muestra biológica aislada de un sujeto, particularmente de un sujeto al que se le tiene que implantar el biomaterial. Dichos marcadores son preferiblemente marcadores presentes en la muestra biológica aislada del sujeto. Además, la presencia de dichos marcadores adsorbidos a la superficie de los biomateriales analizados determinará la compatibilidad o incompatibilidad de dichos biomateriales con el sujeto al que pertenece la muestra biológica.

A efectos de la presente invención, el término “compatible” “compatibilidad”, “biocompatibilidad” o “biocompatible”, utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refiere a la capacidad de un material para estar en contacto con un sistema vivo sin generar un efecto adverso, tóxico o dañino, y adicionalmente desarrollar una actividad específica positiva y beneficiosa en el organismo. El análisis de compatibilidad de un sistema formado por un biomaterial y el tejido con el que se encuentra en contacto, incluye un elevado número de diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* que se recogen en ISO10993.

A efectos de la presente invención, el término "osteointegración" se refiere a la capacidad del biomaterial o implante para proporcionar una unión estructural y funcional directa con el tejido óseo mediante la formación de nuevo hueso o de una nueva estructura similar al hueso en la proximidad de la interfaz biomaterial/tejido. La osteogénesis se refiere aquí al proceso de formación y crecimiento del hueso nuevo. También puede asumir la formación respectiva de otros tejidos tales como tejido fibroso o cartílago.

A efectos de la presente invención los términos "biomaterial", "material médico", "dispositivo médico", "implante" o "prótesis", se utilizan indistintamente a lo largo del presente documento, y hacen referencia a cualquier biomaterial y/o dispositivo que es implantable quirúrgicamente. Generalmente, los implantes se usan en combinación con tejidos u órganos corporales temporalmente, permanentemente o semipermanentemente, para remediar un problema y opcionalmente pueden ser retirados quirúrgicamente o desaparecer por biodegradación dentro del cuerpo. Ejemplos de implantes incluyen vendajes, suturas, grapas, abrazaderas, tela, mallas, redes, huesos artificiales, tornillos, placas óseas, varillas ortopédicas, clavos, implantes de cadera, implantes de rodilla, corazones artificiales, dientes, implantes dentales, catéteres y similares.

A efectos de la presente invención, los términos "marcador", "marcadores", "biomarcador" o "biomarcadores", se usan indistintamente a lo largo del presente documento, y hacen referencia a una molécula, o al producto de expresión de un gen, preferentemente proteínas, o a fragmentos y variantes de éstas que muestran cambios sustanciales en una condición determinada y que se pueden usar tanto para la detección, como para el diagnóstico y/o pronóstico de un estado y/o condición de un objeto o individuo. A efectos de la presente invención, dichos términos hacen referencia particularmente a la detección y cuantificación de dichos biomarcadores, para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de biomateriales, tal y como se describe en el presente documento.

En una forma de realización preferida, los cambios en el biomarcador son cambios en la cantidad de los mismos, así como también, alternativamente, cambios en los niveles de expresión de éstos, respecto a un valor de referencia. El término "expresión", como se usa aquí, se refiere particularmente a la determinación de la cantidad de cada biomarcador respecto a un valor de referencia. Se apreciará que la

cantidad y/o niveles de un biomarcador se pueden establecer mediante la determinación de los niveles del polipéptido correspondiente, o de polipéptidos generados tras su digestión en el caso de que se utilicen medios proteómicos para su determinación. De forma alternativa, los biomarcadores peptídicos pueden ser
5 variantes resultantes de modificaciones postraduccionales, incluyendo fragmentos de los mismos.

El término "Proteína C reactiva" o "CRP" se refiere a una proteína codificada por el gen "*crp*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID
10 NO: 1 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P02741.

El término "componente amiloide P sérico" o "SAMP" se refiere a una proteína codificada por el gen "*apcs*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el P02743.

15 El término "subunidad C del subcomponente C1q del complemento" o "C1QC" se refiere a una proteína codificada por el gen "*c1qc*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P02747.

20 El término "subunidad B del subcomponente C1q del complemento" o "C1QB" se refiere a una proteína codificada por el gen "*c1qb*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P02746.

25 El término "componente C7 del complemento" o "CO7" se refiere a una proteína codificada por el gen "*co7*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 5 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P10643.

30 El término "subcomponente C1s del complemento" o "C1S" se refiere a una proteína codificada por el gen "*c1s*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P09871.

35

El término "Vitronectina" se refiere a una proteína codificada por el gen "vtn" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P04004.

5 El término "Inmunoglobulina Lambda-2 región cadena C" o "LAC2", se refiere a una proteína codificada por el gen "lac2" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P0CG05.

10 El término "Inmunoglobulina Kappa variable 4-1" o "KV402", se refiere a una proteína codificada por el gen "kv402" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P06312.

15 En una realización particular del primer aspecto de la invención, éste se refiere al uso *in vitro* de la identificación y cuantificación de cantidad del conjunto de marcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CRP (SEQ ID NO: 1), SAMP (SEQ ID NO: 2), C1QC (SEQ ID NO: 3), C1QB (SEQ ID NO: 4), CO7 (SEQ ID NO: 5), C1S (SEQ ID NO: 6), VTN (SEQ ID NO: 7), LAC 2 (SEQ ID NO: 8) y KV402 (SEQ ID NO: 9), que se han adsorbido al biomaterial puesto en contacto con una muestra biológica de un sujeto, para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de dicho biomaterial.

En otra realización particular, el primer aspecto de la invención comprende además la identificación y cuantificación de la cantidad de al menos un marcador seleccionado de la lista que consiste en: cadena alfa de la proteína de unión a C4b (C4BPA) (SEQ ID NO: 10), kininógeno-1 (KNG1) (SEQ ID NO: 11), complemento C5 (CO5) (SEQ ID NO: 12), inhibidor de la proteasa plasmática C1 (IC1) (SEQ ID NO: 13), factor H del complemento (CFAH) (SEQ ID NO: 14), componente C3 del complemento (CO3) (SEQ ID NO: 15), subcomponente C1r del complemento (C1R) (SEQ ID NO: 16), Ficolina-2 (SEQ ID NO: 17), Lectina de unión a manosa serin proteasa 1(MASP1) (SEQ ID NO: 18), y/o cualquier combinación de los mismos.

35 El término "cadena alfa de la proteína de unión a C4b" o "C4BPA" se refiere a una proteína codificada por el gen "c4bpa" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número con secuencia P04003.

El término “kininógeno-1” o “(KNG1)” se refiere a una proteína codificada por el gen "*kng1*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P01042.

5

El término “complemento C5” o “C05” se refiere a una proteína codificada por el gen "*c05*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P01031.

10

El término “proteasa plasmática C1” o “IC1” se refiere a una proteína codificada por el gen "*serping1*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P05155.

15

El término “factor H del complemento” o “CFAH” se refiere a una proteína codificada por el gen "*CFH*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 14 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P08603.

20

El término “componente C3 del complemento” o “CO3” se refiere a una proteína codificada por el gen "*c3*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P01024.

25

El término “subcomponente C1r del complemento” o “C1R” se refiere a una proteína codificada por el gen "*c1r*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 16 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P00736.

30

El término “Ficolina-2” se refiere a una proteína codificada por el gen "*FCN2*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 17 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número Q15485.

35

El término “Lectina de unión a manosa serin proteasa 1” o “MASP-1” se refiere a una proteína codificada por el gen "*MAPS1*" humano que codifica para una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 y/o recogida en la base de datos UniProtKB con el número P48740.

En una realización preferida, el primer aspecto de la invención se caracteriza por el uso *in vitro* de la identificación y cuantificación de cantidad del conjunto de marcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CRP (SEQ ID NO: 1), SAMP (SEQ ID NO: 2), C1QC (SEQ ID NO: 3), C1QB (SEQ ID NO: 4), CO7 (SEQ ID NO: 5), C1S (SEQ ID NO: 6), VTN (SEQ ID NO: 7), LAC 2 (SEQ ID NO: 8), KV402 (SEQ ID NO: 9), C4BPA (SEQ ID NO: 10), KNG1 (SEQ ID NO: 11), CO5 (SEQ ID NO: 12), IC1 (SEQ ID NO: 13), CFAH (SEQ ID NO: 14), CO3 (SEQ ID NO: 15), C1R (SEQ ID NO: 16), Ficolina-2 (SEQ ID NO: 17) y MASP1 (SEQ ID NO: 18).

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial, preferiblemente un biomaterial problema, tal y como se describe en el presente documento, en una muestra biológica aislada obtenida de un sujeto susceptible de utilizar dicho biomaterial, donde el método comprende las siguientes etapas:

- a. Incubar el biomaterial, preferiblemente un biomaterial problema, con la muestra biológica aislada,
- b. Determinar y cuantificar la presencia de al menos uno de los biomarcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC 2 y KV402, y
- c. Comparar el valor obtenido en la etapa (b) con un valor de referencia obtenido para cada biomarcador, en un biomaterial de referencia,

en donde un valor de al menos dos veces superior para cada uno de los biomarcadores respecto al valor obtenido en el biomaterial de referencia, es indicativo de que el biomaterial no es compatible con el sujeto.

En una primera etapa [etapa a.], el método *in vitro* de la invención comprende la incubación, en una muestra biológica, del biomaterial problema del que se pretende determinar si es compatible o no, con el sujeto del que se ha obtenido la muestra biológica.

Cualquier muestra biológica puede ser usada para poner en práctica el método de la invención. El término "muestra biológica" está referido a cualquier material biológico procedente de un sujeto que comprende células. La muestra es preferiblemente una muestra de tejido y/o de un fluido biológico. Tal muestra de tejido puede comprender, por ejemplo, tejido renal, tejido articular, tejido vascular y/o tejido del corazón, entre otros. El fluido biológico incluye, sin limitarse, linfa, fluido cerebroespinal (FCS), fluido

amniótico, efusión pleural, médula ósea, nódulo linfático, fluido linfático, fluido sinovial, una suspensión celular única preparada a partir de tejido sólido o líneas celulares orina, saliva, sudor, lágrimas, sangre, suero y plasma sanguíneo. La muestra puede ser, pero es preferiblemente sangre periférica, sangre, plasma o suero y más preferiblemente la muestra es suero.

Típicamente, la muestra es humana en origen, pero alternativamente, puede proceder de cualquier otro animal mamífero como los animales de granjas tales como caballos, bovinos, ovejas o cerdos o pueden ser alternativamente mascotas como gatos o perros.

A efectos de la presente invención, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente", utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refiere a cualquier animal mamífero e incluye, pero no se restringe a animales domésticos, de granja, primates y humanos, preferiblemente humanos. Dichos términos no pretenden ser limitativos en ningún aspecto, pudiendo ser éstos de cualquier edad, sexo y condición física.

En una realización particular, el sujeto es un sujeto que padece una patología que es susceptible de ser tratada mediante la implantación de un biomaterial, tal y como se ha descrito en el presente documento.

Una vez la muestra biológica es aislada del sujeto, dicha muestra se incuba con el biomaterial problema para determinar en una etapa posterior del método [etapa b.], los marcadores que se adhieren a dicho biomaterial. En una realización preferida, el biomaterial problema se incuba con la muestra biológica aislada del sujeto durante un intervalo de 2 a 10 horas, preferiblemente durante un intervalo de entre 3 y 6 horas, más preferiblemente durante un intervalo de entre 3 y 4 horas.

A continuación, una vez la muestra biológica se ha incubado con el biomaterial problema, el método de la invención comprende una [etapa b] donde se identifican, o determinan y cuantifican la presencia de los biomarcadores aquí descritos, que se han adheridos al biomaterial problema en contacto con la muestra biológica aislada.

En una realización particular, la etapa b) del método de la invención se caracteriza por que comprende determinar y cuantificar la presencia simultánea del conjunto de

marcadores que comprende: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC 2 y KV402.

5 En otra realización más particular de la etapa b), el método de la invención se caracteriza por que comprende además la determinación y cuantificación de al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la lista que consiste en: C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, ficolina-2, MASP-1, y/o cualquier combinación de los mismos.

10 En otra realización más particular de la etapa b) el método de la invención se caracteriza por que comprende la determinación y cuantificación simultánea del conjunto de biomarcadores seleccionados de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC 2, KV402, C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, ficolina-2 y MASP-1.

15 En otra realización alternativa de la etapa b) del método de la invención, éste se caracteriza por que comprende la determinación y cuantificación de al menos uno de los ratios entre los biomarcadores C4BPA, CFAH y VTN respecto a los biomarcadores CRP y SAMP. En una realización más particular, se determinan al menos uno de los ratios seleccionados de entre cualquiera de la siguiente lista: CFAH/CRP; CFAH/SAMP; C4BPA/CRP; C4BPA/SAMP; VTNC/CRP y VTNC/SAMP. En una realización más preferida, se determina el conjunto de los ratios que se seleccionan de la lista que consiste en: CFAH/CRP; CFAH/SAMP; C4BPA/CRP; C4BPA/SAMP; VTNC/CRP y VTNC/SAMP. Valores de los ratios CFAH/CRP, C4BPA/CRP y VTN/CRP inferiores a 25, 7 y 30, respectivamente indicarían que el biomaterial no tiene características de biocompatibilidad con el paciente.

20 Tal y como se ha mencionado anteriormente, la determinación del perfil de biomarcadores descrito en la presente invención se lleva a cabo identificando y determinando los valores de dichos biomarcadores que han quedado adheridos al biomaterial problema una vez éste ha estado en contacto con la muestra biológica del sujeto al que se le va a implantar dicho biomaterial.

30 Transcurrido el periodo de incubación de la muestra biológica del sujeto con el biomaterial problema, éste es sometido preferiblemente a una serie de lavados para eliminar los biomarcadores que no están fuertemente adheridos al biomaterial. En una

realización preferida dichos lavados se llevan a cabo preferiblemente con agua bidestilada y más preferiblemente, un último lavado con una solución tampón que comprende preferiblemente cloruro sódico a una concentración de entre 50-500 mM.

5 En otra realización más particular, los marcadores adheridos al biomaterial problema se recolectan o eluyen de dicho biomaterial, preferiblemente mediante un tratamiento de la superficie del biomaterial con una solución tampón, preferiblemente donde la solución tampón es una solución de bicarbonato de trietilamonio, aunque se puede utilizar cualquier solución tampón conocida por el experto en la materia y útil para
10 obtener las proteínas o biomarcadores adheridas a dicho biomaterial.

A continuación, en otra realización particular, en dichos eluidos que comprenden los biomarcadores adheridos al biomaterial, se determinan y cuantifican los biomarcadores que forman el perfil proteico de la invención.

15

La determinación y cuantificación de la presencia de los marcadores de la invención se lleva a cabo, preferiblemente mediante la determinación de la cantidad de biomarcador adherido al material en contacto con la muestra biológica, preferiblemente en los eluidos obtenidos según se ha descrito anteriormente, y
20 también de manera alternativa, mediante la determinación de los niveles de expresión proteicos de dichos marcadores, mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad y/o la concentración de estos productos de expresión de manera semicuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre un biomaterial compatible de uno no compatible. La presencia, así como la cantidad del biomarcador detectada
25 establece un perfil diferencial entre biomateriales compatibles y no compatibles.

25

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o
30 indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad y/o la concentración de las proteínas o biomarcadores de la invención. Dicha señal a la que también podemos referirnos como señal de intensidad -puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos biomarcadores. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente
35 secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

35

El término "cantidad" tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los biomarcadores de la invención, sino que también se refiere a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos biomarcadores, obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

La detección y cuantificación de los biomarcadores de la presente invención, asociados a la determinación de la biocompatibilidad de un biomaterial, puede llevarse a cabo mediante la cuantificación de los niveles de las proteínas o péptidos por métodos convencionales, conocidos por los técnicos en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse a, métodos quimio luminiscentes, tinción inmunohistoquímica o detección bioquímica (e.g., ensayos inmunohistoquímicos), técnicas inmunológicas, citometría de flujo, inmunoprecipitación (o sus equivalentes para reactivos que no sean anticuerpos), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), espectrometría de masas (MS), medida de la absorbancia de resonancia de plasma, etc. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de los biomarcadores identificados en la presente invención asociados con la compatibilidad de un biomaterial se realiza mediante técnicas inmunológicas, tales como ELISA ("*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"), Western-blot, RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA ("*Double Antibody Sandwich ELISA*"), espectroscopia de masas, técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips de proteínas o microarrays que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los "*dipsticks*".

Preferiblemente, las proteínas se detectan por Western-blot, ELISA, un array o matriz proteico o por electroforesis bidimensional, más preferiblemente la detección del perfil proteico descrito en la presente invención se lleva a cabo mediante ELISA. Asimismo, el técnico en la materia reconocerá que la presente invención se relaciona no sólo con los biomarcadores descritos en la invención, sino también con fragmentos de los mismos que pudieran generarse, por ejemplo, por fenómenos de procesamiento

alternativo o *splicing*, ruptura proteolítica de dichos péptidos o proteínas, etc. Dichos fragmentos conservan la capacidad de ser utilizados como marcadores para la determinación de la biocompatibilidad de un material médico tal y como se describe en el presente documento. Los biomarcadores de la invención, así como sus fragmentos, pueden incluir modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación, glicosilación, acetilación, isoprenilación, miristoilación, procesamiento proteolítico, etc.

En el siguiente paso del método de la invención, [etapa c.], la determinación y el valor de cuantificación de los marcadores de la invención obtenidos en la etapa b) se compara con los valores obtenidos para dichos marcadores en un biomaterial de referencia, que también se ha puesto en contacto con una muestra biológica aislada del sujeto, en donde un valor de al menos dos veces superior para cada uno de los biomarcadores obtenidos en la etapa b) respecto al valor obtenido para dichos biomarcadores en el biomaterial de referencia, es indicativo de que el biomaterial problema no es compatible con el sujeto.

A efectos de la presente invención el término “biomaterial problema” se refiere a un biomaterial del que no se conoce su compatibilidad o incompatibilidad con un sujeto.

A efectos de la presente invención el término “biomaterial de referencia” se refiere a un biomaterial del que se conoce su compatibilidad con un sujeto, particularmente con un mamífero y más particularmente con un ser humano. Los niveles de los marcadores identificados en esta invención asociados con la compatibilidad de un biomaterial en la muestra de referencia pueden ser determinados de manera similar a como se determinan los niveles de dichos marcadores en el biomaterial problema.

El término “cantidad de referencia” o “valor de referencia”, utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se obtiene a partir de los valores, preferiblemente valores de cantidad de los marcadores de la invención, analizados en un biomaterial de referencia, del que se conoce su compatibilidad con un sujeto. A efectos de la presente invención, y a modo de ejemplo, un material biocompatible del que obtener la cantidad de referencia para los biomarcadores de la invención, puede ser titanio, preferentemente de grado médico.

En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad o valor de referencia se obtiene a partir de un biomaterial de referencia.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los biomarcadores tal y como se describe en la invención, adheridos al biomaterial problema que se cultiva o incuba junto con la muestra biológica de un sujeto, respecto a la cantidad de los mismos biomarcadores que se han adherido a un biomaterial de referencia cultivado también junto con una muestra biológica obtenida del mismo sujeto.

El biomaterial de referencia puede ser analizado, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con el biomaterial problema. La comparación descrita en la etapa c) del método de la presente invención, puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

En otra realización más preferida de la etapa c) del método de la invención, éste se caracteriza porque se compara el valor obtenido para al menos uno de los marcadores adheridos al biomaterial problema donde dicho marcador se selecciona de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2 y KV402, preferiblemente se compara el valor obtenido para el conjunto de dichos marcadores, con el valor de referencia obtenido para dichos marcadores en el biomaterial de referencia.

En otra realización más preferida de la etapa c) del método de la invención, éste se caracteriza porque se compara el valor obtenido en el biomaterial problema para el conjunto de los marcadores CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2, KV402, y además para al menos uno de los marcadores seleccionados de entre cualquiera de la lista que consiste en: C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolina-2, MASP-1, más preferiblemente para el conjunto de los marcadores CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2, KV402, C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolina-2 y MASP-1, con el valor de referencia obtenido para dichos marcadores en el biomaterial de referencia.

De acuerdo con el método de la invención, tal y como se describe aquí, si el nivel de al menos uno de los marcadores descritos en la invención en el biomaterial problema está aumentado, preferiblemente al menos dos veces respecto al nivel de dicho marcador en el biomaterial de referencia, entonces, el biomaterial problema no será compatible con dicho sujeto; y/o si el nivel de al menos uno de los marcadores

descritos en la invención, en el biomaterial problema bajo estudio se mantiene y/o está disminuido con respecto al nivel de referencia de dicho marcador en el biomaterial de referencia, entonces, el material problema será compatible.

