(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

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

(21) Número de solicitud: 201631682

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

23.12.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.02.2017

Fecha de concesión:

11.12.2017

(45) Fecha de publicación de la concesión:

18.12.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT JAUME I (40.0%)
Avda. de Vicent Sos Baynat, S/N
12006 Castellón de la Plana (Castellón) ES;
UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA (40.0%) y
ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN COOPERATIVA EN BIOCIENCIAS - 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, stens, 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.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 602 620 B1

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

DESCRIPCIÓN

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.

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.

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 cardiacas, implantes dérmicos…). De la

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.

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 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 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 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.

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 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 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 INVENCIÓN

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 i*n 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 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 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.

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 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 establece un perfil diferencial entre biomateriales compatibles y no compatibles.

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o 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 secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

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 lardo 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.

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 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 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 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) 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 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.

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.

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.

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.

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

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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Micrografías 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 µm.

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.

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

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 (µg/µl) 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 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 delimitada por las líneas de trazos. Abreviaturas: MAT = material; FCT= tejido conectivo fibroso; NB = nuevo hueso/osteoide. 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 ($p \leq 0.05$ ANOVA con un post-test de Kruskal-Wallis).

EJEMPLOS

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

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 (S*andblasted 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 alcoxisilanos 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 80ºC para los recubrimientos 70M30T y 35M35G30T, y a una temperatura de 140 ºC 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 µL/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*

Cultivos celulares

Las células MC3T3-E1 (osteosarcoma ratón) se cultivaron en discos de titanio con recubrimiento sol-gel, a una concentración de $1x10^4$ 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% CO_2, 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 $MgCl_2$ pH 10,5) se añadieron a 100 µl del sobrenadante resultante del

lisado. Tras 2 h de incubación en la oscuridad (37ºC, 5% CO_2), 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. 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

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 ºC, 5 % CO2), tras haber añadido 2 mL de suero humano (suero de varón, serotipo AB, Sigma-Aldrich). 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 eliminaros de los discos los marcadores que no 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 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 (cuatriplicados). 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

Las muestras eluídas 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 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 acido fórmico y analizados en un sistema de cromatografía líquida a escala nano acoplada on-line a espectrometría de masas en tándem (LC-MS). La 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 µm, 180 µm × 20 mm, Waters) conectada a una columna analítica a BEH130 C18 column (1.7 µm, 75 µm × 200 mm, Waters). La columna fue equilibrada en 3% acetonitrilo en ácido 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 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.

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 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 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 eluídas en cada uno de los 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 libidum.* 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 radiculares 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 mm^2, 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 combatibles y no mostrarían respuesta inflamatoria, ni inmune.

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 (mm^2) 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.

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.

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.

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).

Para el tratamiento de datos obtenidos mediante LC-MS/MS se utilizó el software Progenesis QI, 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.

La comparación entre los materiales70M30T 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).

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.

			Presencia Normalizada		**70M30T vs 35M35G30T**		
Proteína	**UniProtKB**	**C.S.**	**Media 70M30T**	**Media 35M35G30T**	**Anova (p)**	**Ratio 35M35G30T /70M30T**	**DAVID**
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

			Presencia Normalizada		70M30T vs 35M35G30T		
Proteína	**UniProtKB**	**C.S.**	**Media 70M30T**	**Media 35M35G30T**	**Anova (p)**	**Ratio 35M35G30T /70M30T**	**DAVID**
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.

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.

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.

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.

			Presencia Normalizada		**70M30T vs 35M35G30T**		
Proteína	**UniProtKB**	**C.S.**	**Media 50M50G**	**Media 50V50G**	**Anova (p)**	**Ratio 50V50G/50M50G**	**DAVID**
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

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.

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.

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).

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		
Proteína	UniProt	C.S	Media 70M30T	Media 35M35G	Media 50M50G	Anova (p)	Ratio 50M50G/70 M30T	Anova (p)	Ratio 50M50G/ 35M35G30T	DAVID
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).

			Abundancia normalizada			70M30T vs 50V50G		35M35G30T vs 50V50G		
Proteína	UniProtKB	C. S.	Media 70M30T	Media 35M35G30T	Media 50V50G	Anova (p)	Ratio 50V50G/ 70M30T	Anova (p)	Ratio 50V50G/ 35M35G30T	DAVID
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	P09871	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.

ES 2 602 620 B1

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*.

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 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.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el sujeto es un humano.

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.

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.

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.

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.

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,

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.

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.

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. Uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, donde el sujeto es un humano.

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.

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.