5 En el contexto de la presente invención, se dice que la cantidad y/o el nivel del biomarcador o biomarcadores de la invención "está(n) aumentado(s)" con respecto a la cantidad y/o al nivel de dicho(s) biomarcador(es) en el biomaterial de referencia", cuando la cantidad y/o el nivel de expresión de dicho(s) biomarcador(es) está elevado (o es superior) en el biomaterial problema con respecto la cantidad y/o al nivel de
10 expresión de dicho biomarcador(s) en el biomaterial de referencia. De acuerdo con la presente invención, se considera que la cantidad y/o el nivel del biomarcador(es) en un biomaterial problema está aumentado con respecto a la cantidad y/o al nivel de dicho(s) biomarcador(es) en el biomaterial de referencia cuando la cantidad y/o el nivel de dicho(s) biomarcador(es) en el biomaterial problema está aumentado en al
15 menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, (n) veces, respecto a la cantidad y/o al nivel de expresión de dicho(s) biomarcador(es) en el biomaterial de referencia.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, se dice que la cantidad y/o el nivel
20 de un(os) biomarcador(es) "está disminuido" con respecto a la cantidad y/o al nivel de dicho(s) biomarcador(es) en el biomaterial de referencia cuando la cantidad y/o el nivel de dicho biomarcador(es) está reducido (o es inferior) con respecto a la cantidad y/o al nivel de dicho biomarcador(es) en el biomaterial de referencia. De acuerdo con la presente invención, se considera que la cantidad y/o el nivel de un biomarcador(es)
25 en un biomaterial problema bajo estudio está disminuido con respecto a la cantidad y/o al nivel de dicho biomarcador(es) en el biomaterial de referencia cuando la cantidad y/o el nivel de dicho biomarcador(es) en el biomaterial problema está disminuido en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, (n) veces, respecto a la cantidad y/o al nivel de
30 expresión de dicho biomarcador(es) en el biomaterial de referencia.

En la presente invención los términos "predecir" o "pronosticar" se refieren a la valoración de la probabilidad según la cual un biomaterial es compatible respecto al sujeto que va a ser implantado con dicho biomaterial.

35

Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los biomateriales que se van pronosticar su compatibilidad. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los biomateriales se pueda identificar como que es compatible o que tiene disponibilidad a serlo. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba t de *Student*, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0.2, 0.1, 0.05.

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un kit para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial, de ahora en adelante kit de la invención, útil para la realización del método *in vitro* descrito de la invención.

En una realización preferida, el kit de la invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo la determinación y cuantificación de al menos uno de los marcadores descritos en la presente invención. En una realización más preferida del kit de la invención, éste se caracteriza por que los elementos necesarios para determinar al menos uno de los marcadores de la invención se seleccionan de la lista que consiste en: oligonucleótidos, sondas, oligosondas, anticuerpos, reactivos, o cualquier combinación de los anteriores, que permiten detectar y cuantificar la presencia de al menos uno de los marcadores seleccionados de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2, KV402, C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolina-2, MASP-1, y/o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más preferida, el kit de la invención comprende los elementos necesarios para detectar y cuantificar la presencia del conjunto de marcadores que comprende: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2 y KV402. En otra realización más preferida, el kit comprende además los elementos necesarios para detectar y cuantificar la presencia de los marcadores de la invención que se seleccionan de la lista que consiste en: C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolina-2, MASP-1, y/o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más preferida, el kit de la invención comprende los elementos necesarios para detectar y cuantificar la presencia del conjunto de marcadores que comprende: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolina-2 y MASP-1.

5

En otra realización más preferida aún, la determinación y cuantificación de los marcadores de la invención, mediante el kit de la invención se lleva a cabo tras contactar el biomaterial problema con una muestra biológica aislada de un sujeto, tal y como se ha descrito aquí, preferiblemente siendo la muestra biológica aislada una muestra de suero.

10

En otra realización preferida, el kit de la invención además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

15

Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención, para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial con un sujeto.

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

Figura 1. Micrográficas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los recubrimientos híbridos sol-gel aplicados en los discos de titanio SAE: (a) 70% metiltrimetoxisilano (MTMOS) - 30% tetraetil-ortosilicato (TEOS) [70M30T], (b) 35% MTMOS – 35% 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS) – 30% TEOS [35M35G30T], (c) 50% MTMOS – 50% GPTMS [50M50G] y (d) 50% trietoxivinilsilano (VTES) – 50% GPTMS [50V50G]. Barra de calibración 10 μ m.

35

Figura 2. Imágenes AFM de los recubrimientos híbridos sol-gel sobre los discos de titanio: 70M30T (a), 35M35G30T (b), 50M50G (c) y 50V50G (d).

Figura 3. Medidas de perfilometría mecánicas de Ra. Las barras indican las desviaciones estándar.

5 **Figura 4.** Resultados del ángulo de contacto para recubrimientos híbridos sol-gel aplicados sobre discos de titanio. Las barras indican las desviaciones estándar.

10 **Figure 5.** Viabilidad celular y mineralización *in vitro* de células de osteosarcoma de ratón (MC3T3-E1). (a) Porcentaje de supervivencia celular analizando la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (PNP mM/h) normalizada respecto a los niveles de la cantidad de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de las células MC3T3-E1 cultivadas en discos de titanio recubiertos con las formulaciones 70M30T, 35M35G30T, 50M50G y 50V50G. Como control positivo se utilizaron células cultivadas en ausencia de disco y como control negativo, células cultivadas en presencia de disco de titanio sin recubrir. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes formulaciones en
15 los tiempos medidos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Figura 6. Imágenes representativas de microscopía óptica de cortes histológicos obtenidos del ensayo *in vivo* (EXAKT® corte y tricrómico de Gomori) tras dos semanas de implantación de los implantes recubiertos: a) 70M30T, b) 35M35G30T, c) 50M50G y d) 50V50G. El área correspondiente al tejido conectivo fibroso (FCT) está
20 delimitada por las líneas de trazos. Abreviaturas: MAT = material; FCT= tejido conectivo fibroso; NB = nuevo hueso/osteóide. Ampliación 20x.

Figura 7. Área (mm^2) ocupada por tejido fibroso conectivo para los implantes recubiertos por cada uno de los cuatro recubrimientos. Diferencias significativas se encontraron entre los revestimientos 70M30/35M35G30T y 50M50G/50V50G ($p \leq 0.05$
25 ANOVA con un post-test de Kruskal-Wallis).

EJEMPLOS

30 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y métodos

Discos de titanio

35 Los discos de titanio (12 mm de diámetro y 1 mm de espesor) se fabricaron a partir de una barra de titanio comercial puro de grado 4 (Ilerimplant SL). Los discos de titanio

granallados y con tratamiento ácido (*Sandblasted Acid Etching-SAE*) se sometieron a la abrasión con partículas de óxido de aluminio de 4 μm y se les dio el tratamiento ácido por inmersión en ácido sulfúrico durante 1 h para simular una superficie de implante moderadamente rugosa. Los discos se limpiaron en acetona, etanol y agua purificada de 18.2 Ω (20 min en cada líquido) en un baño de ultrasonidos y secados a vacío. Finalmente, todos los discos de titanio se esterilizaron utilizando radiación UV.

Síntesis sol gel y preparación de muestras

Los recubrimientos híbridos de silicio se obtuvieron a través del método sol-gel. Los precursores utilizados fueron: metiltrimetoxisilano (MTMOS), 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS), tetraetil-ortosilicato (TEOS) y trietoxivinilsilano (VTES) (Sigma-Aldrich). Se sintetizaron cuatro composiciones diferentes con diferentes porcentajes molares: 70% MTMOS - 30% TEOS (70M30T), 35% MTMOS – 35% GPTMS – 30% TEOS (35M35G30T), 50% MTMOS – 50% GPTMS (50M05G) y 50% VTES – 50% GPTMS (50V50G). Como disolvente se utilizó 2-propanol en una relación en volumen de 1:1 alcohol/siloxano. La hidrólisis de los alcóxidos se llevó a cabo añadiendo la correspondiente cantidad estequiométrica de disolución acuosa acidificada a una velocidad de una gota por segundo. La solución se mantuvo 1 h bajo a agitación y después 1 h en reposo. Las muestras fueron preparadas inmediatamente después de este momento. Los discos de titanio SAE se utilizaron como sustrato. El recubrimiento se obtuvo empleando un *dip coater* (KSV Instrument-KSV DC). Los discos se sumergieron en la correspondiente solución sol-gel a una velocidad de 60 cm/min, durante 1 min, extraídas a una velocidad de 100 cm/min. Finalmente, las muestras curaron durante 2 h, a una temperatura de 80°C para los recubrimientos 70M30T y 35M35G30T, y a una temperatura de 140 °C para los recubrimientos 50M50G y 50V50G.

Caracterización físico-química de los discos de titanio recubiertos.

El ángulo de contacto se midió utilizando un medidor automático de ángulo de contacto (Dataphysics OCA 20). 10 μl de agua ultrapura se depositaron en la superficie recubierta sol gel a una velocidad de dosificación de 27,5 $\mu\text{L/s}$ a temperatura ambiente. Los ángulos de contacto se determinaron con el software SCA 20. Se estudiaron 5 discos de cada biomaterial depositando 2 gotas en cada uno de ellos. La topografía superficial de los discos de titanio recubiertos se caracterizó utilizando la microscopía de fuerza atómica (AFM) bajo condiciones secas. Se llevaron a cabo las medidas a un tamaño de escaneo de 60 μm con una velocidad de escaneo

de 1 Hz. Para determinar la rugosidad se utilizó un perfilómetro mecánico Dektack 6M (Veeco). Se ensayaron dos discos recubiertos de cada composición. Se realizaron tres medidas para cada disco, para obtener el valor medio del parámetro Ra. Los recubrimientos fueron estudiados mediante SEM con un equipo Leica-Zeiss bajo vacío. Se aplicó un recubrimiento de platino para hacer las muestras más conductoras para la observación por SEM.

Ensayos *in vitro*

10 *Cultivos celulares*

Las células MC3T3-E1 (osteosarcoma ratón) se cultivaron en discos de titanio con recubrimiento sol-gel, a una concentración de 1×10^4 célula/pocillo en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con fenol rojo (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) con 1 % 100x penicilina/estreptomicina (Biowest Inc., USA) and 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco–Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Tras un periodo de incubación de 24 h a 37°C en atmósfera húmeda de 95% y 5% CO₂, el medio fue reemplazado por un medio osteogénico compuesto por DMEM con fenol rojo 1x penicilina/estreptomicina, 10 % FBS, 1 % ácido ascórbico (5mg mL⁻¹) y 0,21 % β-glicerol fosfato y se incubó de nuevo bajo las mismas condiciones. El medio de cultivo se cambió cada 48 h. En cada placa, se utilizaron, como control de las condiciones de cultivo, células a la misma concentración mencionada anteriormente.

Citotoxicidad

La citotoxicidad del biomaterial se determinó utilizando la norma ISO 10993-5 mediante espectrofotometría, por contacto indirecto del extracto del material con la línea celular. Se empleó el ensayo celular 96-Cell *Titter Proliferation Assay* (Promega®) con el fin de medir la viabilidad celular después de 24 horas de incubación de las células con el extracto. Se utilizó un control negativo (un pocillo vacío) y un control positivo (látex, conocido por ser tóxico para las células). Un 70% se consideró como el límite por debajo del cual un biomaterial es considerado citotóxico.

Actividad de la ALP

La actividad de la ALP (fosfatasa alcalina) se determinó siguiendo el protocolo de conversión de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) a p-nitrofenol. Se utilizaron alícuotas de 0.1 mL para llevar a cabo el ensayo. 100 µL de p-NPP (1mg mL⁻¹) en buffer (50 mM glicina; 1mM MgCl₂ pH 10,5) se añadieron a 100 µl del sobrenadante resultante del

lisado. Tras 2 h de incubación en la oscuridad (37°C, 5% CO₂), se midió la absorbancia espectrofotométricamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm. La actividad de la ALP se determinó a partir de una curva standard obtenida a partir de diferentes soluciones de p-nitrofenol e hidróxido sódico 0.02 mM.

5 Los resultados se presentaron como mmol de p- nitrofenol/hora (mM PNP h⁻¹), y los datos se expresaron como actividad de ALP normalizada para el contenido total de proteínas (µg/µl) con el kit de ensayo Pierce BCA (Thermofisher) tras 7 y 14 días.

Análisis de los biomarcadores adsorbidos o adheridos sobre la superficie de los biomateriales problema para determinar su compatibilidad

10 Discos de titanio recubiertos de las diferentes composiciones sol-gel analizadas en los ejemplos incluidos en el presente documento (4 discos de cada biomaterial) fueron incubados en una placa de 24 pocillos por 180 minutos en una atmósfera humedecida (37 °C, 5 % CO₂), tras haber añadido 2 mL de suero humano (suero de varón, serotipo AB, Sigma-Aldrich).

15 Transcurrido dicho tiempo, se retiró el suero con el objetivo de determinar las proteínas adsorbidas/adheridas a los biomateriales analizados. Para ello, los discos fueron lavados cinco veces con agua bidestilada; tras lo cual se procedió a un último lavado con 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.0. Tras la realización de dichos lavados, se eliminaron de los discos los marcadores que no

20 estaban bien adheridos. En cambio, las proteínas que seguían adheridas al biomaterial analizado, formando una película sobre dicho biomaterial fueron recolectadas mediante un tratamiento de la superficie del biomaterial con una solución de 4 % SDS 100 mM DTT 0,5M en TEAB (Solución tamponadora de bicarbonato de trietilamonio). Se llevaron a cabo cuatro eluciones para cada uno de los biomateriales

25 analizados y las cuatro eluciones de cada biomaterial se mezclaron para dar una réplica de cada biomaterial, lo cual se repitió otras tres veces hasta obtener un total de cuatro muestras por biomaterial (cuatuplicados). El contenido total de proteínas para cada una de las réplicas fue cuantificado colorimétricamente (Pierce BCA assay kit (Thermofisher®)), siendo el valor representativo 51 mg/mL.

Análisis Proteómico

30 Las muestras eluidas obtenidas anteriormente se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%, usando un Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad®). Se aplicó un voltaje constante de 150 V durante 45 minutos. El gel fue fijado y teñido con

35 SYPRO Ruby stain (Bio-Rad®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles fueron lavados con agua y cada calle fue cortada en cuatro bandas. Cada banda fue

digerida siguiendo un protocolo estándar de digestión (Anitua E. *et al.*, J. Tissue Eng. Regen. Med.; 2015;9:E1-12). Los péptidos resultantes fueron resuspendidos en 0.1% en volumen ácido fórmico y analizados en un sistema de cromatografía líquida a escala nano acoplada on-line a espectrometría de masas en tándem (LC-MS). La
5 separación de los péptidos fue realizada en un cromatógrafo nano ACQUITY UPLC (Waters) conectado a un espectrómetro SYNAPT G2S (Waters). Las muestras fueron desaladas en una columna Symmetry 300 C18 UPLC Trap column (5 μ m, 180 μ m $\times$ 20 mm, Waters) conectada a una columna analítica a BEH130 C18 column (1.7 μ m, 75 μ m $\times$ 200 mm, Waters). La columna fue equilibrada en 3% acetonitrilo en ácido
10 fórmico al 0.1%. Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 300 nL/min en un gradiente lineal del 3%-50% de acetonitrilo.

El espectrómetro Synapt G2S (Waters) fue utilizado para el análisis de los biomarcadores o proteínas. Todas las adquisiciones fueron realizadas en electro
15 espray de modo positivo. Los datos fueron corregidos con un control interno denominado “*lock-spray*” usando el valor monoisotópico de la forma doblemente cargada del [Glu1]-fibrinopeptido B. La adquisición de datos fue realizada con alta exactitud de masa y en modo HDDA, la cual permite un incremento de las señales por el uso de la separación por movilidad iónica.

20 El software Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) fue utilizado para el análisis de proteómica diferencial. Los archivos de datos en bruto “*raw*” fueron importados al programa, y una de las muestras fue seleccionada como cromatografía de referencia contra la cual las demás carreras cromatográficas fueron alineadas. Las relaciones de
25 abundancia entre carreras fueron calculadas para cada “valor” a un tiempo de retención determinado. El “*peak list*” que contenía los péptidos detectados en todas las muestras fue confrontado mediante el motor de búsqueda Mascot (Matrix Science). La tolerancia para las búsquedas fueron las siguientes: 10 ppm para el precursor, y 0.2 Da para los fragmentos. La carbadometilación en cisteína fue
30 seleccionada como modificación fija, y la oxidación de las metioninas como modificación variable. Las proteínas identificadas con al menos dos péptidos y un FDR (*False Discovery Rate*) <1% fueron consideradas para su posterior análisis. Finalmente, los datos de proteínas diferencialmente eluidas en cada uno de los
35 biomateriales de análisis fueron incluidos en la base de datos DAVID, una herramienta bioinformática para la anotación, visualización e integración de datos para así obtener la información de los “nodos de proteínas relacionados”.

Ensayos *in vivo*

Con el propósito de evaluar la respuesta histológica de los biomateriales o recubrimientos seleccionados ensayados, los implantes recubiertos con dichos biomateriales fueron colocados quirúrgicamente en la tibia de conejos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). Este modelo de implantación en tibia de conejo está ampliamente descrito en bibliografía para la osteointegración de implantes (Mori H, *et al.*, J. Oral Maxillofac. Surg. 1997;55:351–61). Todos estos estudios se realizaron de acuerdo a los protocolos del Comité Ético de la Universidad de Murcia en España y según las directrices europeas y las condiciones legales reflejadas en el R.D. 223/1988 del 14 de marzo y la Orden del 13 de octubre de 1988 de la ley española sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos. Concretamente, los conejos se mantuvieron durante 12 horas estabulados en condiciones cíclicas de luz-oscuridad a temperatura ambiente de 20°C y una humedad relativa entre 45 y 65%. Los animales se enjaularon individualmente y alimentaron con una dieta estándar y agua filtrada *ad libitum*. Los implantes fueron suministrados por Ilerimplant SL (España) Los implantes eran de conexión interna realizados en titanio grado IV de marca comercial GMI dental implants, 3.75 mm de diámetro y 8 mm de largo modelo Frontier. Se utilizó una cantidad total de 40 de estos implantes, 20 sin recubrir como control y 5 recubiertos con cada uno de los biomateriales mencionados anteriormente para ensayar su compatibilidad. Tanto el control como las muestras de ensayo se implantaron en las mismas condiciones y se compararon los resultados.

Se utilizaron un total de 20 conejos de entre 2.000 y 3.000 g de peso, correspondiente a edades próximas al cierre fisario, indicativo de un volumen óseo adecuado para el estudio. El periodo de implantación del modelo experimental fue de 2 semanas. Se eligió este tiempo con el fin de obtener un proceso de osteointegración completo. Los implantes se insertaron en la región proximal de las tibias izda. y dcha., de manera que cada animal tenía un total de 2 implantes, uno como control y otro como biomaterial problema a ensayar. Los animales se sedaron mediante administración intramuscular (IM) de Hidrocloruro de Clopromazina (10 mg/kg). Se les administró profilaxis antibiótica (Amoxicilina) y se les preparó para la intervención. En quirófano se procedió a la inducción anestésica mediante inyección IM de Clorhidrato de Ketamina 50 mg/kg (Imalgene®, Merial, Georgia, EEUU), la pauta de mantenimiento

fue “a demanda” mediante la administración de 20 mg/kg, vía IM ante el menor signo de agitación del animal. Tras la incisión cutánea de 15 mm se desesperiostizó la tibia y se marcó con una punta de grafito la zona de implantación. Seguidamente se realizó el defecto óseo mediante fresado sucesivo (2,0, 2,8 y 3,2 mm de diámetro), con micromotor de bajas revoluciones e irrigación continua de suero fisiológico. Tras lavar, se implantaron las prótesis radicales mediante *press-fit* (colocación mediante presión con la mano). Se procedió al cierre de la herida por planos, limpieza con solución salina y tapado con apósito plástico en spray (Nobecutan, Inibsa Laboratorios, Barcelona, España). Tras transcurrir los distintos periodos de ensayo, los animales fueron eutanasiados mediante inhalación de monóxido de carbono, para extraer los tornillos y estudiar los tejidos circundantes.