Figura 1

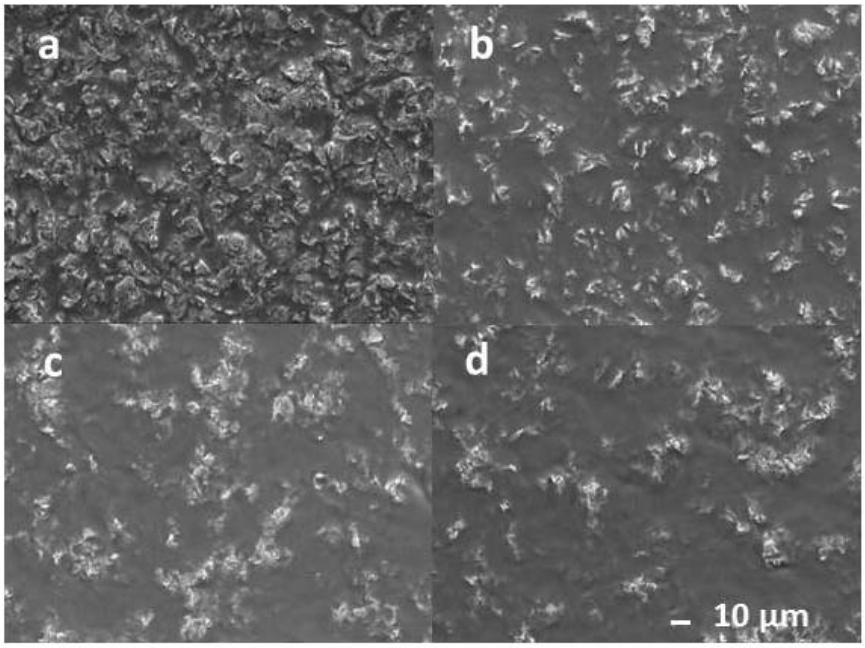


Figura 2

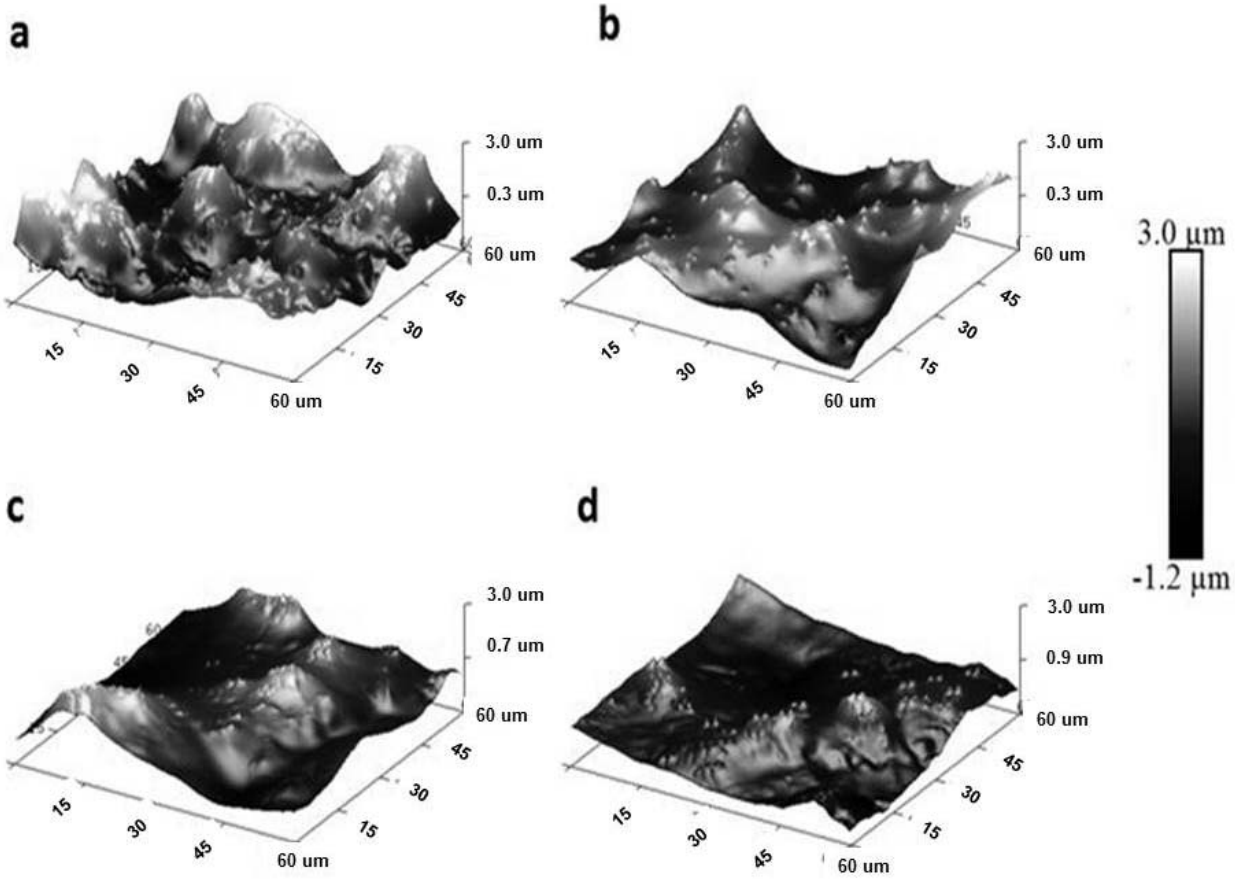


Figura 3

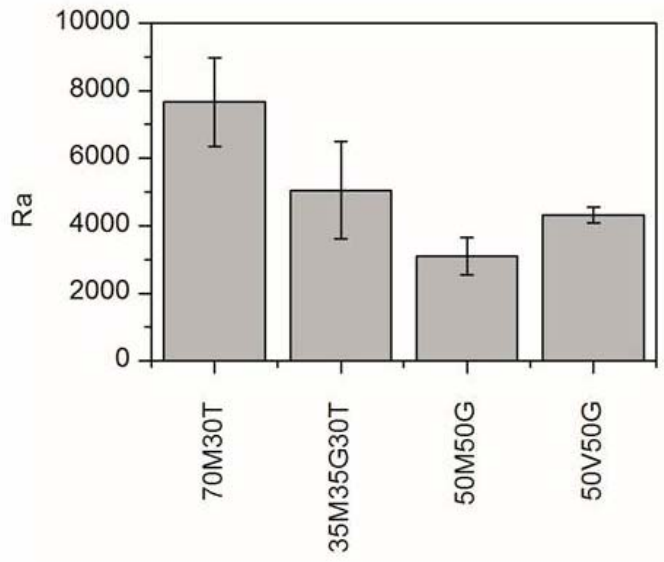


Figura 4