Cuantificación histológica

Las muestras para el examen histológico se procesaron siguiendo la metodología descrita por Peris JL. *et al.* (Peris JL, *et al.* Rev. Española Cirugía Osteoartic. 1993;28:231-8). Brevemente, las muestras se embebieron en metacrilato de metilo y por medio de la técnica de corte EXAKT (EXAKT Technologies, Inc., Oklahoma, USA) se consiguieron muestras de 25–30 mm de espesor. Para el examen por microscopía óptica, todas las secciones se tiñeron con una solución de Tricrómico de Gomori. La ROI (*Region of Interest*) se delimitó con el software ImageJ, expresando el área ocupada por la cápsula fibrosa (FC) en mm², para n=4.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la comparación múltiple de Newman-Keuls, si apropiado. Diferencias con $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Ejemplo 1. Síntesis y caracterización físico-química de los biomateriales utilizados como recubrimientos de implantes

Una vez sintetizados los recubrimientos con los biomateriales analizados en la presente invención, se recubrieron los discos de titanio y se procedió al análisis y caracterización físico-química de los mismos. Se han analizado cuatro biomateriales de recubrimiento sol-gel diferentes y homogéneos: 70M30T, 35M35G30T, 50M05G y 50V50G, tal como se puede ver en las micrografías de SEM (Fig.1). La Figura 1

muestra la cobertura parcial de la rugosidad del titanio tratado SAE, proporcionada por los diferentes recubrimientos. El biomaterial 70M30T (Fig.1a) muestra un mayor nivel de conservación de la topografía inicial. En las imágenes de AFM se observa claramente que el recubrimiento con el biomaterial 70M30T presenta una mayor rugosidad (Fig.2a). Sin embargo, los recubrimientos con los biomateriales 50M50G y 50V50G muestran una superficie una topografía más suave (Fig.2c y 3d) ya que la irregularidad inicial del sustrato está cubierta mayoritariamente por los recubrimientos. En cambio, el biomaterial 35M35G30T muestra un aspecto intermedio (Fig.2b).

Las medidas con el perfilómetro mecánico (Fig.3) Dektack 6M (Veeco) revelan que el recubrimiento 70M30T presenta un valor Ra significativamente mayor comparando con los biomateriales 35M35T30G, 50M50G y 50V50G. Este resultado puede ser debido a la presencia de GPTMS en los últimos biomateriales que podría finalmente afectar al espesor del recubrimiento y por tanto a la rugosidad. Las medidas del ángulo de contacto (Fig.4) obtenidas con el medidor automático de ángulo de contacto Dataphysics OCA 20 muestran que los recubrimientos con el precursor TEOS (precursor no modificado orgánicamente), 70M30T y 35M35G30T tienen las superficies más hidrofílicas, mientras que 50M50G y 50V50G muestran un mayor ángulo de contacto, probablemente, como resultado del mayor contenido orgánico en sus composiciones. Todas estas variaciones deberían afectar a la respuesta biológica y por lo tanto a la compatibilidad de dichos biomateriales.

Ejemplo 2. Análisis de la compatibilidad de los biomateriales en cultivos *in vitro*.

Dicho análisis se llevó a cabo en cultivos *in vitro* de células MC3T3-E1 (osteosarcoma ratón) que se cultivaron en presencia de los discos de titanio recubiertos con los biomateriales analizados en la presente invención, 70M30T, 35M35G30T, 50M50G y 50V50G. Con respecto a la viabilidad celular ninguno de los biomateriales ensayados mostró citotoxicidad (Fig. 5a). Tampoco las medidas de la actividad de la enzima ALP muestran diferencias significativas entre los materiales ensayados (Fig. 5b). No obstante, está claro que mientras la actividad de la ALP del pocillo vacío disminuye entre el día 7 y el día 14, todos los biomateriales e incluso el titanio control parecen aumentar o mantener la diferenciación y los procesos metabólicos de las células osteoblásticas.

Los resultados *in vitro* ponen de manifiesto que, a priori, todos los materiales analizados en la presente invención serían compatibles y no mostrarían respuesta inflamatoria, ni inmune.

5 Ejemplo 3. Análisis de la compatibilidad in vivo de los biomateriales de la invención.

Para corroborar si existían una correlación para determinar la compatibilidad de un biomaterial entre los resultados obtenidos *in vitro* frente a los resultados obtenidos *in vivo*, los inventores implantaron en la tibia de un modelo animal de conejo los implantes recubiertos con los biomateriales analizados en la presente invención (ver materiales y métodos).

La formación de la cápsula fibrosa que rodea el implante está contemplada como una respuesta inmune natural a la presencia del biomaterial. Por tanto, la primera capa de proteínas que se adhiere puede inducir la respuesta inmediata del organismo huésped al biomaterial.

Los resultados han puesto de manifiesto que existe una zona, en las muestras obtenidas de los implantes recubiertos con los biomateriales 50V50G y 50M50G claramente cubierta por tejido conectivo fibroso (FCT) (Fig. 6c y 6d). Dicho tejido fibroso se encuentra entre el biomaterial (MAT) y el nuevo hueso u osteoide (NB) en dichos biomateriales 50V50G y 50M50G (Fig.6c y 6d). Estos resultados ponen de manifiesto que dichos biomateriales no son biocompatibles con el sujeto dado que inducen una respuesta inflamatoria e inmune bastante potente en el sujeto que ha sido implantado con ellos.

Analizando el área (mm²) de la cápsula fibrosa (FCT) obtenida en las muestras de los conejos analizados, no se observan diferencias significativas entre el biomaterial 35M35G30T y el 70M30T, mostrándose además que los valores de área de la cápsula fibrosa son muy reducidos para dichos biomateriales, mientras que para el caso de los biomateriales 50M50G y 50V50G los valores de área que muestran son muy altos respecto a los biomateriales 35M35G30T y el 70M30T (Fig. 7). Adicionalmente, y como se observa en dicha Fig. 7, existen diferencias estadísticamente significativas entre la cápsula fibrosa formada por los biomateriales 35M35G30T y el 70M30T respecto a la formada por los biomateriales 50M50G y 50V50G.

Estos resultados *in vivo* ponen de manifiesto que, al contrario de lo observado en los experimentos *in vitro*, los recubrimientos con los biomateriales 50M50G y 50V50G demostraron no ser compatibles con el sujeto, mientras que los recubrimientos con los biomateriales 35M35G30T y el 70M30T, sí que mostraron resultados positivos en cuanto a compatibilidad. Estos resultados evidencian la mala correlación existente entre los resultados obtenidos *in vitro* vs *in vivo* para determinar la compatibilidad de un biomaterial en un sujeto.

10 **Ejemplo 4. Determinación mediante análisis proteómico del perfil de biomarcadores que determinan la compatibilidad de biomateriales.**

Una vez demostrada la pobre correlación existente entre los resultados *in vitro* vs *in vivo* para determinar la compatibilidad de un biomaterial, se procedió a analizar las proteínas, particularmente el patrón peptídico, adherido en la superficie de los biomateriales cultivados *in vitro* en presencia de suero humano. Dado que la respuesta celular al contacto con el biomaterial depende de la primera capa de proteínas adsorbidas en éste, se pretende establecer una correlación entre el patrón de proteínas detectado y los resultados *in vivo* obtenidos.

20 El análisis proteómico revela una correlación entre la composición de la capa de proteínas adherida en los biomateriales o recubrimientos y su respuesta *in vivo*. Tras cultivar los discos de titanio con cada uno de los recubrimientos analizados en la presente invención en presencia de suero humano, y aislar los eluidos que comprenden los marcadores adheridos a cada disco (ver materiales y métodos), dichos eluidos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% para determinar las diferentes proteínas del suero que habían quedado adheridas a cada biomaterial. La elución de las proteínas obtenidas a partir de los cuatro recubrimientos 70M30T, 35M35G30T, 50M05G y 50V50G se analizó por LC-MS/MS, y se detectaron 171 proteínas diferentes.

35 En base a los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS, los materiales se clasificaron en dos grupos de acuerdo con los resultados obtenidos para cada uno de ellos en el modelo *in vivo*. El primero de los grupos comprende los biomateriales 70M30T y 35M35G30T, que de acuerdo con los resultados *in vivo* mostró una buena osteointegración o compatibilidad con el sujeto (resultado positivo), mientras que el

segundo grupo está formado por los biomateriales 50M50G y 50V50G, que de acuerdo con los resultados *in vivo* da lugar a la formación de tejido conectivo fibroso alrededor de la zona del implante, por lo que dichos resultados muestran una mala compatibilidad de dichos biomateriales con el sujeto (resultado negativo) (Fig. 7).

5

Para el tratamiento de datos obtenidos mediante LC-MS/MS se utilizó el software Progenesis Q1, con un análisis diferencial ($n=4$), con el fin de identificar cuáles de esas proteínas son predominantes de forma diferencial entre los distintos biomateriales. Además, se utilizó el “*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)*” para clasificar las proteínas en relación con sus funciones.

10

La comparación entre los materiales 70M30T y 35M35G30T, por un lado, y 50M50G y 50V50G por otro lado, muestra pequeñas diferencias en cuanto al perfil de proteínas adheridas a dichos biomateriales (Tablas 1 y 2). Sin embargo, cuando se comparan los biomateriales o recubrimientos que muestran diferentes resultados *in vivo* (70M30T y 50M50G, por un lado y 35M35G30T y 50M50G, por otro lado) se detecta un mayor número de proteínas que se observan diferencialmente y significativamente presentes en los biomateriales compatibles respecto a los no compatibles (Tablas 3 y 4).

15

20

Tabla 1. Análisis de la presencia de las proteínas estadísticamente predominantes ($p<0.05$) en los recubrimientos con los biomateriales compatibles 70M30T vs 35M35G30T (método Progenesis) según la presente invención.

Proteína	UniProtKB	C.S.	Presencia Normalizada		70M30T vs 35M35G30T		DAVID
			Media 70M30T	Media 35M35G30T	Anova (p)	Ratio 35M35G30T /70M30T	
hMYH1	P12882	130,71	5,71E+02	9,81E+03	4,00E-02	17,19	10
hLDHB	P07195	316,92	1,00E+04	1,22E+05	1,84E-05	12,18	-
hDHE3	P00367	64,65	8,24E+02	7,13E+03	1,33E-03	8,65	-
hFCN2	Q15485	377,38	7,05E+03	5,84E+04	5,44E-04	8,28	1-2-7-5-10
hC1QA	P02745	178,51	3,17E+04	9,68E+04	2,15E-03	3,06	1-2
hHBA	P69905	57,48	3,75E+04	6,50E+04	3,37E-03	1,73	5-10
hCLUS	P10909	629,78	6,81E+05	4,15E+05	3,31E-02	0,61	1-4-9
hFA12	P00748	158,46	1,34E+05	7,80E+04	3,92E-02	0,58	3-5-8

Proteína	UniProtKB	C.S.	Presencia Normalizada		70M30T vs 35M35G30T		DAVID
			Media 70M30T	Media 35M35G30T	Anova (p)	Ratio 35M35G30T /70M30T	
hAPOA5	NQ6Q788	168,81	5,41E+03	2,85E+03	3,16E-02	0,53	7-9

C.S.: Puntuación de confianza. Las funciones de clasificación DAVID fueron: (1) respuesta inflamatoria/inmune, (2) hidroxilación, (3) coagulación sanguínea, (4) regulación de la apoptosis, (5) unión de metales, (6) fosforilación, (7) unión de carbohidratos, (8) actividad peptidasa, (9) transporte de lípidos y (10) integridad del citoesqueleto.

5

La Tabla 1 muestra nueve proteínas que se han identificado y que aparecen diferencialmente presentes cuando son comparados los dos biomateriales con resultados positivos *in vivo* (35M35G30T y 70M30T). De las nueve proteínas identificadas anteriormente, se detectaron seis que mostraron una mayor presencia, estadísticamente significativa en el biomaterial o recubrimiento 35M35G30T, siendo la proteína MYH1 (17.19-veces) la más predominante, y relacionada con la integridad del citoesqueleto. También se encontraron proteínas relacionadas con el sistema inmune (C1QA y FCN2) o con la función de enlace de metales tal como la proteína HBA. Además, se encontraron otras tres proteínas, presentes en gran proporción en el recubrimiento 70M30T: la proteína CLUS que podría tener un papel protector frente al establecimiento de desórdenes inflamatorios crónicos, la FAXII que es capaz de desencadenar la coagulación y la APOA5 que está relacionada con el transporte de lípidos y con la función de unión a carbohidratos.

20

Por otro lado se llevó a cabo también un estudio comparativo de las proteínas adheridas en los biomateriales con respuesta negativa en el modelo *in vivo* (50M50G vs 50V50G). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25

30

Tabla 2. Análisis de la presencia de las proteínas estadísticamente predominantes ($p < 0.05$) en los recubrimientos con los biomateriales no compatibles 50M50G vs 50V50G (método Progenesis) según la presente invención.

Proteína	UniProtKB	C.S.	Presencia Normalizada		70M30T vs 35M35G30T		DAVID
			Media 50M50G	Media 50V50G	Anova (p)	Ratio 50V50G/50M50G	
hHORN	Q86YZ3	165,54	1,36E+03	4,66E+03	1,35E-02	3,41	5-8-10
hDSC1	Q08554	236,90	1,29E+04	2,77E+04	3,23E-02	2,14	5
hLCN1	P31025	121,78	5,51E+04	7,54E+03	3,61E-03	0,14	8

5 C.S.: Puntuación de confianza. Las funciones de clasificación DAVID fueron: (1) respuesta inflamatoria/inmune, (2) hidroxilación, (3) coagulación sanguínea, (4) regulación de la apoptosis, (5) unión de metales, (6) fosforilación, (7) unión de carbohidratos, (8) actividad peptidasa, (9) transporte de lípidos y (10) integridad del citoesqueleto.

10

Sólo tres proteínas fueron detectadas de forma predominante en los biomateriales 50M50G vs 50V50G. Aunque ambos biomateriales tienen composiciones químicas diferentes, presentan una composición del perfil proteico adherido al mismo muy similar. Las proteínas HORN y DSC1 están claramente más presentes en el biomaterial 50V50G, y ambas tienen la función de unión metálica, y la proteína LCN1, con actividad endopeptidasa, se encontraba más presente en biomaterial 50V50G.

15

Por otro lado, las proteínas detectadas en los biomateriales 70M30T y 35M35G30T (resultados positivos de compatibilidad *in vivo*) fueron comparadas con las proteínas detectadas en el biomaterial 50M50G (resultado negativo de compatibilidad *in vivo*). Se identificaron veinte proteínas séricas con presencia diferencial en estos biomateriales (Tabla 3).

20

Tabla 3. Análisis de la presencia de las proteínas estadísticamente predominantes ($p < 0.05$) entre los recubrimientos con los biomateriales compatibles vs no compatibles: 70M30T vs 50M50G y 35M35G30T vs 50M50G.

			Abundancia normalizada			70M30T vs 50M50G		35M35G30T vs 50M50G			
			C.S	Media 70M30T	Media 35M35G	Media 50M50G	Anova (p)	Ratio 50M50G/70 M30T	Anova (p)	Ratio 50M50G/ 35M35G30T	DAVID
Proteína	UniProt										
hCRP	P02741	122,50	4,46E+03	6,62E+03	3,49E+04	1,68E-02	7,83	3,65E-02	5,28	1-5-8	
hLCN1	P31025	121,78	1,29E+04	1,03E+04	5,51E+04	1,81E-02	4,28	1,09E-02	5,37	8	
hSAMP	P02743	465,85	1,64E+05	2,97E+05	5,72E+05	3,29E-02	3,48	3,22E-02	1,93	1-5-7-8	
hAPOE	P02649	1435,34	1,44E+06	1,12E+06	3,46E+06	3,02E-02	2,40	2,09E-03	3,09	3-4-5-6-7-9	
hC1QC	P02747	358,67	1,11E+06	1,18E+06	2,51E+06	8,12E-04	2,26	5,20E-03	2,12	1-2	
hC1QB	P02746	487,43	6,74E+05	7,38E+05	1,51E+06	5,46E-03	2,24	4,43E-03	2,05	1-2	
hCO7	P10643	144,73	2,39E+04	2,67E+04	5,31E+04	1,76E-02	2,22	4,25E-02	1,99	1	
hVTNC	P04004	327,47	3,39E+05	4,24E+05	7,50E+05	1,71E-04	2,21	1,99E-03	1,77	7	
hKV402	P06312	215,21	3,21E+05	3,46E+05	6,68E+05	2,40E-03	2,08	1,15E-04	1,93	-	
hC1S	P09871	566,82	2,51E+05	2,37E+05	5,19E+05	6,14E-04	2,07	6,43E-03	2,19	1-2-5-8	
hC4BPA	P04003	209,98	8,27E+04	7,60E+04	1,71E+05	5,74E-03	2,06	1,61E-02	2,25	1	
hKNG1	P01042	325,69	2,23E+05	2,48E+05	4,51E+05	4,12E-03	2,02	2,27E-02	1,82	1-2-3-4-5-7	
hLAC2	P0CG05	353,61	4,80E+06	5,27E+06	8,28E+06	1,36E-02	1,73	3,07E-02	1,57	-	
hAPOA4	P06727	1952,03	5,98E+05	4,48E+05	1,00E+06	1,88E-02	1,67	4,56E-03	2,23	5	
hKV201	P01614	143,61	6,28E+05	5,71E+05	1,02E+06	2,96E-02	1,63	1,87E-02	1,79	-	
hK22E	P35908	4811,54	4,42E+06	4,54E+06	2,80E+06	3,52E-02	0,63	2,17E-02	0,62	10	
hK1C10	P13645	4566,75	1,06E+07	1,19E+07	6,48E+06	1,56E-02	0,61	1,60E-02	0,55	10	
hK2C78	Q8N1N4	669,51	5,02E+04	5,35E+04	3,00E+04	3,48E-02	0,60	2,39E-02	0,56	10	
hHORN	Q86YZ3	165,54	3,44E+03	8,79E+03	1,36E+03	2,48E-02	0,40	1,80E-02	0,16	5-8-10	
hFILA2	Q5D862	430,49	5,59E+04	5,61E+04	1,98E+04	4,67E-02	0,35	9,82E-03	0,35	5-8	

C.S.: Puntuación de confianza. Las funciones de clasificación DAVID fueron: (1) respuesta inflamatoria/inmune, (2) hidroxilación, (3) coagulación sanguínea, (4) regulación de la apoptosis, (5) unión de metales, (6) fosforilación, (7) unión de carbohidratos, (8) actividad peptidasa, (9) transporte de lípidos y (10) integridad del citoesqueleto.

Un grupo de quince proteínas se encontraron diferencialmente más absorbidas sobre la superficie del biomaterial 50M50G que en los materiales de respuesta positiva *in vivo* (70M30T y 35M35G30T). VTNC, APOE y KNG1, tienen un papel en el metabolismo del hueso y podrían intervenir en el proceso de regeneración de dicho tejido. Además, VTNC podría estar implicada en la cascada de regulación del complemento. Sin embargo, algunas inmunoglobulinas y muchas proteínas relacionadas con el sistema inmune estaban también presentes. De hecho las proteínas CRP, SAMP, C1QB, C1QC, CO7, C1S y C4BPA se clasificaron con la base de datos DAVID dentro del grupo relacionado con la respuesta inflamatoria aguda. Todas estas proteínas están implicadas en la activación de la cascada del complemento con la excepción de C4BPA, que es capaz de regular este proceso. Las queratinas, HORN y FILA2 se absorbieron más, diferencialmente, en los recubrimientos 70M30T y 35M35G30T que en 50M50G. Estas proteínas juegan un papel en la integridad del citoesqueleto y tienen actividad peptidasa.

Los resultados proteómicos de los biomateriales o recubrimientos 70M30T y 35M35G30T (resultado positivo de compatibilidad *in vivo*), se compararon con las proteínas adsorbidas y detectadas en el biomaterial o recubrimiento 50V50G (resultado negativo de compatibilidad *in vivo*). La Tabla 4 presenta las dieciséis proteínas que fueron identificadas con presencia diferencial, entre ellas quince estaban con mayor presencia en el biomaterial o recubrimiento 50V50G.

Tabla 4. Análisis de la presencia de las proteínas estadísticamente predominantes ($p < 0.05$) entre los recubrimientos 70M30T vs 50V50G y 35M35G30T vs 50V50G (método Progenesis).

Proteína	UniProtKB	C. S.	Abundancia normalizada			70M30T vs 50V50G		35M35G30T vs 50V50G		DAVID
			Media 70M30T	Media 35M35G30T	Media 50V50G	Anova (p)	Ratio 50V50G/70M30T	Anova (p)	Ratio 50V50G/35M35G30T	
hCRP	P02741	122,50	4,46E+03	6,62E+03	6,81E+04	3,38E-02	15,26	6,78E-02	10,29	1-5-8
hCO5	P01031	819,91	1,99E+04	3,59E+04	2,08E+05	4,99E-02	10,43	1,70E-01	5,78	1-6
hSAMP	P02743	465,85	1,64E+05	2,97E+05	5,47E+05	3,44E-02	3,33	3,18E-02	1,84	1-5-7-8
hC1QB	P02746	487,43	6,74E+05	7,38E+05	1,65E+06	2,40E-03	2,45	1,52E-03	2,24	1-2
hKV402	P06312	215,21	3,21E+05	3,46E+05	7,87E+05	2,68E-03	2,45	7,92E-04	2,27	-
hIC1	P05155	1101,50	5,05E+05	6,78E+05	1,12E+06	7,69E-04	2,22	4,23E-02	1,66	1-3
hCFAH	P08603	334,08	3,35E+05	4,06E+05	7,02E+05	3,10E-03	2,09	1,10E-02	1,73	1
hCO7	P10643	144,73	2,39E+04	2,67E+04	4,95E+04	1,13E-02	2,07	3,49E-02	1,86	1
hKV302	P01619	307,04	2,10E+06	2,33E+06	4,27E+06	9,66E-03	2,03	4,72E-02	1,83	-
hC1S	P08671	566,82	2,51E+05	2,37E+05	4,98E+05	6,95E-04	1,98	7,72E-03	2,10	1-2-5-8
hVTNC	P04004	327,47	3,39E+05	4,24E+05	6,72E+05	3,05E-03	1,98	2,39E-02	1,58	7
hCO3	P01024	5852,48	1,66E+06	1,94E+06	3,21E+06	3,69E-03	1,93	3,61E-02	1,65	1
hC1R	P00736	409,92	8,79E+04	9,41E+04	1,68E+05	3,20E-05	1,92	2,25E-03	1,79	1-2-5-8
hLAC2	P0CG05	353,61	4,80E+06	5,27E+06	8,26E+06	1,92E-02	1,72	4,13E-02	1,57	-
hC1QC	P02747	358,67	1,11E+06	1,18E+06	1,90E+06	8,92E-04	1,71	1,67E-02	1,61	1-2
hSPB3	P29508	614,51	3,39E+04	2,72E+04	1,11E+04	4,03E-02	0,33	1,19E-02	0,41	8

C.S.: Puntuación de confianza. Las funciones de clasificación DAVID fueron: (1) respuesta inflamatoria/inmune, (2) hidroxilación, (3) coagulación sanguínea, (4) regulación de la apoptosis, (5) unión de metales, (6) fosforilación, (7) unión de carbohidratos, (8) actividad peptidasa, (9) transporte de lípidos y (10) integridad del citoesqueleto.

Salvo la vitronectina (VTNC), todas las proteínas características del biomaterial o recubrimiento 50M50V están directamente implicadas en la respuesta inmune, pertenecen al grupo de proteínas DAVID relacionado con la respuesta inflamatoria aguda (CRP, CO5, SAMP, C1QB, IC1, CFAH, CO7, C1S, CO3, C1R y C1QC). Se puede destacar, que la mayoría de las proteínas de este grupo están envueltas en la activación de la cascada del complemento, con la excepción de CFAH, que es una importante proteína reguladora/represora de la activación de la ruta alternativa del complemento. Con respecto a las proteínas más diferencialmente presentes sobre los biomateriales o recubrimientos de resultado positivo *in vivo*, la proteína SPB3 fue la única detectada. Dicha proteína SPB3 posee actividad endopeptidasa.

Hay que destacar que fue detectada una mayor presencia con diferencia significativa de las proteínas relacionadas con la respuesta inmune/inflamatoria adheridas a la superficie de los biomateriales 50V50G y 50M50G, comparando con los otros dos biomateriales, 70M30T y 35M35G30T.

La Tabla 5 muestra las proteínas que están adheridas de forma estadísticamente significativa al mismo tiempo en los biomateriales 50M50G y 50V50G (no compatibilidad mostrada en el modelo *in vivo*), respecto a los recubrimientos 35M35G30T y 70M30T (compatibilidad mostrada en el modelo *in vivo*).

Tabla 5. Proteínas adheridas diferencialmente al mismo tiempo en 50M50G y 50V50G con respecto a los recubrimientos sol-gel 35M35G30T y 50V50G (método Progenesis). ANOVA (p-valor < 0.05).

Descripción	SEQ ID NO:	UniProtKB
hCRP	1	P02741
hSAMP	2	P02743
hC1QC	3	P02747
hC1QB	4	P02746
hCO7	5	P10643
hVTNC	7	P04004
hKV402	9	P06312
hSAMP	2	P02743
hC1QC	3	P02747

En la Tabla 5 se observan nueve proteínas, de las cuales seis de ellas están relacionadas con el sistema inmune. Estas proteínas del sistema inmune se identifican como CRP, SAMP, C1QB, C1QC, C1S, LAC2, KV402, VTNC y CO7. Tal como se ha mencionado antes, todas ellas están implicadas en el proceso de respuesta inflamatoria aguda. Notablemente, CRP está particularmente más presente en los materiales de peor respuesta *in vivo* y su papel en la cascada del complemento es bien conocido, se trata de un activador de la ruta clásica.

Los resultados descritos hasta ahora establecen que las proteínas relacionadas con el proceso de la cascada del complemento activación/inhibición están diferencialmente más presentes en los biomateriales o recubrimientos 50M50G y 50V50G (de peor comportamiento *in vivo*). Aunque las proteínas con propiedades inhibidoras del complemento como la VTNC, están predominantemente adheridas en los recubrimientos 50M50G y 50V50G, ambos inducen la formación de un tejido conectivo o fibroso denso cuando se ensayan *in vivo*. La explicación a esta cuestión podría estar relacionada con la relación de proteínas inhibidoras/ activadoras presentes en cada superficie. Así, en la Tabla 6 se pueden ver como los biomateriales 70M30T y 35M35G30T, muestran una mayor proporción de las proteínas inhibidoras del complemento con respecto a otros biomateriales.

Tabla 6. Relación (ratio) de biomarcadores inhibidores/activadores del sistema del complemento detectadas y adheridas en los biomateriales 70M30T, 35M35G30T, 50M50G y 50V50G.

Relación	70M30T	35M35G30T	50M50G	50V50G
CFAH/CRP	75,19	61,30	17,44	10,32
CFAH/SAMP	2,04	1,37	1,07	1,28
C4BPA/CRP	18,53	11,48	4,88	1,89
C4BPA/SAMP	0,50	0,26	0,30	0,24
VTNC/CRP	76,05	64,09	21,47	9,87
VTNC/SAMP	2,06	1,43	1,31	1,23

La Tabla 6 muestra las relaciones de proteínas inhibitorias del sistema inmune absorbidas (C4BPA, CFAH y VTNC) y las proteínas activadoras absorbidas (CRP y SAMP), seleccionadas por estar más diferencialmente adheridas en los diferentes

materiales. Se puede ver que los biomateriales 70M30T y 35M35G30T muestran los mayores valores de los ratio proteínas inhibidoras del complemento absorbidas vs proteínas activadoras del complemento, comparando con los otros biomateriales con mal comportamiento *in vivo*.

5

Como conclusión, los resultados mostrados en la presente invención ponen de manifiesto la existencia de un perfil peptídico específico y concreto de proteínas que quedan adheridas al biomaterial analizado una vez éste previamente se ha puesto en contacto con una muestra de suero de un sujeto, dónde la identificación y

10 cuantificación de dicho patrón peptídico es capaz de determinar la compatibilidad de dicho biomaterial *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial en una muestra biológica aislada obtenida de un sujeto, que comprende las siguientes etapas:
 - a. Incubar el biomaterial con la muestra biológica aislada,
 - b. Determinar y cuantificar la presencia conjunta de los marcadores adheridos al biomaterial que se seleccionan de la lista que consiste en: proteína C reactiva (CRP), componente amiloide P sérico (SAMP), subunidad C del subcomponente C1q del complemento (C1QC), subunidad B del subcomponente C1q del complemento (C1QB), componente C7 del complemento (CO7), subcomponente C1s del complemento (C1S), vitronectina (VTN), inmunoglobulina Lambda-2 región cadena C (LAC2) e inmunoglobulina Kappa variable 4-1 (KV402).
 - c. Comparar el valor obtenido en la etapa (b) con un valor de referencia obtenido de un biomaterial de referencia, en donde un valor de al menos dos veces superior para cada uno de los marcadores respecto al valor de referencia obtenido para el biomaterial de referencia, es indicativo de que el biomaterial no es compatible con el sujeto.
2. El método según la reivindicación 1 donde el marcador CRP comprende la SEQ ID NO: 1, el marcador SAMP comprende la SEQ ID NO: 2, el marcador C1QC comprende la SEQ ID NO: 3, el marcador C1QB comprende la SEQ ID NO: 4, el marcador CO7 comprende la SEQ ID NO: 5, el marcador C1S comprende la SEQ ID NO: 6, el marcador VTN comprende la SEQ ID NO: 7, el marcador LAC2 comprende la SEQ ID NO: 8 y el marcador KV402 comprende la SEQ ID NO: 9.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la etapa b) comprende además la determinación y cuantificación de al menos uno de los marcadores seleccionados de la lista que consiste en: cadena alfa de la proteína de unión a C4b (C4BPA), kininógeno-1 (KNG1), complemento C5 (CO5), inhibidor de la proteasa plasmática C1 (IC1), factor H del complemento (CFAH), componente C3 del complemento (CO3), subcomponente C1r del complemento (C1R), ficolina-2, Lectina de unión a manosa serin proteasa 1 (MASP-1), y/o cualquier combinación de los mismos.

4. El método según la reivindicación 3 donde el marcador C4BPA comprende la SEQ ID NO: 10, el marcador KNG1 comprende la SEQ ID NO: 11, el marcador CO5 comprende la SEQ ID NO: 12, el marcador IC1 comprende la SEQ ID NO: 13, el marcador CFAH comprende la SEQ ID NO: 14, el marcador CO3 comprende la SEQ ID NO: 15, el marcador C1R comprende la SEQ ID NO: 16, el marcador Ficolina-2 comprende la SEQ ID NO: 17 y el marcador MASP-1 comprende la SEQ ID NO: 18.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por que comprende la determinación y cuantificación del conjunto de marcadores seleccionados de la lista que consiste en CRP que comprende la SEQ ID NO: 1, SAMP que comprende la SEQ ID NO: 2, C1QC que comprende la SEQ ID NO: 3, C1QB que comprende la SEQ ID NO: 4, CO7 que comprende la SEQ ID NO: 5, C1S que comprende la SEQ ID NO: 6, VTN que comprende la SEQ ID NO: 7, LAC2 que comprende la SEQ ID NO: 8, KV402 que comprende la SEQ ID NO: 9, C4BPA que comprende la SEQ ID NO: 10, KNG1 que comprende la SEQ ID NO: 11, CO5 que comprende la SEQ ID NO: 12, IC1 que comprende la SEQ ID NO: 13, CFAH que comprende la SEQ ID NO: 14, CO3 que comprende la SEQ ID NO: 15, C1R que comprende la SEQ ID NO: 16, Ficolina-2 que comprende la SEQ ID NO: 17 y MASP-1 que comprende la SEQ ID NO: 18.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante cualquiera de las metodologías seleccionadas del grupo que comprende: espectroscopía de masas, inmunohistoquímica, ELISA y sus variantes, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunoprecipitación.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante ELISA.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: sangre, suero y plasma sanguíneo.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra biológica aislada es suero.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el sujeto es un mamífero.
- 5 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el sujeto es un humano.
- 10 12. Uso *in vitro* de la determinación y cuantificación de la presencia conjunta de los marcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2 y KV402. para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial médico en una muestra biológica aislada obtenida de un sujeto.
- 15 13. Uso *in vitro* según la reivindicación 12 donde el marcador CRP comprende la SEQ ID NO: 1, el marcador SAMP comprende la SEQ ID NO: 2, el marcador C1QC comprende la SEQ ID NO: 3, el marcador C1QB comprende la SEQ ID NO: 4, el marcador CO7 comprende la SEQ ID NO: 5, el marcador C1S comprende la SEQ ID NO: 6, el marcador VTN comprende la SEQ ID NO: 7, el marcador LAC2 comprende la SEQ ID NO: 8 y el marcador KV402 comprende la SEQ ID NO: 9.
- 20 14. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 que además comprende la determinación y cuantificación de la presencia de al menos un marcador seleccionado de la lista que consiste en: C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, O3, C1R, Ficolina-2, MASP-1 y/o cualquier combinación de los mismos.
- 25 15. Uso *in vitro* según la reivindicación 14 donde el marcador C4BPA comprende la SEQ ID NO: 10, el marcador KNG1 comprende la SEQ ID NO: 11, el marcador CO5 comprende la SEQ ID NO: 12, el marcador IC1 comprende la SEQ ID NO: 13, el marcador CFAH comprende la SEQ ID NO: 14, el marcador CO3 comprende la SEQ ID NO: 15, el marcador C1R comprende la SEQ ID NO: 16, el marcador Ficolina-2 comprende la SEQ ID NO: 17 y el marcador MASP-1 comprende la SEQ ID NO: 18.
- 30 16. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 caracterizado por que comprende la determinación de la presencia conjunta de los marcadores seleccionados de la lista que consiste en: CRP que comprende la SEQ ID NO: 1, SAMP que comprende la SEQ ID NO: 2, C1QC que comprende la SEQ ID NO: 3,
- 35

- C1QB que comprende la SEQ ID NO: 4, CO7 que comprende la SEQ ID NO: 5, C1S que comprende la SEQ ID NO: 6, VTN que comprende la SEQ ID NO: 7, LAC2 que comprende la SEQ ID NO: 8, KV402 que comprende la SEQ ID NO: 9, C4BPA que comprende la SEQ ID NO: 10, KNG1 que comprende la SEQ ID NO: 11, CO5 que comprende la SEQ ID NO: 12, IC1 que comprende la SEQ ID NO: 13, CFAH que comprende la SEQ ID NO: 14, CO3 que comprende la SEQ ID NO: 15, C1R que comprende la SEQ ID NO: 16, Ficolina-2 que comprende la SEQ ID NO: 17 y MASP-1 que comprende la SEQ ID NO: 18.
- 10 17. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: sangre, suero y plasma sanguíneo.
- 15 18. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, donde la muestra biológica aislada es suero.
19. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, donde el sujeto es un mamífero.
- 20 20. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, donde el sujeto es un humano.
- 25 21. Kit para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial que comprende los anticuerpos, los reactivos, o cualquier combinación de los anteriores, capaces de detectar y cuantificar la presencia de los marcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CRP, SAMP, C1QC, C1QB, CO7, C1S, VTN, LAC2 y KV402.
- 30 22. Kit según la reivindicación 21 caracterizado por que el marcador CRP comprende la SEQ ID NO: 1, el marcador SAMP comprende la SEQ ID NO: 2, el marcador C1QC comprende la SEQ ID NO: 3, el marcador C1QB comprende la SEQ ID NO: 4, el marcador CO7 comprende la SEQ ID NO: 5, el marcador C1S comprende la SEQ ID NO: 6, el marcador VTN comprende la SEQ ID NO: 7, el marcador LAC2 comprende la SEQ ID NO: 8 y el marcador KV402 comprende la SEQ ID NO: 9.

23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22 caracterizado por que además comprende los anticuerpos, los reactivos, o cualquier combinación de los anteriores, capaces de detectar y cuantificar la presencia de al menos uno de los marcadores seleccionados de la lista que consiste en: C4BPA, KNG1, CO5, IC1, CFAH, CO3, C1R, Ficolian-2, MASP-1, y/o cualquier combinación de los mismos.
24. Kit según la reivindicación 23 donde el marcador C4BPA comprende la SEQ ID NO: 10, el marcador KNG1 comprende la SEQ ID NO: 11, el marcador CO5 comprende la SEQ ID NO: 12, el marcador IC1 comprende la SEQ ID NO: 13, el marcador CFAH comprende la SEQ ID NO: 14, el marcador CO3 comprende la SEQ ID NO: 15, el marcador C1R comprende la SEQ ID NO: 16, el marcador Ficolina-2 comprende la SEQ ID NO: 17 y el marcador MASP-1 comprende la SEQ ID NO: 18.
25. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 caracterizado por que comprende los anticuerpos, los reactivos, o cualquier combinación de los anteriores, capaces de detectar y cuantificar la presencia conjunta de los marcadores que se selecciona de la lista que consiste en: CRP que comprende la SEQ ID NO: 1, SAMP que comprende la SEQ ID NO: 2, C1QC que comprende la SEQ ID NO: 3, C1QB que comprende la SEQ ID NO: 4, CO7 que comprende la SEQ ID NO: 5, C1S que comprende la SEQ ID NO: 6, VTN que comprende la SEQ ID NO: 7, LAC2 que comprende la SEQ ID NO: 8, KV402 que comprende la SEQ ID NO: 9, C4BPA que comprende la SEQ ID NO: 10, KNG1 que comprende la SEQ ID NO: 11, CO5 que comprende la SEQ ID NO: 12, IC1 que comprende la SEQ ID NO: 13, CFAH que comprende la SEQ ID NO: 14, CO3 que comprende la SEQ ID NO: 15, C1R que comprende la SEQ ID NO: 16, Ficolina-2 que comprende la SEQ ID NO: 17 y MASP-1 que comprende la SEQ ID NO: 18.
26. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25 para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial en contacto con una muestra biológica aislada de un sujeto.
27. Uso *in vitro* según la reivindicación 26 donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: sangre, suero y plasma sanguíneo.
28. Uso según la reivindicación 27, donde la muestra biológica aislada es suero.