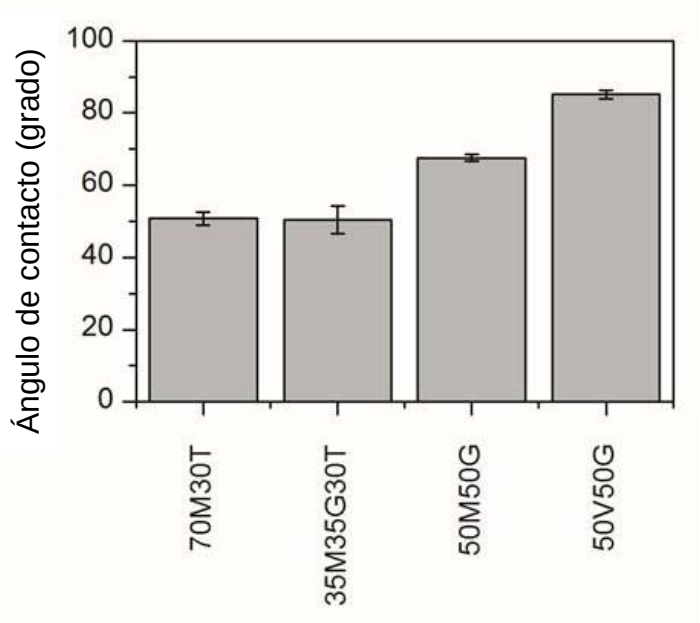


Figura 5

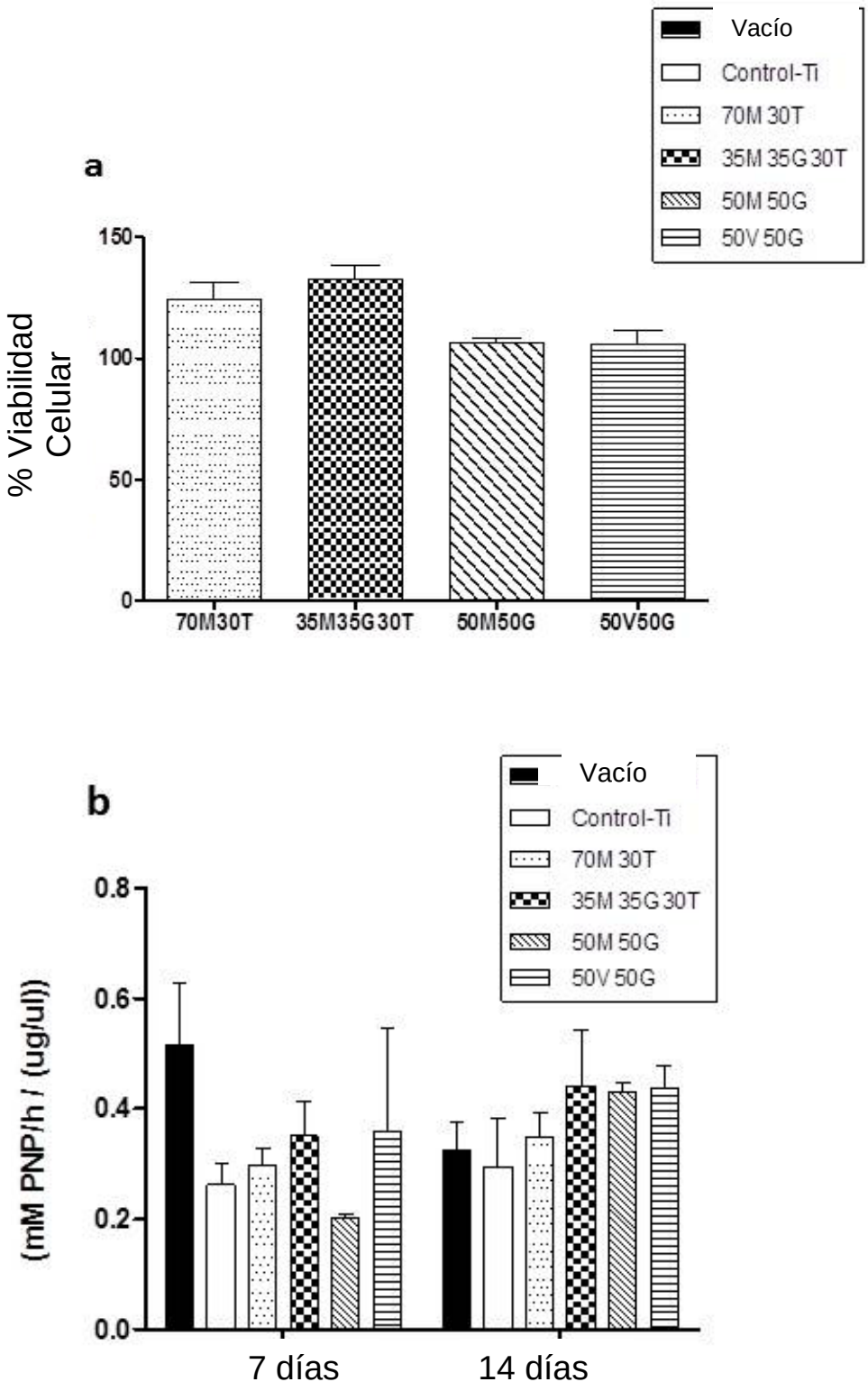

a
Vacío
Control-Ti
70M 30T
35M 35G 30T
50M 50G
50V 50G
% Viabilidad Celular
150
100
50
0
70M30T
35M35G30T
50M50G
50V50G
b
Vacío
Control-Ti
70M 30T
35M 35G 30T
50M 50G
50V 50G
(mM PNP/h / (ug/ul))
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
7 días
14 días