29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, donde el sujeto es un mamífero.
30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 2, donde el sujeto es un humano.
- 5

Figura 1

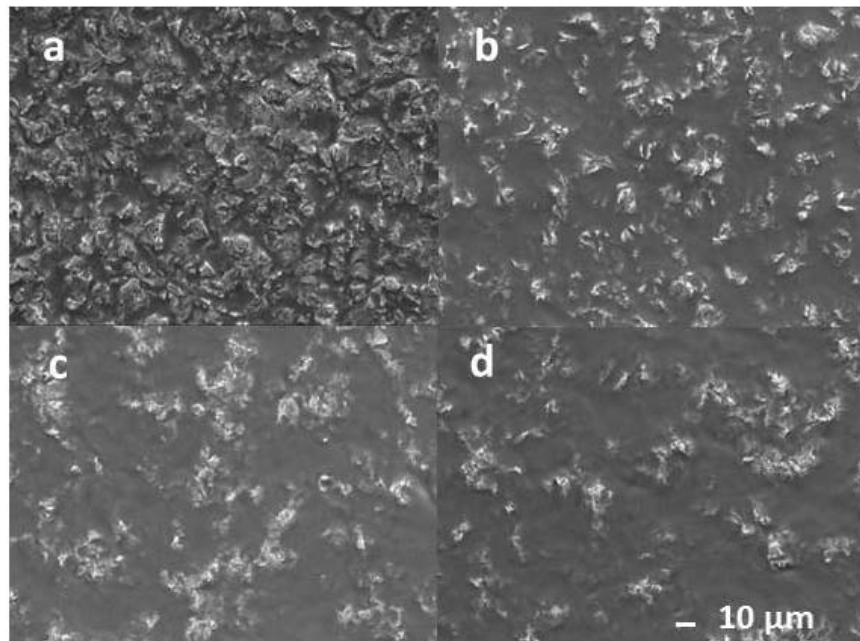


Figura 2

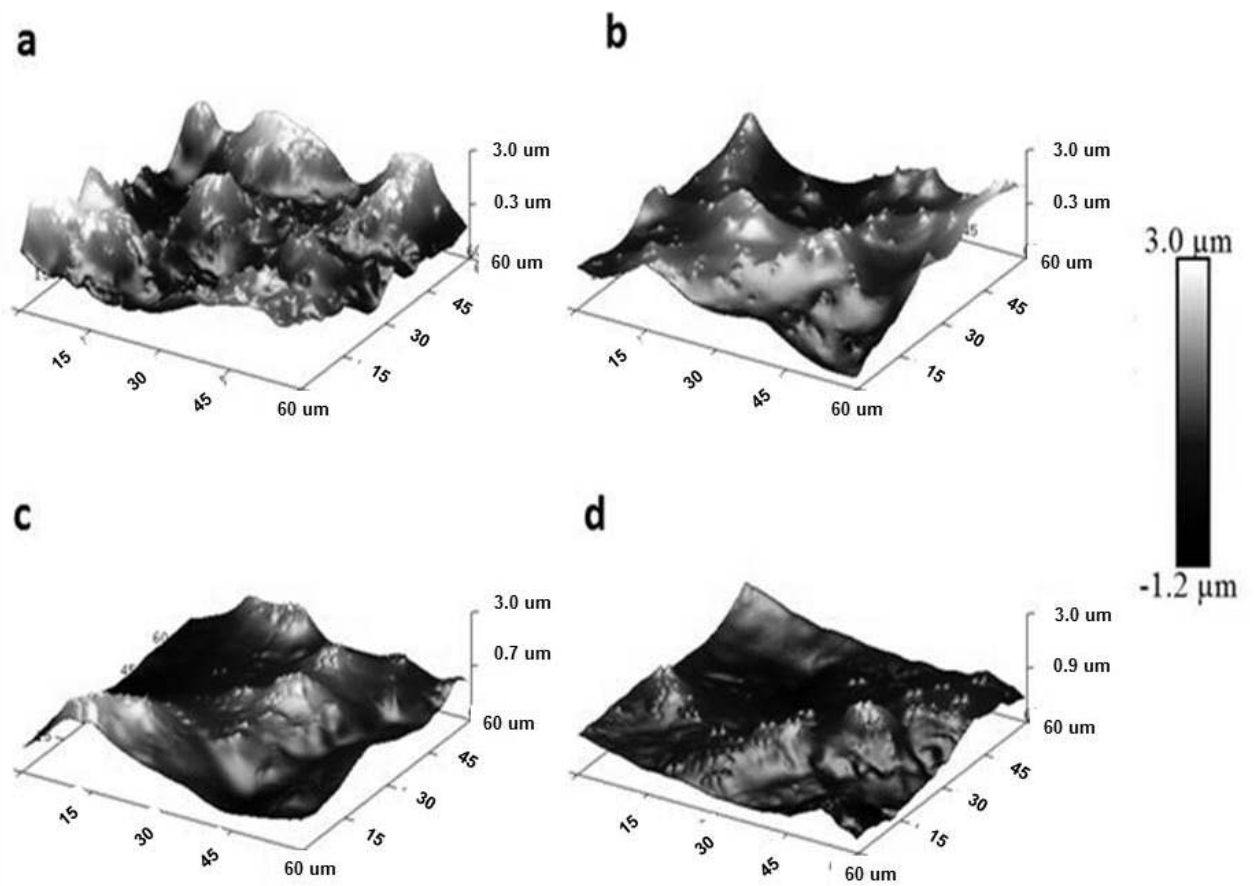


Figura 3

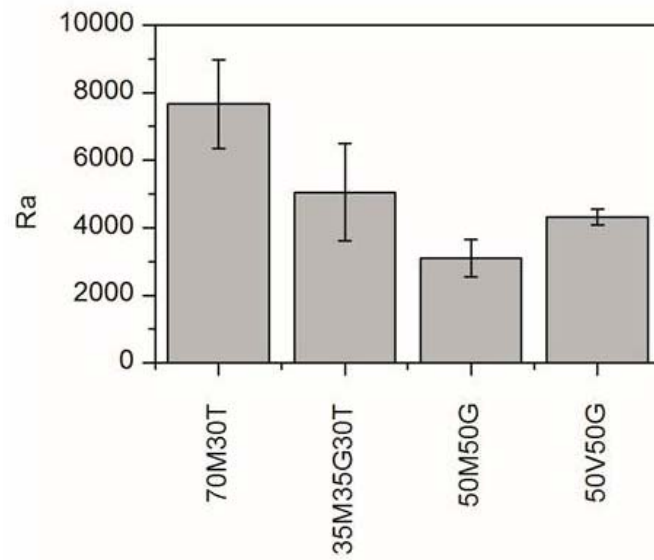


Figura 4

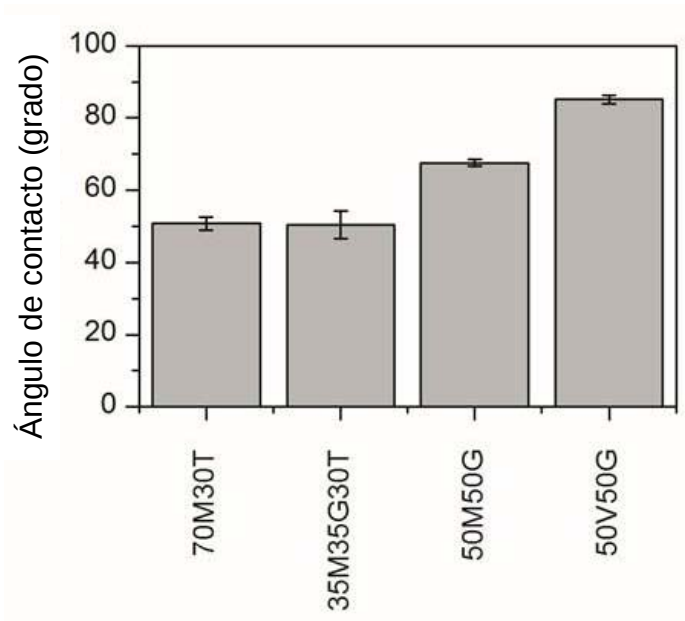


Figura 5

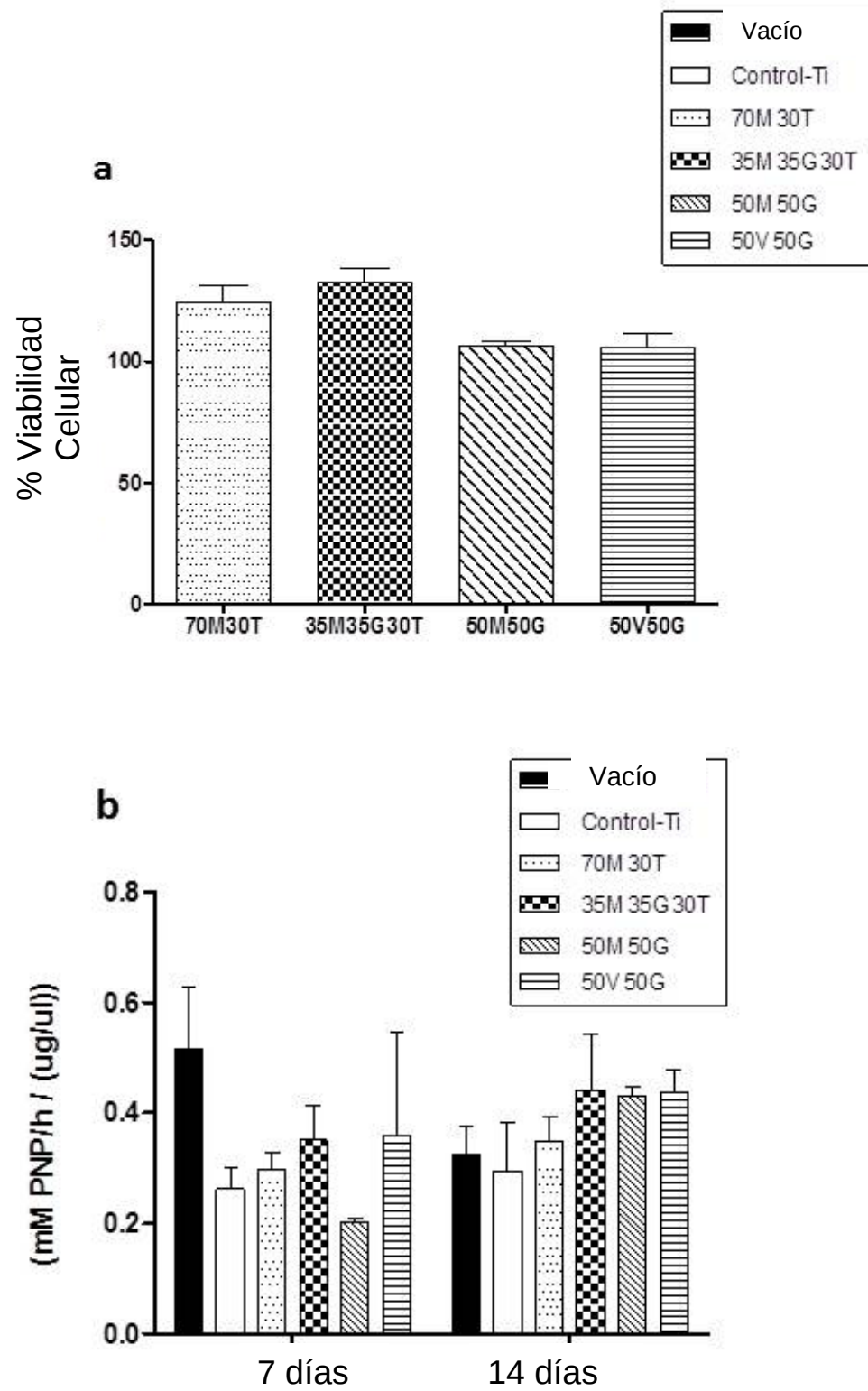


Figura 6

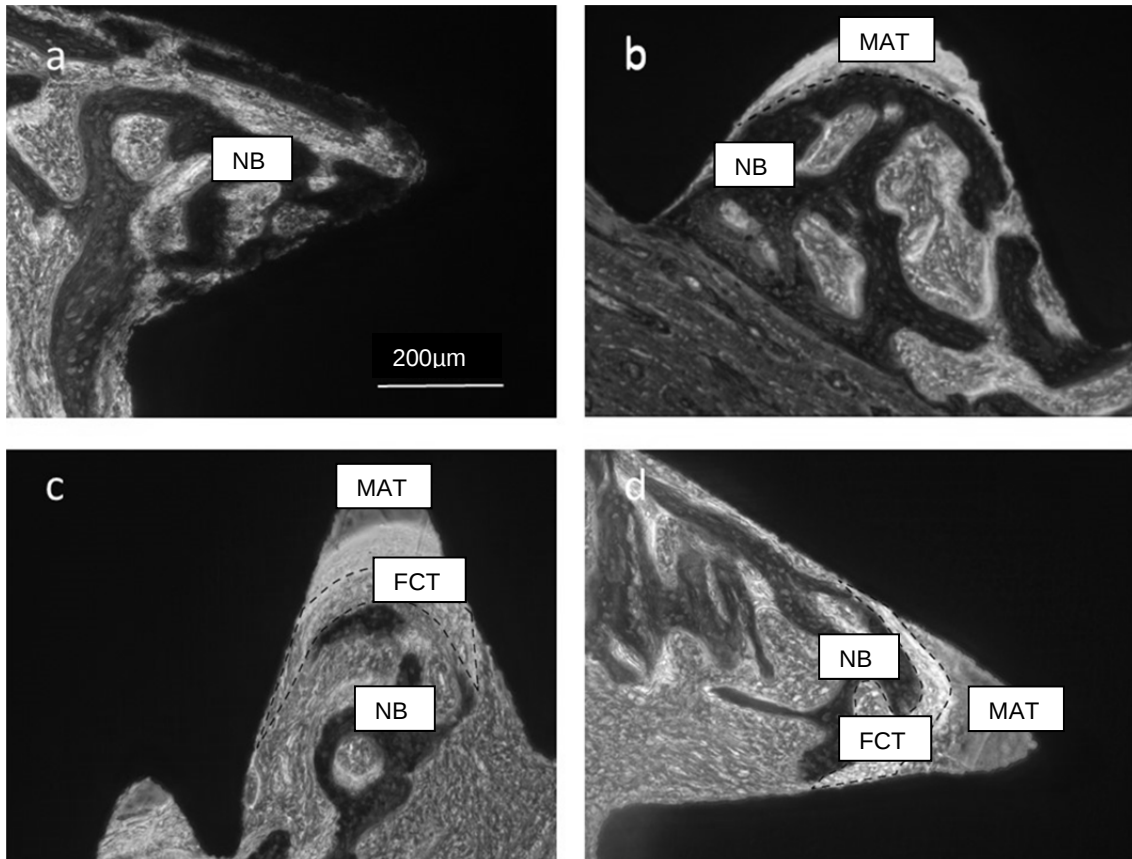
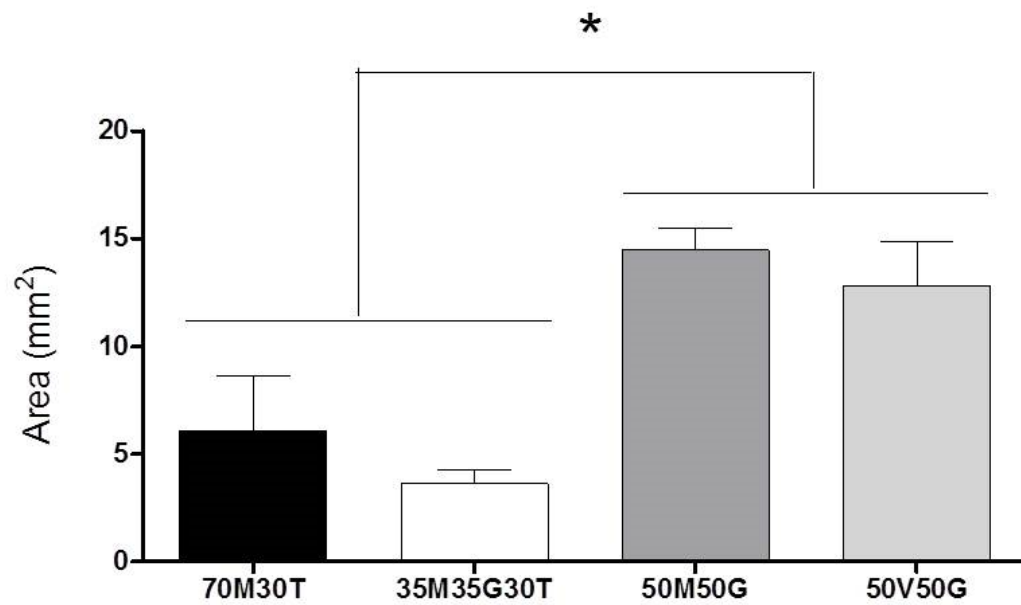


Figura 7



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitat Jaume I (UJI)
 Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
 (UPV/EHU)
 Asociación Centro De Investigación Cooperativa En
 Biociencias - CIC BIOGUNE

<120> Método in vitro para predecir y/o pronosticar la compatibilidad
 de biomateriales en un sujeto

<130> 2881.8

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Lys Leu Leu Cys Phe Leu Val Leu Thr Ser Leu Ser His Ala
 1 5 10 15

Phe Gly Gln Thr Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu
 20 25 30

Ser Asp Thr Ser Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu
 35 40 45

Lys Ala Phe Thr Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser Thr
 50 55 60

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

Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Val Gly
 85 90 95

Gly Ser Glu Ile Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr Val Ala Pro Val
 100 105 110

His Ile Cys Thr Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly Ile Val Glu Phe Trp
 115 120 125

Val Asp Gly Lys Pro Arg Val Arg Lys Ser Leu Lys Lys Gly Tyr Thr
 130 135 140

Val Gly Ala Glu Ala Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe
 145 150 155 160

Gly Gly Asn Phe Glu Gly Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn
 165 170 175

ES 2 602 620 A1

Val Asn Met Trp Asp Phe Val Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile
180 185 190

Tyr Leu Gly Gly Pro Phe Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu
195 200 205

Lys Tyr Glu Val Gln Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro
210 215 220

<210> 2
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Lys Pro Leu Leu Trp Ile Ser Val Leu Thr Ser Leu Leu Glu
1 5 10 15

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

Glu Ser Val Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro
35 40 45

Leu Gln Asn Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg
50 55 60

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

Leu Val Tyr Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg
85 90 95

His Lys Val Thr Ser Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His
100 105 110

Ile Cys Val Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile
115 120 125

Asn Gly Thr Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val
130 135 140

Glu Ala Gln Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly
145 150 155 160

Gly Lys Phe Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu
165 170 175

Tyr Met Trp Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr
180 185 190

Gln Gly Thr Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn
Página 2

ES 2 602 620 A1

195	200	205
Tyr Glu Ile Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val		
210	215	220
<210> 3		
<211> 245		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu		
1	5	10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys		
	20	25 30
Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp		
	35	40 45
Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala		
	50	55 60
Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu		
65	70	75 80
Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro		
	85	90 95
Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly		
	100	105 110
Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr		
	115	120 125
His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu		
	130	135 140
Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys		
145	150	155 160
Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala		
	165	170 175
Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe		
	180	185 190
Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu		
	195	200 205
Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr		
	210	215 220

ES 2 602 620 A1

Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe
225 230 235 240

Leu Leu Phe Pro Asp
245

<210> 4
<211> 253
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Met Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr
20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
35 40 45

Pro Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
50 55 60

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

Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
85 90 95

Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
100 105 110

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

Thr Ile Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
130 135 140

Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
145 150 155 160

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

Arg Gly Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln
180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
195 200 205

ES 2 602 620 A1

Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
225 230 235 240

Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
245 250

<210> 5
<211> 843
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Gln Ser Phe Ser Ser Ala Ser Ser Pro Val Asn Cys Gln Trp Asp Phe
20 25 30

Tyr Ala Pro Trp Ser Glu Cys Asn Gly Cys Thr Lys Thr Gln Thr Arg
35 40 45

Arg Arg Ser Val Ala Val Tyr Gly Gln Tyr Gly Gly Gln Pro Cys Val
50 55 60

Gly Asn Ala Phe Glu Thr Gln Ser Cys Glu Pro Thr Arg Gly Cys Pro
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gly Cys Gly Glu Arg Phe Arg Cys Phe Ser Gly Gln Cys
85 90 95

Ile Ser Lys Ser Leu Val Cys Asn Gly Asp Ser Asp Cys Asp Glu Asp
100 105 110

Ser Ala Asp Glu Asp Arg Cys Glu Asp Ser Glu Arg Arg Pro Ser Cys
115 120 125

Asp Ile Asp Lys Pro Pro Pro Asn Ile Glu Leu Thr Gly Asn Gly Tyr
130 135 140

Asn Glu Leu Thr Gly Gln Phe Arg Asn Arg Val Ile Asn Thr Lys Ser
145 150 155 160

Phe Gly Gly Gln Cys Arg Lys Val Phe Ser Gly Asp Gly Lys Asp Phe
165 170 175

Tyr Arg Leu Ser Gly Asn Val Leu Ser Tyr Thr Phe Gln Val Lys Ile
180 185 190

ES 2 602 620 A1

Asn Asn Asp Phe Asn Tyr Glu Phe Tyr Asn Ser Thr Trp Ser Tyr Val
 195 200 205
 Lys His Thr Ser Thr Glu His Thr Ser Ser Ser Arg Lys Arg Ser Phe
 210 215 220
 Phe Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Thr Ser His Thr Asn
 225 230 235 240
 Glu Ile His Lys Gly Lys Ser Tyr Gln Leu Leu Val Val Glu Asn Thr
 245 250 255
 Val Glu Val Ala Gln Phe Ile Asn Asn Asn Pro Glu Phe Leu Gln Leu
 260 265 270
 Ala Glu Pro Phe Trp Lys Glu Leu Ser His Leu Pro Ser Leu Tyr Asp
 275 280 285
 Tyr Ser Ala Tyr Arg Arg Leu Ile Asp Gln Tyr Gly Thr His Tyr Leu
 290 295 300
 Gln Ser Gly Ser Leu Gly Gly Glu Tyr Arg Val Leu Phe Tyr Val Asp
 305 310 315 320
 Ser Glu Lys Leu Lys Gln Asn Asp Phe Asn Ser Val Glu Glu Lys Lys
 325 330 335
 Cys Lys Ser Ser Gly Trp His Phe Val Val Lys Phe Ser Ser His Gly
 340 345 350
 Cys Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Ala Ala Ser Gly Thr Gln Asn
 355 360 365
 Asn Val Leu Arg Gly Glu Pro Phe Ile Arg Gly Gly Gly Ala Gly Phe
 370 375 380
 Ile Ser Gly Leu Ser Tyr Leu Glu Leu Asp Asn Pro Ala Gly Asn Lys
 385 390 395 400
 Arg Arg Tyr Ser Ala Trp Ala Glu Ser Val Thr Asn Leu Pro Gln Val
 405 410 415
 Ile Lys Gln Lys Leu Thr Pro Leu Tyr Glu Leu Val Lys Glu Val Pro
 420 425 430
 Cys Ala Ser Val Lys Lys Leu Tyr Leu Lys Trp Ala Leu Glu Glu Tyr
 435 440 445
 Leu Asp Glu Phe Asp Pro Cys His Cys Arg Pro Cys Gln Asn Gly Gly
 450 455 460