Figura 6

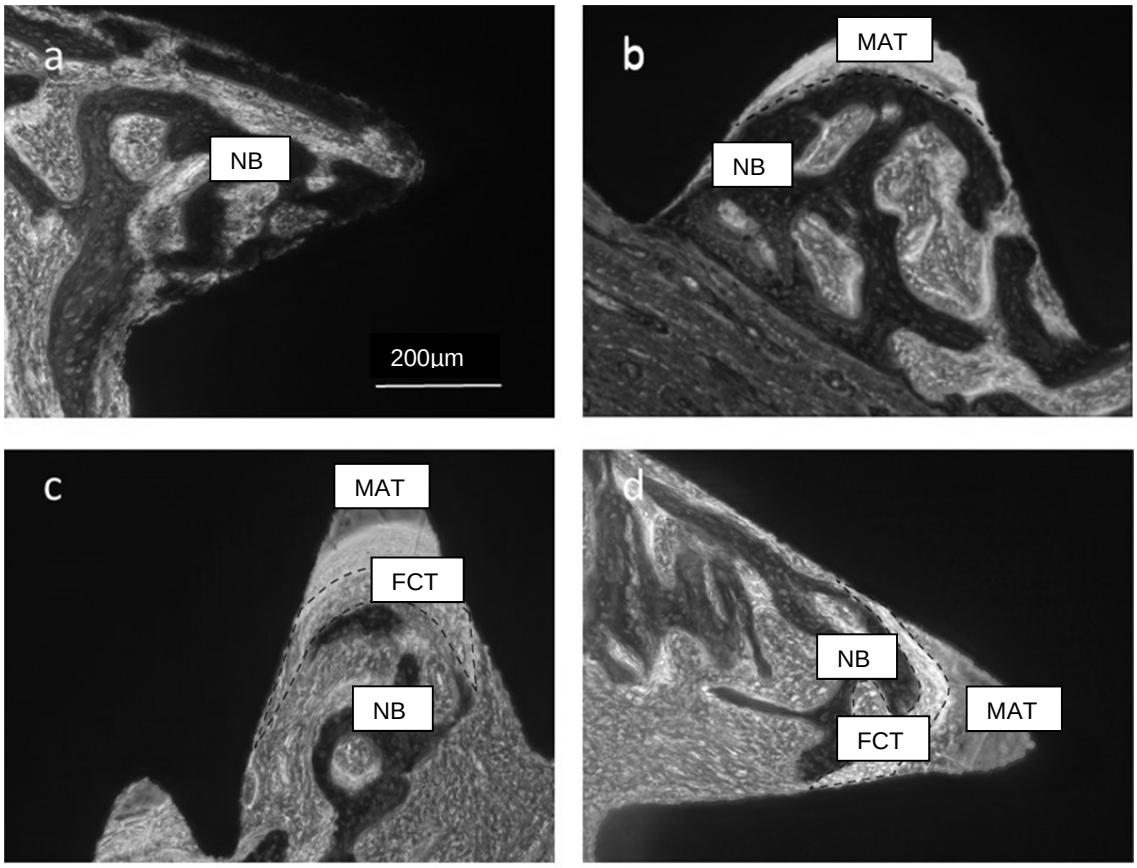
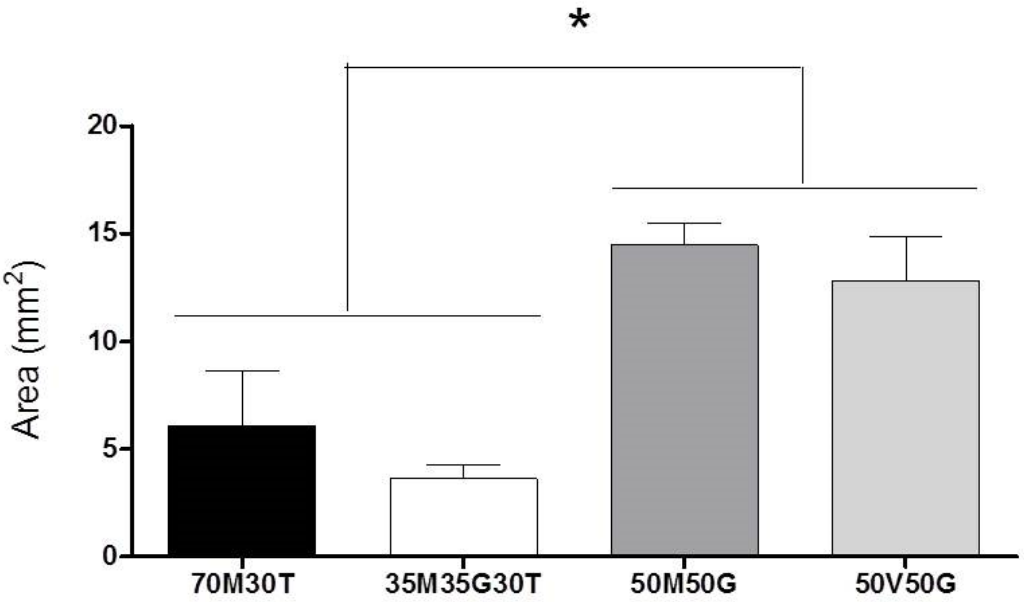


Figura 7



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

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

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

```
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 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
```

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

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
    130                 135                 140

His Phe Cys Asn Asn Phe Ile Gly Gly Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro
145                 150                 155                 160

Glu Tyr Phe Leu His Asp Asp Met Lys Asn Cys Gly Val Asn Cys Ser
                165                 170                 175

Gly Asp Val Phe Thr Ala Leu Ile Gly Glu Ile Ala Ser Pro Asn Tyr
            180                 185                 190

Pro Lys Pro Tyr Pro Glu Asn Ser Arg Cys Glu Tyr Gln Ile Arg Leu
        195                 200                 205

Glu Lys Gly Phe Gln Val Val Val Thr Leu Arg Arg Glu Asp Phe Asp
    210                 215                 220

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

Val Ala Gly Asp Arg Gln Phe Gly Pro Tyr Cys Gly His Gly Phe Pro
                245                 250                 255

Gly Pro Leu Asn Ile Glu Thr Lys Ser Asn Ala Leu Asp Ile Ile Phe
            260                 265                 270

Gln Thr Asp Leu Thr Gly Gln Lys Lys Gly Trp Lys Leu Arg Tyr His
        275                 280                 285

Gly Asp Pro Met Pro Cys Pro Lys Glu Asp Thr Pro Asn Ser Val Trp
    290                 295                 300

Glu Pro Ala Lys Ala Lys Tyr Val Phe Arg Asp Val Val Gln Ile Thr
305                 310                 315                 320

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

Phe Tyr Ser Thr Cys Gln Ser Asn Gly Lys Trp Ser Asn Ser Lys Leu
            340                 345                 350

Lys Cys Gln Pro Val Asp Cys Gly Ile Pro Glu Ser Ile Glu Asn Gly
        355                 360                 365

Lys Val Glu Asp Pro Glu Ser Thr Leu Phe Gly Ser Val Ile Arg Tyr
    370                 375                 380

Thr Cys Glu Glu Pro Tyr Tyr Tyr Met Glu Asn Gly Gly Gly Gly Glu
385                 390                 395                 400