ES 2 602 620 A1

Leu Ala Thr Val Glu Gly Thr His Cys Leu Cys His Cys Lys Pro Tyr
 465 470 475 480
 Thr Phe Gly Ala Ala Cys Glu Gln Gly Val Leu Val Gly Asn Gln Ala
 485 490 495
 Gly Gly Val Asp Gly Gly Trp Ser Cys Trp Ser Ser Trp Ser Pro Cys
 500 505 510
 Val Gln Gly Lys Lys Thr Arg Ser Arg Glu Cys Asn Asn Pro Pro Pro
 515 520 525
 Ser Gly Gly Gly Arg Ser Cys Val Gly Glu Thr Thr Glu Ser Thr Gln
 530 535 540
 Cys Glu Asp Glu Glu Leu Glu His Leu Arg Leu Leu Glu Pro His Cys
 545 550 555 560
 Phe Pro Leu Ser Leu Val Pro Thr Glu Phe Cys Pro Ser Pro Pro Ala
 565 570 575
 Leu Lys Asp Gly Phe Val Gln Asp Glu Gly Thr Met Phe Pro Val Gly
 580 585 590
 Lys Asn Val Val Tyr Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Leu Ile Gly Asn
 595 600 605
 Pro Val Ala Arg Cys Gly Glu Asp Leu Arg Trp Leu Val Gly Glu Met
 610 615 620
 His Cys Gln Lys Ile Ala Cys Val Leu Pro Val Leu Met Asp Gly Ile
 625 630 635 640
 Gln Ser His Pro Gln Lys Pro Phe Tyr Thr Val Gly Glu Lys Val Thr
 645 650 655
 Val Ser Cys Ser Gly Gly Met Ser Leu Glu Gly Pro Ser Ala Phe Leu
 660 665 670
 Cys Gly Ser Ser Leu Lys Trp Ser Pro Glu Met Lys Asn Ala Arg Cys
 675 680 685
 Val Gln Lys Glu Asn Pro Leu Thr Gln Ala Val Pro Lys Cys Gln Arg
 690 695 700
 Trp Glu Lys Leu Gln Asn Ser Arg Cys Val Cys Lys Met Pro Tyr Glu
 705 710 715 720
 Cys Gly Pro Ser Leu Asp Val Cys Ala Gln Asp Glu Arg Ser Lys Arg
 725 730 735

ES 2 602 620 A1

Ile Leu Pro Leu Thr Val Cys Lys Met His Val Leu His Cys Gln Gly
740 745 750

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

Ala Glu Lys Ala Cys Gly Ala Cys Pro Leu Trp Gly Lys Cys Asp Ala
770 775 780

Glu Ser Ser Lys Cys Val Cys Arg Glu Ala Ser Glu Cys Glu Glu Glu
785 790 795 800

Gly Phe Ser Ile Cys Val Glu Val Asn Gly Lys Glu Gln Thr Met Ser
805 810 815

Glu Cys Glu Ala Gly Ala Leu Arg Cys Arg Gly Gln Ser Ile Ser Val
820 825 830

Thr Ser Ile Arg Pro Cys Ala Ala Glu Thr Gln
835 840

<210> 6
<211> 688
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Trp Cys Ile Val Leu Phe Ser Leu Leu Ala Trp Val Tyr Ala Glu
1 5 10 15

Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala Tyr
20 25 30

Pro Ser Glu Val Glu Lys Ser Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly Tyr
35 40 45

Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Ile Glu Leu Ser Glu Asn
50 55 60

Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Ile Ser Gly Asp Thr Glu Glu Gly
65 70 75 80

Arg Leu Cys Gly Gln Arg Ser Ser Asn Asn Pro His Ser Pro Ile Val
85 90 95

Glu Glu Phe Gln Val Pro Tyr Asn Lys Leu Gln Val Ile Phe Lys Ser
100 105 110

Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Ala Ala Tyr Tyr Val
115 120 125

Ala Thr Asp Ile Asn Glu Cys Thr Asp Phe Val Asp Val Pro Cys Ser
Página 8

ES 2 602 620 A1

130					135					140					
His 145	Phe	Cys	Asn	Asn	Phe 150	Ile	Gly	Gly	Tyr	Phe 155	Cys	Ser	Cys	Pro	Pro 160
Glu	Tyr	Phe	Leu	His 165	Asp	Asp	Met	Lys	Asn 170	Cys	Gly	Val	Asn	Cys 175	Ser
Gly	Asp	Val	Phe 180	Thr	Ala	Leu	Ile	Gly 185	Glu	Ile	Ala	Ser	Pro 190	Asn	Tyr
Pro	Lys	Pro 195	Tyr	Pro	Glu	Asn	Ser 200	Arg	Cys	Glu	Tyr	Gln 205	Ile	Arg	Leu
Glu	Lys 210	Gly	Phe	Gln	Val	Val 215	Val	Thr	Leu	Arg	Arg 220	Glu	Asp	Phe	Asp
Val 225	Glu	Ala	Ala	Asp	Ser 230	Ala	Gly	Asn	Cys	Leu 235	Asp	Ser	Leu	Val	Phe 240
Val	Ala	Gly	Asp	Arg 245	Gln	Phe	Gly	Pro	Tyr 250	Cys	Gly	His	Gly	Phe 255	Pro
Gly	Pro	Leu	Asn 260	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser 265	Asn	Ala	Leu	Asp	Ile 270	Ile	Phe
Gln	Thr	Asp 275	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys 280	Lys	Gly	Trp	Lys	Leu 285	Arg	Tyr	His
Gly	Asp 290	Pro	Met	Pro	Cys	Pro 295	Lys	Glu	Asp	Thr	Pro 300	Asn	Ser	Val	Trp
Glu 305	Pro	Ala	Lys	Ala	Lys 310	Tyr	Val	Phe	Arg	Asp 315	Val	Val	Gln	Ile	Thr 320
Cys	Leu	Asp	Gly	Phe 325	Glu	Val	Val	Glu	Gly 330	Arg	Val	Gly	Ala	Thr 335	Ser
Phe	Tyr	Ser	Thr 340	Cys	Gln	Ser	Asn	Gly 345	Lys	Trp	Ser	Asn	Ser 350	Lys	Leu
Lys	Cys	Gln 355	Pro	Val	Asp	Cys	Gly 360	Ile	Pro	Glu	Ser	Ile 365	Glu	Asn	Gly
Lys	Val 370	Glu	Asp	Pro	Glu	Ser 375	Thr	Leu	Phe	Gly	Ser 380	Val	Ile	Arg	Tyr
Thr 385	Cys	Glu	Glu	Pro	Tyr 390	Tyr	Tyr	Met	Glu	Asn 395	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu 400
Tyr	His	Cys	Ala	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Gly	Pro

ES 2 602 620 A1

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

ES 2 602 620 A1

675

680

685

<210> 7
<211> 478
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ala Pro Leu Arg Pro Leu Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Trp Val
1 5 10 15

Ala Leu Ala Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Glu Gly Phe
20 25 30

Asn Val Asp Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Ser Tyr Tyr Gln
35 40 45

Ser Cys Cys Thr Asp Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg
50 55 60

Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Glu Tyr Thr Val Tyr Asp Asp
65 70 75 80

Gly Glu Glu Lys Asn Asn Ala Thr Val His Glu Gln Val Gly Gly Pro
85 90 95

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

Thr Pro Val Leu Lys Pro Glu Glu Glu Ala Pro Ala Pro Glu Val Gly
115 120 125

Ala Ser Lys Pro Glu Gly Ile Asp Ser Arg Pro Glu Thr Leu His Pro
130 135 140

Gly Arg Pro Gln Pro Pro Ala Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro
145 150 155 160

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

Gly Gln Tyr Cys Tyr Glu Leu Asp Glu Lys Ala Val Arg Pro Gly Tyr
180 185 190

Pro Lys Leu Ile Arg Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala
195 200 205

Ala Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly
210 215 220

Ser Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Asp Tyr Pro
225 230 235 240

ES 2 602 620 A1

Arg Asn Ile Ser Asp Gly Phe Asp Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala
 245 250 255
 Ala Leu Ala Leu Pro Ala His Ser Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr
 260 265 270
 Phe Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu Tyr Gln Phe Gln His Gln Pro
 275 280 285
 Ser Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His
 290 295 300
 Phe Ala Met Met Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asp Ile Phe Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Phe Trp Gly Arg Thr Ser Ala Gly Thr Arg Gln Pro Gln Phe Ile Ser
 325 330 335
 Arg Asp Trp His Gly Val Pro Gly Gln Val Asp Ala Ala Met Ala Gly
 340 345 350
 Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Met Ala Pro Arg Pro Ser Leu Ala Lys Lys
 355 360 365
 Gln Arg Phe Arg His Arg Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly
 370 375 380
 His Ser Arg Gly Arg Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Thr
 385 390 395 400
 Trp Leu Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Asn Leu Gly Ala Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Asp Asp Tyr Arg Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu Pro
 420 425 430
 Ile Gln Ser Val Phe Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val Asn
 435 440 445
 Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Thr Val Asp Pro Pro Tyr Pro Arg Ser
 450 455 460
 Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Ala Pro Gly His Leu
 465 470 475

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

ES 2 602 620 A1

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

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
115 120

ES 2 602 620 A1

<210> 10
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Met Ala Ala Trp Pro Phe Ser Arg Leu Trp Lys Val Ser Asp Pro Ile
 20 25 30

Leu Phe Gln Met Thr Leu Ile Ala Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Gly
 35 40 45

Asn Cys Gly Pro Pro Pro Thr Leu Ser Phe Ala Ala Pro Met Asp Ile
 50 55 60

Thr Leu Thr Glu Thr Arg Phe Lys Thr Gly Thr Thr Leu Lys Tyr Thr
 65 70 75 80

Cys Leu Pro Gly Tyr Val Arg Ser His Ser Thr Gln Thr Leu Thr Cys
 85 90 95

Asn Ser Asp Gly Glu Trp Val Tyr Asn Thr Phe Cys Ile Tyr Lys Arg
 100 105 110

Cys Arg His Pro Gly Glu Leu Arg Asn Gly Gln Val Glu Ile Lys Thr
 115 120 125

Asp Leu Ser Phe Gly Ser Gln Ile Glu Phe Ser Cys Ser Glu Gly Phe
 130 135 140

Phe Leu Ile Gly Ser Thr Thr Ser Arg Cys Glu Val Gln Asp Arg Gly
 145 150 155 160

Val Gly Trp Ser His Pro Leu Pro Gln Cys Glu Ile Val Lys Cys Lys
 165 170 175

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

Tyr Ala Tyr Gly Phe Ser Val Thr Tyr Ser Cys Asp Pro Arg Phe Ser
 195 200 205

Leu Leu Gly His Ala Ser Ile Ser Cys Thr Val Glu Asn Glu Thr Ile
 210 215 220

Gly Val Trp Arg Pro Ser Pro Pro Thr Cys Glu Lys Ile Thr Cys Arg
 225 230 235 240

Lys Pro Asp Val Ser His Gly Glu Met Val Ser Gly Phe Gly Pro Ile

ES 2 602 620 A1

245								250				255			
Tyr	Asn	Tyr	Lys 260	Asp	Thr	Ile	Val	Phe 265	Lys	Cys	Gln	Lys	Gly 270	Phe	Val
Leu	Arg	Gly 275	Ser	Ser	Val	Ile	His 280	Cys	Asp	Ala	Asp	Ser 285	Lys	Trp	Asn
Pro	Ser 290	Pro	Pro	Ala	Cys	Glu 295	Pro	Asn	Ser	Cys	Ile 300	Asn	Leu	Pro	Asp
Ile 305	Pro	His	Ala	Ser	Trp 310	Glu	Thr	Tyr	Pro	Arg 315	Pro	Thr	Lys	Glu	Asp 320
Val	Tyr	Val	Val	Gly 325	Thr	Val	Leu	Arg	Tyr 330	Arg	Cys	His	Pro	Gly 335	Tyr
Lys	Pro	Thr	Thr 340	Asp	Glu	Pro	Thr	Thr 345	Val	Ile	Cys	Gln	Lys 350	Asn	Leu
Arg	Trp	Thr 355	Pro	Tyr	Gln	Gly	Cys 360	Glu	Ala	Leu	Cys	Cys 365	Pro	Glu	Pro
Lys	Leu 370	Asn	Asn	Gly	Glu	Ile 375	Thr	Gln	His	Arg	Lys 380	Ser	Arg	Pro	Ala
Asn 385	His	Cys	Val	Tyr	Phe 390	Tyr	Gly	Asp	Glu	Ile 395	Ser	Phe	Ser	Cys	His 400
Glu	Thr	Ser	Arg	Phe 405	Ser	Ala	Ile	Cys	Gln 410	Gly	Asp	Gly	Thr	Trp 415	Ser
Pro	Arg	Thr	Pro 420	Ser	Cys	Gly	Asp	Ile 425	Cys	Asn	Phe	Pro	Pro 430	Lys	Ile
Ala	His	Gly 435	His	Tyr	Lys	Gln 440	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ser	Phe 445	Phe	Lys	Glu
Glu	Ile 450	Ile	Tyr	Glu	Cys	Asp 455	Lys	Gly	Tyr	Ile	Leu 460	Val	Gly	Gln	Ala
Lys 465	Leu	Ser	Cys	Ser	Tyr 470	Ser	His	Trp	Ser	Ala 475	Pro	Ala	Pro	Gln	Cys 480
Lys	Ala	Leu	Cys	Arg 485	Lys	Pro	Glu	Leu	Val 490	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser 495	Val
Asp	Lys	Asp	Gln 500	Tyr	Val	Glu	Pro	Glu 505	Asn	Val	Thr	Ile	Gln 510	Cys	Asp
Ser	Gly	Tyr	Gly	Val	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asn

ES 2 602 620 A1

515					520					525					
Arg	Thr	Trp	Tyr	Pro	Glu	Val	Pro	Lys	Cys	Glu	Trp	Glu	Thr	Pro	Glu
	530					535					540				
Gly	Cys	Glu	Gln	Val	Leu	Thr	Gly	Lys	Arg	Leu	Met	Gln	Cys	Leu	Pro
545					550					555					560
Asn	Pro	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Ala	Leu	Glu	Val	Tyr	Lys	Leu	Ser	Leu
				565					570					575	
Glu	Ile	Glu	Gln	Leu	Glu	Leu	Gln	Arg	Asp	Ser	Ala	Arg	Gln	Ser	Thr
			580					585					590		
Leu	Asp	Lys	Glu	Leu											
		595													
<210> 11															
<211> 644															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 11															
Met	Lys	Leu	Ile	Thr	Ile	Leu	Phe	Leu	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Leu	Thr	Gln	Glu	Ser	Gln	Ser	Glu	Glu	Ile	Asp	Cys	Asn	Asp	Lys	Asp
			20					25					30		
Leu	Phe	Lys	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Lys	Lys	Tyr	Asn	Ser	Gln	Asn
		35					40					45			
Gln	Ser	Asn	Asn	Gln	Phe	Val	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Thr	Lys
	50					55					60				
Thr	Val	Gly	Ser	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	Glu	Ile	Lys	Glu
65					70					75					80
Gly	Asp	Cys	Pro	Val	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Trp	Gln	Asp	Cys	Glu	Tyr
				85					90					95	
Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Thr	Gly	Glu	Cys	Thr	Ala	Thr	Val	Gly
			100					105					110		
Lys	Arg	Ser	Ser	Thr	Lys	Phe	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Thr	Cys	Gln	Ile
		115					120					125			
Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Ala	Gln	Tyr	Asp	Cys	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Val	His	Pro	Ile	Ser	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Leu	Glu	Pro	Ile	Leu
145					150					155					160

ES 2 602 620 A1

Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu
 165 170 175
 Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly
 180 185 190
 Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys
 195 200 205
 Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly
 210 215 220
 Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe
 245 250 255
 Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro
 260 265 270
 Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys
 275 280 285
 Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val
 290 295 300
 Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp
 305 310 315 320
 Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu
 325 330 335
 Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn
 340 345 350
 Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val
 355 360 365
 Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly
 370 375 380
 Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr
 385 390 395 400
 Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu
 405 410 415
 Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly
 420 425 430

ES 2 602 620 A1

His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu
435 440 445

Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly
450 455 460

His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp
465 470 475 480

Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys
485 490 495

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
500 505 510

Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser
515 520 525

Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly
530 535 540

Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe
545 550 555 560

Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile
565 570 575

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln
580 585 590

Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp
595 600 605

Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu
610 615 620

Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr
625 630 635 640

Asp Gly Leu Ser

<210> 12
<211> 1676
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

ES 2 602 620 A1

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
 20 25 30
 Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
 35 40 45
 Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
 50 55 60
 Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
 65 70 75 80
 Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
 85 90 95
 Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
 100 105 110
 Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
 115 120 125
 His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
 130 135 140
 Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu
 165 170 175
 Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
 180 185 190
 Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
 195 200 205
 Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
 210 215 220
 Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr
 225 230 235 240
 Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
 245 250 255
 Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
 260 265 270
 Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
 275 280 285

ES 2 602 620 A1

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
 290 295 300
 Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
 305 310 315 320
 Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
 325 330 335
 Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
 340 345 350
 Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro
 355 360 365
 Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
 370 375 380
 Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
 385 390 395 400
 Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
 405 410 415
 Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
 420 425 430
 Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
 435 440 445
 Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
 450 455 460
 Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
 465 470 475 480
 His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
 485 490 495
 Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
 500 505 510
 Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
 515 520 525
 Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
 530 535 540
 Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
 545 550 555 560

ES 2 602 620 A1

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
 565 570 575
 Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
 580 585 590
 Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
 595 600 605
 Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
 610 615 620
 Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640
 Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
 645 650 655
 Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
 660 665 670
 Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
 675 680 685
 Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
 690 695 700
 Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
 705 710 715 720
 Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
 725 730 735
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
 740 745 750
 His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
 755 760 765
 Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
 770 775 780
 Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
 785 790 795 800
 Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
 805 810 815
 Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
 820 825 830

ES 2 602 620 A1

Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
 835 840 845
 Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
 850 855 860
 Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
 865 870 875 880
 Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
 885 890 895
 Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
 900 905 910
 Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
 915 920 925
 Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
 930 935 940
 Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
 945 950 955 960
 Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
 965 970 975
 Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
 980 985 990
 Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
 995 1000 1005
 Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
 1010 1015 1020
 Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro
 1025 1030 1035
 Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met
 1040 1045 1050
 Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val
 1055 1060 1065
 Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu
 1070 1075 1080
 Arg Val Leu Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn
 1085 1090 1095

ES 2 602 620 A1

Ser	Ile 1100	Cys	Asn	Ser	Leu	Leu 1105	Trp	Leu	Val	Glu	Asn 1110	Tyr	Gln	Leu
Asp	Asn 1115	Gly	Ser	Phe	Lys	Glu 1120	Asn	Ser	Gln	Tyr	Gln 1125	Pro	Ile	Lys
Leu	Gln 1130	Gly	Thr	Leu	Pro	Val 1135	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn 1140	Ser	Leu	Tyr
Leu	Thr 1145	Ala	Phe	Thr	Val	Ile 1150	Gly	Ile	Arg	Lys	Ala 1155	Phe	Asp	Ile
Cys	Pro 1160	Leu	Val	Lys	Ile	Asp 1165	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys 1170	Ala	Asp	Asn
Phe	Leu 1175	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu 1180	Pro	Ala	Gln	Ser	Thr 1185	Phe	Thr	Leu
Ala	Ile 1190	Ser	Ala	Tyr	Ala	Leu 1195	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys 1200	Thr	His	Pro
Gln	Phe 1205	Arg	Ser	Ile	Val	Ser 1210	Ala	Leu	Lys	Arg	Glu 1215	Ala	Leu	Val
Lys	Gly 1220	Asn	Pro	Pro	Ile	Tyr 1225	Arg	Phe	Trp	Lys	Asp 1230	Asn	Leu	Gln
His	Lys 1235	Asp	Ser	Ser	Val	Pro 1240	Asn	Thr	Gly	Thr	Ala 1245	Arg	Met	Val
Glu	Thr 1250	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu 1255	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn 1260	Leu	Lys	Asp
Ile	Asn 1265	Tyr	Val	Asn	Pro	Val 1270	Ile	Lys	Trp	Leu	Ser 1275	Glu	Glu	Gln
Arg	Tyr 1280	Gly	Gly	Gly	Phe	Tyr 1285	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr 1290	Ile	Asn	Ala
Ile	Glu 1295	Gly	Leu	Thr	Glu	Tyr 1300	Ser	Leu	Leu	Val	Lys 1305	Gln	Leu	Arg
Leu	Ser 1310	Met	Asp	Ile	Asp	Val 1315	Ser	Tyr	Lys	His	Lys 1320	Gly	Ala	Leu
His	Asn 1325	Tyr	Lys	Met	Thr	Asp 1330	Lys	Asn	Phe	Leu	Gly 1335	Arg	Pro	Val
Glu	Val 1340	Leu	Leu	Asn	Asp	Asp 1345	Leu	Ile	Val	Ser	Thr 1350	Gly	Phe	Gly