Tyr His Cys Ala Gly Asn Gly Ser Trp Val Asn Glu Val Leu Gly Pro
```

405 410 415

Glu Leu Pro Lys Cys Val Pro Val Cys Gly Val Pro Arg Glu Pro Phe
420 425 430

Glu Glu Lys Gln Arg Ile Ile Gly Gly Ser Asp Ala Asp Ile Lys Asn
435 440 445

Phe Pro Trp Gln Val Phe Phe Asp Asn Pro Trp Ala Gly Gly Ala Leu
450 455 460

Ile Asn Glu Tyr Trp Val Leu Thr Ala Ala His Val Val Glu Gly Asn
465 470 475 480

Arg Glu Pro Thr Met Tyr Val Gly Ser Thr Ser Val Gln Thr Ser Arg
485 490 495

Leu Ala Lys Ser Lys Met Leu Thr Pro Glu His Val Phe Ile His Pro
500 505 510

Gly Trp Lys Leu Leu Glu Val Pro Glu Gly Arg Thr Asn Phe Asp Asn
515 520 525

Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Lys Asp Pro Val Lys Met Gly Pro Thr
530 535 540

Val Ser Pro Ile Cys Leu Pro Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Asn Leu Met
545 550 555 560

Asp Gly Asp Leu Gly Leu Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Glu Lys Arg
565 570 575

Asp Arg Ala Val Arg Leu Lys Ala Ala Arg Leu Pro Val Ala Pro Leu
580 585 590

Arg Lys Cys Lys Glu Val Lys Val Glu Lys Pro Thr Ala Asp Ala Glu
595 600 605

Ala Tyr Val Phe Thr Pro Asn Met Ile Cys Ala Gly Gly Glu Lys Gly
610 615 620

Met Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Ala Val Gln Asp
625 630 635 640

Pro Asn Asp Lys Thr Lys Phe Tyr Ala Ala Gly Leu Val Ser Trp Gly
645 650 655

Pro Gln Cys Gly Thr Tyr Gly Leu Tyr Thr Arg Val Lys Asn Tyr Val
660 665 670

Asp Trp Ile Met Lys Thr Met Gln Glu Asn Ser Thr Pro Arg Glu Asp

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

```
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

```
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
```

<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

```
                245                 250                 255

Tyr Asn Tyr Lys Asp Thr Ile Val Phe Lys Cys Gln Lys Gly Phe Val
            260                 265                 270

Leu Arg Gly Ser Ser Val Ile His Cys Asp Ala Asp Ser Lys Trp Asn
        275                 280                 285

Pro Ser Pro Pro Ala Cys Glu Pro Asn Ser Cys Ile Asn Leu Pro Asp
    290                 295                 300

Ile Pro His Ala Ser Trp Glu Thr Tyr Pro Arg Pro Thr Lys Glu Asp
305                 310                 315                 320

Val Tyr Val Val Gly Thr Val Leu Arg Tyr Arg Cys His Pro Gly Tyr
                325                 330                 335

Lys Pro Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Val Ile Cys Gln Lys Asn Leu
            340                 345                 350

Arg Trp Thr Pro Tyr Gln Gly Cys Glu Ala Leu Cys Cys Pro Glu Pro
        355                 360                 365

Lys Leu Asn Asn Gly Glu Ile Thr Gln His Arg Lys Ser Arg Pro Ala
    370                 375                 380

Asn His Cys Val Tyr Phe Tyr Gly Asp Glu Ile Ser Phe Ser Cys His
385                 390                 395                 400

Glu Thr Ser Arg Phe Ser Ala Ile Cys Gln Gly Asp Gly Thr Trp Ser
                405                 410                 415

Pro Arg Thr Pro Ser Cys Gly Asp Ile Cys Asn Phe Pro Pro Lys Ile
            420                 425                 430

Ala His Gly His Tyr Lys Gln Ser Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Lys Glu
        435                 440                 445

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

Lys Leu Ser Cys Ser Tyr Ser His Trp Ser Ala Pro Ala Pro Gln Cys
465                 470                 475                 480

Lys Ala Leu Cys Arg Lys Pro Glu Leu Val Asn Gly Arg Leu Ser Val
                485                 490                 495

Asp Lys Asp Gln Tyr Val Glu Pro Glu Asn Val Thr Ile Gln Cys Asp
            500                 505                 510

Ser Gly Tyr Gly Val Val Gly Pro Gln Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asn
```

```
        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
```

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
Ser Ile  Cys Asn Ser Leu Leu  Trp Leu Val Glu Asn  Tyr Gln Leu
    1100                1105                1110

Asp Asn  Gly Ser Phe Lys Glu  Asn Ser Gln Tyr Gln  Pro Ile Lys
    1115                1120                1125

Leu Gln  Gly Thr Leu Pro Val  Glu Ala Arg Glu Asn  Ser Leu Tyr
    1130                1135                1140

Leu Thr  Ala Phe Thr Val Ile  Gly Ile Arg Lys Ala  Phe Asp Ile
    1145                1150                1155