ES 2 602 620 A1

Ser	Gly 1355	Leu	Ala	Thr	Val	His 1360	Val	Thr	Thr	Val	Val 1365	His	Lys	Thr
Ser	Thr 1370	Ser	Glu	Glu	Val	Cys 1375	Ser	Phe	Tyr	Leu	Lys 1380	Ile	Asp	Thr
Gln	Asp 1385	Ile	Glu	Ala	Ser	His 1390	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Gly 1395	Asn	Ser	Asp
Tyr	Lys 1400	Arg	Ile	Val	Ala	Cys 1405	Ala	Ser	Tyr	Lys	Pro 1410	Ser	Arg	Glu
Glu	Ser 1415	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser 1420	His	Ala	Val	Met	Asp 1425	Ile	Ser	Leu
Pro	Thr 1430	Gly	Ile	Ser	Ala	Asn 1435	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys 1440	Ala	Leu	Val
Glu	Gly 1445	Val	Asp	Gln	Leu	Phe 1450	Thr	Asp	Tyr	Gln	Ile 1455	Lys	Asp	Gly
His	Val 1460	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn 1465	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser 1470	Asp	Phe	Leu
Cys	Val 1475	Arg	Phe	Arg	Ile	Phe 1480	Glu	Leu	Phe	Glu	Val 1485	Gly	Phe	Leu
Ser	Pro 1490	Ala	Thr	Phe	Thr	Val 1495	Tyr	Glu	Tyr	His	Arg 1500	Pro	Asp	Lys
Gln	Cys 1505	Thr	Met	Phe	Tyr	Ser 1510	Thr	Ser	Asn	Ile	Lys 1515	Ile	Gln	Lys
Val	Cys 1520	Glu	Gly	Ala	Ala	Cys 1525	Lys	Cys	Val	Glu	Ala 1530	Asp	Cys	Gly
Gln	Met 1535	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp 1540	Leu	Thr	Ile	Ser	Ala 1545	Glu	Thr	Arg
Lys	Gln 1550	Thr	Ala	Cys	Lys	Pro 1555	Glu	Ile	Ala	Tyr	Ala 1560	Tyr	Lys	Val
Ser	Ile 1565	Thr	Ser	Ile	Thr	Val 1570	Glu	Asn	Val	Phe	Val 1575	Lys	Tyr	Lys
Ala	Thr 1580	Leu	Leu	Asp	Ile	Tyr 1585	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala 1590	Val	Ala	Glu
Lys	Asp 1595	Ser	Glu	Ile	Thr	Phe 1600	Ile	Lys	Lys	Val	Thr 1605	Cys	Thr	Asn

ES 2 602 620 A1

Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu
1610 1615 1620

Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro
1625 1630 1635

Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr
1640 1645 1650

Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala
1655 1660 1665

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1670 1675

<210> 13
<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
20 25 30

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

Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser
50 55 60

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

Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr
85 90 95

Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp
100 105 110

Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr
115 120 125

Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp
130 135 140

Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met
145 150 155 160

ES 2 602 620 A1

Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser
 165 170 175
 Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn
 180 185 190
 Leu Glu Ser Ile Leu Ser Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln
 195 200 205
 Ala Leu Lys Gly Phe Thr Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile
 210 215 220
 Phe His Ser Pro Asp Leu Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser
 225 230 235 240
 Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp
 245 250 255
 Ala Asn Leu Glu Leu Ile Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn
 260 265 270
 Lys Ile Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val
 275 280 285
 Leu Leu Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp
 290 295 300
 Pro Lys Lys Thr Arg Met Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile
 305 310 315 320
 Lys Val Pro Met Met Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile
 325 330 335
 Asp Gln Thr Leu Lys Ala Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn
 340 345 350
 Leu Ser Leu Val Ile Leu Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu
 355 360 365
 Asp Met Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu
 370 375 380
 Lys Leu Glu Met Ser Lys Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg
 385 390 395 400
 Ile Lys Val Thr Thr Ser Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu
 405 410 415
 Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu
 420 425 430

ES 2 602 620 A1

Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu
435 440 445

Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val
450 455 460

Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val
465 470 475 480

Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr
485 490 495

Asp Pro Arg Ala
500

<210> 14
<211> 1231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys
1 5 10 15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile
20 25 30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala
35 40 45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met
50 55 60

Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys
65 70 75 80

Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr
100 105 110

Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu
115 120 125

Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val
130 135 140

Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser
145 150 155 160

Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe
Página 27

ES 2 602 620 A1

165								170					175				
Val	Cys	Asn	Ser	Gly	Tyr	Lys	Ile	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Met	His	Cys		
			180					185					190				
Ser	Asp	Asp	Gly	Phe	Trp	Ser	Lys	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Val	Glu	Ile		
		195					200					205					
Ser	Cys	Lys	Ser	Pro	Asp	Val	Ile	Asn	Gly	Ser	Pro	Ile	Ser	Gln	Lys		
	210					215					220						
Ile	Ile	Tyr	Lys	Glu	Asn	Glu	Arg	Phe	Gln	Tyr	Lys	Cys	Asn	Met	Gly		
225					230					235					240		
Tyr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Arg	Gly	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Glu	Ser	Gly	Trp		
				245					250					255			
Arg	Pro	Leu	Pro	Ser	Cys	Glu	Glu	Lys	Ser	Cys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Ile		
			260					265					270				
Pro	Asn	Gly	Asp	Tyr	Ser	Pro	Leu	Arg	Ile	Lys	His	Arg	Thr	Gly	Asp		
		275					280					285					
Glu	Ile	Thr	Tyr	Gln	Cys	Arg	Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ala	Thr	Arg	Gly		
	290					295					300						
Asn	Thr	Ala	Lys	Cys	Thr	Ser	Thr	Gly	Trp	Ile	Pro	Ala	Pro	Arg	Cys		
305					310					315					320		
Thr	Leu	Lys	Pro	Cys	Asp	Tyr	Pro	Asp	Ile	Lys	His	Gly	Gly	Leu	Tyr		
				325					330					335			
His	Glu	Asn	Met	Arg	Arg	Pro	Tyr	Phe	Pro	Val	Ala	Val	Gly	Lys	Tyr		
			340					345					350				
Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Asp	Glu	His	Phe	Glu	Thr	Pro	Ser	Gly	Ser	Tyr		
		355					360					365					
Trp	Asp	His	Ile	His	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Trp	Ser	Pro	Ala	Val	Pro		
	370					375					380						
Cys	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Tyr	Asn	Gln		
385					390					395					400		
Asn	Tyr	Gly	Arg	Lys	Phe	Val	Gln	Gly	Lys	Ser	Ile	Asp	Val	Ala	Cys		
				405					410					415			
His	Pro	Gly	Tyr	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Thr	Thr	Val	Thr	Cys	Met		
			420					425					430				
Glu	Asn	Gly	Trp	Ser	Pro	Thr	Pro	Arg	Cys	Ile	Arg	Val	Lys	Thr	Cys		

ES 2 602 620 A1

435					440					445					
Ser	Lys	Ser	Ser	Ile	Asp	Ile	Glu	Asn	Gly	Phe	Ile	Ser	Glu	Ser	Gln
	450					455					460				
Tyr	Thr	Tyr	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Gln	Cys	Lys	Leu	Gly
465					470					475					480
Tyr	Val	Thr	Ala	Asp	Gly	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Ile	Thr	Cys	Gly	Lys
				485					490					495	
Asp	Gly	Trp	Ser	Ala	Gln	Pro	Thr	Cys	Ile	Lys	Ser	Cys	Asp	Ile	Pro
			500					505					510		
Val	Phe	Met	Asn	Ala	Arg	Thr	Lys	Asn	Asp	Phe	Thr	Trp	Phe	Lys	Leu
		515					520					525			
Asn	Asp	Thr	Leu	Asp	Tyr	Glu	Cys	His	Asp	Gly	Tyr	Glu	Ser	Asn	Thr
	530					535					540				
Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Tyr	Asn	Gly	Trp	Ser	Asp
545					550					555					560
Leu	Pro	Ile	Cys	Tyr	Glu	Arg	Glu	Cys	Glu	Leu	Pro	Lys	Ile	Asp	Val
				565					570					575	
His	Leu	Val	Pro	Asp	Arg	Lys	Lys	Asp	Gln	Tyr	Lys	Val	Gly	Glu	Val
			580					585					590		
Leu	Lys	Phe	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	Phe	Thr	Ile	Val	Gly	Pro	Asn	Ser
		595					600					605			
Val	Gln	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Pro	Ile	Cys	Lys
	610					615					620				
Glu	Gln	Val	Gln	Ser	Cys	Gly	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Asn
625					630					635					640
Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Gly	His	Ser	Glu	Val	Val	Glu
				645					650					655	
Tyr	Tyr	Cys	Asn	Pro	Arg	Phe	Leu	Met	Lys	Gly	Pro	Asn	Lys	Ile	Gln
			660					665					670		
Cys	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Thr	Leu	Pro	Val	Cys	Ile	Val	Glu	Glu
		675					680					685			
Ser	Thr	Cys	Gly	Asp	Ile	Pro	Glu	Leu	Glu	His	Gly	Trp	Ala	Gln	Leu
	690					695					700				
Ser	Ser	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Glu	Phe	Asn	Cys	Ser

ES 2 602 620 A1

705					710					715				720
Glu	Ser	Phe	Thr	Met	Ile	Gly	His	Arg	Ser	Ile	Thr	Cys	Ile	His
				725					730					735
Val	Trp	Thr	Gln	Leu	Pro	Gln	Cys	Val	Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Lys
			740					745					750	
Cys	Lys	Ser	Ser	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Glu	Glu	His	Leu	Lys	Asn
		755					760					765		
Lys	Glu	Phe	Asp	His	Asn	Ser	Asn	Ile	Arg	Tyr	Arg	Cys	Arg	Gly
	770					775					780			
Glu	Gly	Trp	Ile	His	Thr	Val	Cys	Ile	Asn	Gly	Arg	Trp	Asp	Pro
785					790					795				Glu
														800
Val	Asn	Cys	Ser	Met	Ala	Gln	Ile	Gln	Leu	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro
				805					810					815
Ile	Pro	Asn	Ser	His	Asn	Met	Thr	Thr	Thr	Leu	Asn	Tyr	Arg	Asp
			820					825					830	Gly
Glu	Lys	Val	Ser	Val	Leu	Cys	Gln	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gln	Glu
		835					840					845		Gly
Glu	Glu	Ile	Thr	Cys	Lys	Asp	Gly	Arg	Trp	Gln	Ser	Ile	Pro	Leu
	850					855					860			Cys
Val	Glu	Lys	Ile	Pro	Cys	Ser	Gln	Pro	Pro	Gln	Ile	Glu	His	Gly
865					870					875				Thr
														880
Ile	Asn	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Glu	Ser	Tyr	Ala	His	Gly	Thr
				885					890					895
Leu	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Gly	Gly	Phe	Arg	Ile	Ser	Glu	Glu	Asn
			900					905					910	Glu
Thr	Thr	Cys	Tyr	Met	Gly	Lys	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Gln	Cys	Glu
		915					920					925		Gly
Leu	Pro	Cys	Lys	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile	Ser	His	Gly	Val	Val	Ala
	930					935					940			His
Met	Ser	Asp	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Glu	Glu	Val	Thr	Tyr	Lys	Cys
945					950					955				Phe
														960
Glu	Gly	Phe	Gly	Ile	Asp	Gly	Pro	Ala	Ile	Ala	Lys	Cys	Leu	Gly
				965					970					975
														Glu
Lys	Trp	Ser	His	Pro	Pro	Ser	Cys	Ile	Lys	Thr	Asp	Cys	Leu	Ser
														Leu

ES 2 602 620 A1

980						985						990					
Pro	Ser	Phe	Glu	Asn	Ala	Ile	Pro	Met	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr		
		995					1000					1005					
Lys	Ala	Gly	Glu	Gln	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Lys			
	1010					1015					1020						
Met	Asp	Gly	Ala	Ser	Asn	Val	Thr	Cys	Ile	Asn	Ser	Arg	Trp	Thr			
	1025					1030					1035						
Gly	Arg	Pro	Thr	Cys	Arg	Asp	Thr	Ser	Cys	Val	Asn	Pro	Pro	Thr			
	1040					1045					1050						
Val	Gln	Asn	Ala	Tyr	Ile	Val	Ser	Arg	Gln	Met	Ser	Lys	Tyr	Pro			
	1055					1060					1065						
Ser	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Tyr	Gln	Cys	Arg	Ser	Pro	Tyr	Glu	Met			
	1070					1075					1080						
Phe	Gly	Asp	Glu	Glu	Val	Met	Cys	Leu	Asn	Gly	Asn	Trp	Thr	Glu			
	1085					1090					1095						
Pro	Pro	Gln	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Gly	Lys	Cys	Gly	Pro	Pro	Pro			
	1100					1105					1110						
Pro	Ile	Asp	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Ser	Phe	Pro	Leu	Ser	Val	Tyr			
	1115					1120					1125						
Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Gln	Cys	Gln	Asn	Leu	Tyr	Gln			
	1130					1135					1140						
Leu	Glu	Gly	Asn	Lys	Arg	Ile	Thr	Cys	Arg	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser			
	1145					1150					1155						
Glu	Pro	Pro	Lys	Cys	Leu	His	Pro	Cys	Val	Ile	Ser	Arg	Glu	Ile			
	1160					1165					1170						
Met	Glu	Asn	Tyr	Asn	Ile	Ala	Leu	Arg	Trp	Thr	Ala	Lys	Gln	Lys			
	1175					1180					1185						
Leu	Tyr	Ser	Arg	Thr	Gly	Glu	Ser	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Arg			
	1190					1195					1200						
Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	His	Thr	Leu	Arg	Thr	Thr	Cys			
	1205					1210					1215						
Trp	Asp	Gly	Lys	Leu	Glu	Tyr	Pro	Thr	Cys	Ala	Lys	Arg					
	1220					1225					1230						

<210> 15

ES 2 602 620 A1

<211> 1663
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Thr His
1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn
20 25 30

Ile Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp
35 40 45

Ala Gln Gly Asp Val Pro Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly
50 55 60

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

Asn His Met Gly Asn Val Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe
85 90 95

Lys Ser Glu Lys Gly Arg Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
100 105 110

Gly Thr Gln Val Val Glu Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly
115 120 125

Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr
130 135 140

Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly
145 150 155 160

Arg Thr Val Met Val Asn Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys
165 170 175

Gln Asp Ser Leu Ser Ser Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser
180 185 190

Trp Asp Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala
195 200 205

Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val
210 215 220

Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu
225 230 235 240

Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr
245 250 255

ES 2 602 620 A1

Ala Arg Phe Leu Tyr Gly Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile
 260 265 270
 Phe Gly Ile Gln Asp Gly Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu
 275 280 285
 Lys Arg Ile Pro Ile Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg
 290 295 300
 Lys Val Leu Leu Asp Gly Val Gln Asn Pro Arg Ala Glu Asp Leu Val
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser
 325 330 335
 Asp Met Val Gln Ala Glu Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met
 355 360 365
 Pro Phe Asp Leu Met Val Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala
 370 375 380
 Tyr Arg Val Pro Val Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu
 385 390 395 400
 Thr Gln Gly Asp Gly Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser
 405 410 415
 Gln Lys Pro Leu Ser Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser
 420 425 430
 Glu Ala Glu Gln Ala Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr
 435 440 445
 Val Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu
 450 455 460
 Leu Arg Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Arg Ala His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn
 485 490 495
 Lys Gly Arg Leu Leu Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln
 500 505 510
 Asp Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser
 515 520 525

ES 2 602 620 A1

Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg
 530 535 540
 Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val
 545 550 555 560
 Gly Ser Leu Val Val Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val
 565 570 575
 Pro Gly Gln Gln Met Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg
 580 585 590
 Val Val Leu Val Ala Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys
 595 600 605
 Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp
 610 615 620
 Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser
 625 630 635 640
 Asp Ala Gly Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln
 645 650 655
 Arg Ala Glu Leu Gln Cys Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser
 660 665 670
 Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys
 675 680 685
 Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg
 690 695 700
 Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys
 705 710 715 720
 Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg
 725 730 735
 Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp
 740 745 750
 Glu Asp Ile Ile Ala Glu Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro
 755 760 765
 Glu Ser Trp Leu Trp Asn Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn
 770 775 780
 Gly Ile Ser Thr Lys Leu Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr
 785 790 795 800

ES 2 602 620 A1

Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys
 805 810 815
 Val Ala Asp Pro Phe Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp
 820 825 830
 Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg
 835 840 845
 Ala Val Leu Tyr Asn Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val
 850 855 860
 Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg
 865 870 875 880
 Arg His Gln Gln Thr Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val
 885 890 895
 Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val
 900 905 910
 Lys Ala Ala Val Tyr His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser
 915 920 925
 Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val
 930 935 940
 Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu
 945 950 955 960
 Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser
 965 970 975
 Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu
 980 985 990
 Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser
 995 1000 1005
 Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile
 1010 1015 1020
 Ala Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly
 1025 1030 1035
 Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr
 1040 1045 1050
 Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala
 1055 1060 1065

ES 2 602 620 A1

Phe	Val 1070	Lys	Arg	Ala	Pro	Ser 1075	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala 1080	Tyr	Val	Val
Lys	Val 1085	Phe	Ser	Leu	Ala	Val 1090	Asn	Leu	Ile	Ala	Ile 1095	Asp	Ser	Gln
Val	Leu 1100	Cys	Gly	Ala	Val	Lys 1105	Trp	Leu	Ile	Leu	Glu 1110	Lys	Gln	Lys
Pro	Asp 1115	Gly	Val	Phe	Gln	Glu 1120	Asp	Ala	Pro	Val	Ile 1125	His	Gln	Glu
Met	Ile 1130	Gly	Gly	Leu	Arg	Asn 1135	Asn	Asn	Glu	Lys	Asp 1140	Met	Ala	Leu
Thr	Ala 1145	Phe	Val	Leu	Ile	Ser 1150	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys 1155	Asp	Ile	Cys
Glu	Glu 1160	Gln	Val	Asn	Ser	Leu 1165	Pro	Gly	Ser	Ile	Thr 1170	Lys	Ala	Gly
Asp	Phe 1175	Leu	Glu	Ala	Asn	Tyr 1180	Met	Asn	Leu	Gln	Arg 1185	Ser	Tyr	Thr
Val	Ala 1190	Ile	Ala	Gly	Tyr	Ala 1195	Leu	Ala	Gln	Met	Gly 1200	Arg	Leu	Lys
Gly	Pro 1205	Leu	Leu	Asn	Lys	Phe 1210	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys 1215	Asp	Lys	Asn
Arg	Trp 1220	Glu	Asp	Pro	Gly	Lys 1225	Gln	Leu	Tyr	Asn	Val 1230	Glu	Ala	Thr
Ser	Tyr 1235	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu 1240	Leu	Gln	Leu	Lys	Asp 1245	Phe	Asp	Phe
Val	Pro 1250	Pro	Val	Val	Arg	Trp 1255	Leu	Asn	Glu	Gln	Arg 1260	Tyr	Tyr	Gly
Gly	Gly 1265	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln 1270	Ala	Thr	Phe	Met	Val 1275	Phe	Gln	Ala
Leu	Ala 1280	Gln	Tyr	Gln	Lys	Asp 1285	Ala	Pro	Asp	His	Gln 1290	Glu	Leu	Asn
Leu	Asp 1295	Val	Ser	Leu	Gln	Leu 1300	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser 1305	Lys	Ile	Thr
His	Arg 1310	Ile	His	Trp	Glu	Ser 1315	Ala	Ser	Leu	Leu	Arg 1320	Ser	Glu	Glu