Cys Pro  Leu Val Lys Ile Asp  Thr Ala Leu Ile Lys  Ala Asp Asn
    1160                1165                1170

Phe Leu  Leu Glu Asn Thr Leu  Pro Ala Gln Ser Thr  Phe Thr Leu
    1175                1180                1185

Ala Ile  Ser Ala Tyr Ala Leu  Ser Leu Gly Asp Lys  Thr His Pro
    1190                1195                1200

Gln Phe  Arg Ser Ile Val Ser  Ala Leu Lys Arg Glu  Ala Leu Val
    1205                1210                1215

Lys Gly  Asn Pro Pro Ile Tyr  Arg Phe Trp Lys Asp  Asn Leu Gln
    1220                1225                1230

His Lys  Asp Ser Ser Val Pro  Asn Thr Gly Thr Ala  Arg Met Val
    1235                1240                1245

Glu Thr  Thr Ala Tyr Ala Leu  Leu Thr Ser Leu Asn  Leu Lys Asp
    1250                1255                1260

Ile Asn  Tyr Val Asn Pro Val  Ile Lys Trp Leu Ser  Glu Glu Gln
    1265                1270                1275

Arg Tyr  Gly Gly Gly Phe Tyr  Ser Thr Gln Asp Thr  Ile Asn Ala
    1280                1285                1290

Ile Glu  Gly Leu Thr Glu Tyr  Ser Leu Leu Val Lys  Gln Leu Arg
    1295                1300                1305

Leu Ser  Met Asp Ile Asp Val  Ser Tyr Lys His Lys  Gly Ala Leu
    1310                1315                1320

His Asn  Tyr Lys Met Thr Asp  Lys Asn Phe Leu Gly  Arg Pro Val
    1325                1330                1335

Glu Val  Leu Leu Asn Asp Asp  Leu Ile Val Ser Thr  Gly Phe Gly
    1340                1345                1350
```

```
Ser Gly  Leu Ala Thr Val His  Val Thr Thr Val Val  His Lys Thr
    1355                1360                1365

Ser Thr  Ser Glu Glu Val Cys  Ser Phe Tyr Leu Lys  Ile Asp Thr
    1370                1375                1380

Gln Asp  Ile Glu Ala Ser His  Tyr Arg Gly Tyr Gly  Asn Ser Asp
    1385                1390                1395

Tyr Lys  Arg Ile Val Ala Cys  Ala Ser Tyr Lys Pro  Ser Arg Glu
    1400                1405                1410

Glu Ser  Ser Ser Gly Ser Ser  His Ala Val Met Asp  Ile Ser Leu
    1415                1420                1425

Pro Thr  Gly Ile Ser Ala Asn  Glu Glu Asp Leu Lys  Ala Leu Val
    1430                1435                1440

Glu Gly  Val Asp Gln Leu Phe  Thr Asp Tyr Gln Ile  Lys Asp Gly
    1445                1450                1455

His Val  Ile Leu Gln Leu Asn  Ser Ile Pro Ser Ser  Asp Phe Leu
    1460                1465                1470

Cys Val  Arg Phe Arg Ile Phe  Glu Leu Phe Glu Val  Gly Phe Leu
    1475                1480                1485

Ser Pro  Ala Thr Phe Thr Val  Tyr Glu Tyr His Arg  Pro Asp Lys
    1490                1495                1500

Gln Cys  Thr Met Phe Tyr Ser  Thr Ser Asn Ile Lys  Ile Gln Lys
    1505                1510                1515

Val Cys  Glu Gly Ala Ala Cys  Lys Cys Val Glu Ala  Asp Cys Gly
    1520                1525                1530

Gln Met  Gln Glu Glu Leu Asp  Leu Thr Ile Ser Ala  Glu Thr Arg
    1535                1540                1545

Lys Gln  Thr Ala Cys Lys Pro  Glu Ile Ala Tyr Ala  Tyr Lys Val
    1550                1555                1560

Ser Ile  Thr Ser Ile Thr Val  Glu Asn Val Phe Val  Lys Tyr Lys
    1565                1570                1575

Ala Thr  Leu Leu Asp Ile Tyr  Lys Thr Gly Glu Ala  Val Ala Glu
    1580                1585                1590

Lys Asp  Ser Glu Ile Thr Phe  Ile Lys Lys Val Thr  Cys Thr Asn
    1595                1600                1605
```

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 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

```
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
```

```
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
```

```
                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
```

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

705 710 715 720

Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly
725 730 735

Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys
740 745 750

Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys
755 760 765

Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys
770 775 780

Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu
785 790 795 800

Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Pro Gln
805 810 815

Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly
820 825 830

Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly
835 840 845

Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys
850 855 860

Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr
865 870 875 880

Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys
885 890 895

Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu
900 905 910

Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly
915 920 925

Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His
930 935 940

Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe
945 950 955 960

Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu
965 970 975

Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu

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

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

<400> 15

Met Gly Pro Thr Ser Gly Pro Ser Leu 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