ES 2 602 620 A1

Thr	Lys 1325	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe 1330	Thr	Val	Thr	Ala	Glu 1335	Gly	Lys	Gly
Gln	Gly 1340	Thr	Leu	Ser	Val	Val 1345	Thr	Met	Tyr	His	Ala 1350	Lys	Ala	Lys
Asp	Gln 1355	Leu	Thr	Cys	Asn	Lys 1360	Phe	Asp	Leu	Lys	Val 1365	Thr	Ile	Lys
Pro	Ala 1370	Pro	Glu	Thr	Glu	Lys 1375	Arg	Pro	Gln	Asp	Ala 1380	Lys	Asn	Thr
Met	Ile 1385	Leu	Glu	Ile	Cys	Thr 1390	Arg	Tyr	Arg	Gly	Asp 1395	Gln	Asp	Ala
Thr	Met 1400	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile 1405	Ser	Met	Met	Thr	Gly 1410	Phe	Ala	Pro
Asp	Thr 1415	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln 1420	Leu	Ala	Asn	Gly	Val 1425	Asp	Arg	Tyr
Ile	Ser 1430	Lys	Tyr	Glu	Leu	Asp 1435	Lys	Ala	Phe	Ser	Asp 1440	Arg	Asn	Thr
Leu	Ile 1445	Ile	Tyr	Leu	Asp	Lys 1450	Val	Ser	His	Ser	Glu 1455	Asp	Asp	Cys
Leu	Ala 1460	Phe	Lys	Val	His	Gln 1465	Tyr	Phe	Asn	Val	Glu 1470	Leu	Ile	Gln
Pro	Gly 1475	Ala	Val	Lys	Val	Tyr 1480	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Leu 1485	Glu	Glu	Ser
Cys	Thr 1490	Arg	Phe	Tyr	His	Pro 1495	Glu	Lys	Glu	Asp	Gly 1500	Lys	Leu	Asn
Lys	Leu 1505	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu 1510	Cys	Arg	Cys	Ala	Glu 1515	Glu	Asn	Cys
Phe	Ile 1520	Gln	Lys	Ser	Asp	Asp 1525	Lys	Val	Thr	Leu	Glu 1530	Glu	Arg	Leu
Asp	Lys 1535	Ala	Cys	Glu	Pro	Gly 1540	Val	Asp	Tyr	Val	Tyr 1545	Lys	Thr	Arg
Leu	Val 1550	Lys	Val	Gln	Leu	Ser 1555	Asn	Asp	Phe	Asp	Glu 1560	Tyr	Ile	Met
Ala	Ile 1565	Glu	Gln	Thr	Ile	Lys 1570	Ser	Gly	Ser	Asp	Glu 1575	Val	Gln	Val

ES 2 602 620 A1

Gly Gln Gln Arg Thr Phe Ile Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala
1580 1585 1590

Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser
1595 1600 1605

Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly
1610 1615 1620

Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Glu Asp Glu Cys Gln
1625 1630 1635

Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp Leu Gly Ala Phe Thr
1640 1645 1650

Glu Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn
1655 1660

<210> 16
<211> 705
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Gly Ser Ile Pro Ile Pro Gln Lys Leu Phe Gly Glu Val Thr Ser Pro
20 25 30

Leu Phe Pro Lys Pro Tyr Pro Asn Asn Phe Glu Thr Thr Thr Val Ile
35 40 45

Thr Val Pro Thr Gly Tyr Arg Val Lys Leu Val Phe Gln Gln Phe Asp
50 55 60

Leu Glu Pro Ser Glu Gly Cys Phe Tyr Asp Tyr Val Lys Ile Ser Ala
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Cys Gly Gln Leu Gly Ser Pro Leu
85 90 95

Gly Asn Pro Pro Gly Lys Lys Glu Phe Met Ser Gln Gly Asn Lys Met
100 105 110

Leu Leu Thr Phe His Thr Asp Phe Ser Asn Glu Glu Asn Gly Thr Ile
115 120 125

Met Phe Tyr Lys Gly Phe Leu Ala Tyr Tyr Gln Ala Val Asp Leu Asp
130 135 140

ES 2 602 620 A1

Glu Cys Ala Ser Arg Ser Lys Ser Gly Glu Glu Asp Pro Gln Pro Gln
 145 150 155 160
 Cys Gln His Leu Cys His Asn Tyr Val Gly Gly Tyr Phe Cys Ser Cys
 165 170 175
 Arg Pro Gly Tyr Glu Leu Gln Glu Asp Thr His Ser Cys Gln Ala Glu
 180 185 190
 Cys Ser Ser Glu Leu Tyr Thr Glu Ala Ser Gly Tyr Ile Ser Ser Leu
 195 200 205
 Glu Tyr Pro Arg Ser Tyr Pro Pro Asp Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ile
 210 215 220
 Arg Val Glu Arg Gly Leu Thr Leu His Leu Lys Phe Leu Glu Pro Phe
 225 230 235 240
 Asp Ile Asp Asp His Gln Gln Val His Cys Pro Tyr Asp Gln Leu Gln
 245 250 255
 Ile Tyr Ala Asn Gly Lys Asn Ile Gly Glu Phe Cys Gly Lys Gln Arg
 260 265 270
 Pro Pro Asp Leu Asp Thr Ser Ser Asn Ala Val Asp Leu Leu Phe Phe
 275 280 285
 Thr Asp Glu Ser Gly Asp Ser Arg Gly Trp Lys Leu Arg Tyr Thr Thr
 290 295 300
 Glu Ile Ile Lys Cys Pro Gln Pro Lys Thr Leu Asp Glu Phe Thr Ile
 305 310 315 320
 Ile Gln Asn Leu Gln Pro Gln Tyr Gln Phe Arg Asp Tyr Phe Ile Ala
 325 330 335
 Thr Cys Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Ile Glu Gly Asn Gln Val Leu His
 340 345 350
 Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Asp Asp Gly Thr Trp His Arg Ala Met
 355 360 365
 Pro Arg Cys Lys Ile Lys Asp Cys Gly Gln Pro Arg Asn Leu Pro Asn
 370 375 380
 Gly Asp Phe Arg Tyr Thr Thr Thr Met Gly Val Asn Thr Tyr Lys Ala
 385 390 395 400
 Arg Ile Gln Tyr Tyr Cys His Glu Pro Tyr Tyr Lys Met Gln Thr Arg
 405 410 415

ES 2 602 620 A1

Ala Gly Ser Arg Glu Ser Glu Gln Gly Val Tyr Thr Cys Thr Ala Gln
 420 425 430
 Gly Ile Trp Lys Asn Glu Gln Lys Gly Glu Lys Ile Pro Arg Cys Leu
 435 440 445
 Pro Val Cys Gly Lys Pro Val Asn Pro Val Glu Gln Arg Gln Arg Ile
 450 455 460
 Ile Gly Gly Gln Lys Ala Lys Met Gly Asn Phe Pro Trp Gln Val Phe
 465 470 475 480
 Thr Asn Ile His Gly Arg Gly Gly Gly Ala Leu Leu Gly Asp Arg Trp
 485 490 495
 Ile Leu Thr Ala Ala His Thr Leu Tyr Pro Lys Glu His Glu Ala Gln
 500 505 510
 Ser Asn Ala Ser Leu Asp Val Phe Leu Gly His Thr Asn Val Glu Glu
 515 520 525
 Leu Met Lys Leu Gly Asn His Pro Ile Arg Arg Val Ser Val His Pro
 530 535 540
 Asp Tyr Arg Gln Asp Glu Ser Tyr Asn Phe Glu Gly Asp Ile Ala Leu
 545 550 555 560
 Leu Glu Leu Glu Asn Ser Val Thr Leu Gly Pro Asn Leu Leu Pro Ile
 565 570 575
 Cys Leu Pro Asp Asn Asp Thr Phe Tyr Asp Leu Gly Leu Met Gly Tyr
 580 585 590
 Val Ser Gly Phe Gly Val Met Glu Glu Lys Ile Ala His Asp Leu Arg
 595 600 605
 Phe Val Arg Leu Pro Val Ala Asn Pro Gln Ala Cys Glu Asn Trp Leu
 610 615 620
 Arg Gly Lys Asn Arg Met Asp Val Phe Ser Gln Asn Met Phe Cys Ala
 625 630 635 640
 Gly His Pro Ser Leu Lys Gln Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
 645 650 655
 Val Phe Ala Val Arg Asp Pro Asn Thr Asp Arg Trp Val Ala Thr Gly
 660 665 670
 Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ser Arg Gly Tyr Gly Phe Tyr Thr
 675 680 685

ES 2 602 620 A1

Lys Val Leu Asn Tyr Val Asp Trp Ile Lys Lys Glu Met Glu Glu Glu
690 695 700

Asp
705

<210> 17
<211> 313
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17

Met Glu Leu Asp Arg Ala Val Gly Val Leu Gly Ala Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Phe Leu Gly Met Ala Trp Ala Leu Gln Ala Ala Asp Thr Cys
20 25 30

Pro Glu Val Lys Met Val Gly Leu Glu Gly Ser Asp Lys Leu Thr Ile
35 40 45

Leu Arg Gly Cys Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
50 55 60

Ala Gly Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro
65 70 75 80

Gly Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Ala Pro Gly Glu Pro Gln
85 90 95

Pro Cys Leu Thr Gly Pro Arg Thr Cys Lys Asp Leu Leu Asp Arg Gly
100 105 110

His Phe Leu Ser Gly Trp His Thr Ile Tyr Leu Pro Asp Cys Arg Pro
115 120 125

Leu Thr Val Leu Cys Asp Met Asp Thr Asp Gly Gly Gly Trp Thr Val
130 135 140

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

Thr Tyr Lys Gln Gly Phe Gly Ser Arg Leu Gly Glu Phe Trp Leu Gly
165 170 175

Asn Asp Asn Ile His Ala Leu Thr Ala Gln Gly Thr Ser Glu Leu Arg
180 185 190

Val Asp Leu Val Asp Phe Glu Asp Asn Tyr Gln Phe Ala Lys Tyr Arg
195 200 205

ES 2 602 620 A1

Ser Phe Lys Val Ala Asp Glu Ala Glu Lys Tyr Asn Leu Val Leu Gly
210 215 220

Ala Phe Val Glu Gly Ser Ala Gly Asp Ser Leu Thr Phe His Asn Asn
225 230 235 240

Gln Ser Phe Ser Thr Lys Asp Gln Asp Asn Asp Leu Asn Thr Gly Asn
245 250 255

Cys Ala Val Met Phe Gln Gly Ala Trp Trp Tyr Lys Asn Cys His Val
260 265 270

Ser Asn Leu Asn Gly Arg Tyr Leu Arg Gly Thr His Gly Ser Phe Ala
275 280 285

Asn Gly Ile Asn Trp Lys Ser Gly Lys Gly Tyr Asn Tyr Ser Tyr Lys
290 295 300

Val Ser Glu Met Lys Val Arg Pro Ala
305 310

<210> 18
<211> 699
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys

ES 2 602 620 A1

130					135					140					
Glu 145	Arg	Glu	Asp	Glu	Glu 150	Leu	Ser	Cys	Asp	His 155	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr 160
Ile	Gly	Gly	Tyr	Tyr 165	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe 170	Gly	Tyr	Ile	Leu	His 175	Thr
Asp	Asn	Arg	Thr 180	Cys	Arg	Val	Glu	Cys 185	Ser	Asp	Asn	Leu	Phe 190	Thr	Gln
Arg	Thr	Gly 195	Val	Ile	Thr	Ser	Pro 200	Asp	Phe	Pro	Asn	Pro 205	Tyr	Pro	Lys
Ser	Ser 210	Glu	Cys	Leu	Tyr	Thr 215	Ile	Glu	Leu	Glu	Glu 220	Gly	Phe	Met	Val
Asn 225	Leu	Gln	Phe	Glu	Asp 230	Ile	Phe	Asp	Ile	Glu 235	Asp	His	Pro	Glu	Val 240
Pro	Cys	Pro	Tyr	Asp 245	Tyr	Ile	Lys	Ile	Lys 250	Val	Gly	Pro	Lys	Val 255	Leu
Gly	Pro	Phe	Cys 260	Gly	Glu	Lys	Ala	Pro 265	Glu	Pro	Ile	Ser	Thr 270	Gln	Ser
His	Ser	Val 275	Leu	Ile	Leu	Phe	His 280	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly 285	Glu	Asn	Arg
Gly	Trp 290	Arg	Leu	Ser	Tyr	Arg 295	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu 300	Cys	Pro	Glu	Leu
Gln 305	Pro	Pro	Val	His	Gly 310	Lys	Ile	Glu	Pro	Ser 315	Gln	Ala	Lys	Tyr	Phe 320
Phe	Lys	Asp	Gln	Val 325	Leu	Val	Ser	Cys	Asp 330	Thr	Gly	Tyr	Lys	Val 335	Leu
Lys	Asp	Asn	Val 340	Glu	Met	Asp	Thr	Phe 345	Gln	Ile	Glu	Cys	Leu 350	Lys	Asp
Gly	Thr	Trp 355	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro 360	Thr	Cys	Lys	Ile	Val 365	Asp	Cys	Arg
Ala	Pro 370	Gly	Glu	Leu	Glu	His 375	Gly	Leu	Ile	Thr	Phe 380	Ser	Thr	Arg	Asn
Asn 385	Leu	Thr	Thr	Tyr	Lys 390	Ser	Glu	Ile	Lys	Tyr 395	Ser	Cys	Gln	Glu	Pro 400
Tyr	Tyr	Lys	Met	Leu	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Cys	Ser	Ala

ES 2 602 620 A1

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

ES 2 602 620 A1

675

680

685

Asp Trp Ile Gln Arg Val Thr Gly Val Arg Asn
690 695



- ②① N.º solicitud: 201631682
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2011135606 A1 (WICK GEORG <i>et al.</i>) 09/06/2011, párrafos [0001], [0002], [0024], [0026], [0051], [0117], [0118] y [0131], ejemplo 1 y reivindicaciones 1 y 2.	1-30
A	US 2005170445 A1 (REICHERT WILLIAM M <i>et al.</i>) 04/08/2005, Párrafos [0091], [0092] y reivindicación 1.	1-30
A	US 2004241690 A1 (SOUKA TAKAYUKI <i>et al.</i>) 02/12/2004, Párrafos [0001], [0009], reivindicación 1 y resumen.	1-30
A	ES 2536310T T3 (FUNDACIÓ HOSPITAL UNI VALL D HEBRON INST DE RECERCA) 22/05/2015, Página 4, líneas 44-48 y 56.	1-30
A	MULLER R <i>et al.</i> Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. <i>Analytical Biochemistry</i> , 20061215 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 15/12/2006 VOL: 359 No: 2 Páginas: 194 - 202 ISSN 0003-2697 Doi: doi:10.1016/j.ab.2006.09.032. Páginas 195-198.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.02.2017

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/68 (2006.01)**G01N33/53** (2006.01)**C07K14/47** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-30	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-30	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2011135606 A1 (WICK GEORG <i>et al.</i>)	09.06.2011
D02	US 2005170445 A1 (REICHERT WILLIAM M <i>et al.</i>)	04.08.2005
D03	US 2004241690 A1 (SOUKA TAKAYUKI <i>et al.</i>)	02.12.2004
D04	ES 2536310T T3 (FUNDACIÓ HOSPITAL UNI VALL D HEBRON INST DE RECERCA)	22.05.2015
D05	MULLER R <i>et al.</i> Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. <i>Analytical Biochemistry</i> , 2006 1215 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 15/12/2006 VOL: 359 No: 2 Paginas: 194 - 202 ISSN 0003-2697 Doi: doi:10.1016/j.ab.2006.09.032.	15.12.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 se refiere a un método y un kit (véase párrafo [0026]) para identificar y analizar los polipéptidos que se adhieren a la silicona y para detectar la reacción de respuesta de un mamífero a la misma (véase párrafo [0001]). La silicona es biomaterial inorgánico ampliamente utilizado en implantes (véase párrafo [0002]). El método comprende obtener una muestra de un mamífero, poner en contacto dicha muestra con una silicona, aislar los polipéptidos que se han adheridos a la silicona e identificar dichos polipéptidos (véase párrafo [0024] y reivindicaciones 1 y 2). La muestra puede ser, una película proteica que cubre la silicona, orina, fluido pleural o peritoneal, líquido cefalorraquídeo o fluido de una herida o suero (véase párrafo [0051]). Los polipéptidos adheridos a la silicona se detectan junto con al menos una proteína adicional adherida a la misma y/o un polipéptido seleccionado de kininogeno, complemento C3, complemento C1s (C1S), proteína C reactiva (CRP), vitronectina (VTN), etc (véase párrafo [0117], [0118] y [0131]). Se llevó a cabo la construcción de un sistema *in vitro* para la detección de proteínas adheridas a varios tipos de silicona *in vivo* (véase ejemplo 1).

El documento D02 hace referencia a un método para estudiar la compatibilidad de un material implantado en un organismo. Para ello, se determinan y se identifican perfiles de expresión de proteínas, concretamente de citoquinas y de factores de crecimiento, asociados a la respuesta del organismo a dichos implantes. La muestra biológica utilizada puede ser un fluido del espacio intersticial entre el biomaterial implantado y el tejido del organismo, el sobrenadante de un cultivo celular al cual se ha expuesto el biomaterial y una herida (véase párrafo [0091]). El método comprende poner en contacto la muestra biológica con un microarray para la detección de citoquinas y factores de crecimiento asociados con la respuesta de dicho microorganismo al material implantado (el microarray comprende una pluralidad de muestras de anticuerpos de captura sobre un sustrato sólido, específicos para citoquinas y factores de crecimiento), detectar la unión al microarray de al menos una citoquina o un factor de crecimiento y establecer un perfil de respuesta del organismo al material implantado basado en las uniones (véase reivindicación 1). Se describe también un kit para llevar a cabo dicho método (véase párrafo [0092]).

El documento D03 tiene por objeto proporcionar un nuevo marcador de biocompatibilidad con el que se pueda detectar la activación de las células puestas en contacto con la superficie de un material (véase párrafo [0009]). Sirve para evaluar la biocompatibilidad de un dispositivo médico (principalmente un material que esté en contacto con la sangre) (véase resumen y párrafo [0001]). De esta manera, se ponen en contacto una superficie del material y una solución acuosa de leucocitos *in vitro*, se extrae una fracción de ARN del interior de los leucocitos, se prepara ADNc, se cuantifica el nivel de expresión de un gen específico y se compara dicho nivel con el nivel de expresión del gen específico de leucocitos que no se han puesto en contacto con la superficie de dicho material (véase reivindicación 1).

El documento D04 divulga un método *in vitro* para el análisis de la predisposición genética de un individuo a desarrollar efectos adversos relacionados con biomateriales no metálicos implantados en el cuerpo, que comprende determinar en una muestra biológica de dicho individuo la presencia del antígeno HLA-B*08 del complejo mayor de histocompatibilidad; y donde la presencia de al menos dicho antígeno es un indicativo de predisposición genética a desarrollar dichos efectos adversos (véase página 4, líneas 44-48). Se proporciona también un Kit para llevar a cabo dicho método (véase página 4, línea 56).

El documento D05 describe un método para desarrollar un sistema de ensayo para investigar la adsorción de proteínas característica de diferentes materiales (véase página 195, columna izquierda, segundo párrafo). Para lo cual, se emplea un método basado en grupos amino-marcados, acoplado a una reacción de quimioluminiscencia para la determinación directa de proteínas absorbidas sobre la superficie de los materiales analizados. Se evalúa la adsorción de albúmina y fibronectina a partir de muestras de suero y saliva humanas (véase páginas 195-198).

Por lo tanto, la presente solicitud de patente, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica y tal y como ha sido presentada, parece tener novedad y actividad inventiva por no estar incluida en el estado de la técnica analizado, ni poder deducirse de éste de un modo evidente por un experto en la materia. Se han encontrado documentos que describen métodos para predecir la compatibilidad de un biomaterial implantado en un organismo utilizando muestras biológicas que detectan las proteínas adheridas al mismo. Pero no se ha encontrado ningún documento que haga referencia a un método *in vitro* para predecir y/o pronosticar la compatibilidad de un biomaterial en una muestra biológica aislada obtenida de un sujeto que comprenda incubar el biomaterial con dicha muestra, determinar y cuantificar la presencia conjunta de los marcadores CRP, SAMP, C1QC, C1QB, C07, C1S, VTN, LAC2 y KV402 adheridos al biomaterial y comparar el valor obtenido con un valor de referencia. Se ha encontrado el documento D01, citado en el Informe sobre el Estado de la Técnica con la categoría A para las reivindicaciones 1-30 y considerado el antecedente tecnológico más próximo al objeto en ellas definido, el cual hace referencia a un método y un kit para identificar y analizar los polipéptidos que se adhieren a la silicona y detectar la reacción de respuesta de un mamífero a la misma. Los polipéptidos adheridos a la silicona se detectan junto con al menos una proteína adicional adherida a la misma y/o un polipéptido seleccionado de kininogeno, complemento C3, complemento C1s (C1S), proteína C reactiva (CRP), vitronectina (VTN); por lo que no se analiza la presencia conjunta de CRP, SAMP, C1QC, C1QB, C07, C1S, VTN, LAC2 y KV402, característica que es esencial en la invención para llevar a cabo dicho método. Además, tampoco en los documentos citados, existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-30. Por lo que las reivindicaciones 1-30 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.