```
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
```

```
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
```

```
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
```

```
Phe Val  Lys Arg Ala Pro Ser  Thr Trp Leu Thr Ala  Tyr Val Val
    1070                 1075                 1080

Lys Val  Phe Ser Leu Ala Val  Asn Leu Ile Ala Ile  Asp Ser Gln
    1085                 1090                 1095

Val Leu  Cys Gly Ala Val Lys  Trp Leu Ile Leu Glu  Lys Gln Lys
    1100                 1105                 1110

Pro Asp  Gly Val Phe Gln Glu  Asp Ala Pro Val Ile  His Gln Glu
    1115                 1120                 1125

Met Ile  Gly Gly Leu Arg Asn  Asn Asn Glu Lys Asp  Met Ala Leu
    1130                 1135                 1140

Thr Ala  Phe Val Leu Ile Ser  Leu Gln Glu Ala Lys  Asp Ile Cys
    1145                 1150                 1155

Glu Glu  Gln Val Asn Ser Leu  Pro Gly Ser Ile Thr  Lys Ala Gly
    1160                 1165                 1170

Asp Phe  Leu Glu Ala Asn Tyr  Met Asn Leu Gln Arg  Ser Tyr Thr
    1175                 1180                 1185

Val Ala  Ile Ala Gly Tyr Ala  Leu Ala Gln Met Gly  Arg Leu Lys
    1190                 1195                 1200

Gly Pro  Leu Leu Asn Lys Phe  Leu Thr Thr Ala Lys  Asp Lys Asn
    1205                 1210                 1215

Arg Trp  Glu Asp Pro Gly Lys  Gln Leu Tyr Asn Val  Glu Ala Thr
    1220                 1225                 1230

Ser Tyr  Ala Leu Leu Ala Leu  Leu Gln Leu Lys Asp  Phe Asp Phe
    1235                 1240                 1245

Val Pro  Pro Val Val Arg Trp  Leu Asn Glu Gln Arg  Tyr Tyr Gly
    1250                 1255                 1260

Gly Gly  Tyr Gly Ser Thr Gln  Ala Thr Phe Met Val  Phe Gln Ala
    1265                 1270                 1275

Leu Ala  Gln Tyr Gln Lys Asp  Ala Pro Asp His Gln  Glu Leu Asn
    1280                 1285                 1290

Leu Asp  Val Ser Leu Gln Leu  Pro Ser Arg Ser Ser  Lys Ile Thr
    1295                 1300                 1305

His Arg  Ile His Trp Glu Ser  Ala Ser Leu Leu Arg  Ser Glu Glu
    1310                 1315                 1320
```

```
Thr Lys  Glu Asn Glu Gly Phe  Thr Val Thr Ala Glu  Gly Lys Gly
    1325                1330                1335

Gln Gly  Thr Leu Ser Val Val  Thr Met Tyr His Ala  Lys Ala Lys
    1340                1345                1350

Asp Gln  Leu Thr Cys Asn Lys  Phe Asp Leu Lys Val  Thr Ile Lys
    1355                1360                1365

Pro Ala  Pro Glu Thr Glu Lys  Arg Pro Gln Asp Ala  Lys Asn Thr
    1370                1375                1380

Met Ile  Leu Glu Ile Cys Thr  Arg Tyr Arg Gly Asp  Gln Asp Ala
    1385                1390                1395

Thr Met  Ser Ile Leu Asp Ile  Ser Met Met Thr Gly  Phe Ala Pro
    1400                1405                1410

Asp Thr  Asp Asp Leu Lys Gln  Leu Ala Asn Gly Val  Asp Arg Tyr
    1415                1420                1425

Ile Ser  Lys Tyr Glu Leu Asp  Lys Ala Phe Ser Asp  Arg Asn Thr
    1430                1435                1440

Leu Ile  Ile Tyr Leu Asp Lys  Val Ser His Ser Glu  Asp Asp Cys
    1445                1450                1455

Leu Ala  Phe Lys Val His Gln  Tyr Phe Asn Val Glu  Leu Ile Gln
    1460                1465                1470

Pro Gly  Ala Val Lys Val Tyr  Ala Tyr Tyr Asn Leu  Glu Glu Ser
    1475                1480                1485

Cys Thr  Arg Phe Tyr His Pro  Glu Lys Glu Asp Gly  Lys Leu Asn
    1490                1495                1500

Lys Leu  Cys Arg Asp Glu Leu  Cys Arg Cys Ala Glu  Glu Asn Cys
    1505                1510                1515

Phe Ile  Gln Lys Ser Asp Asp  Lys Val Thr Leu Glu  Glu Arg Leu
    1520                1525                1530

Asp Lys  Ala Cys Glu Pro Gly  Val Asp Tyr Val Tyr  Lys Thr Arg
    1535                1540                1545

Leu Val  Lys Val Gln Leu Ser  Asn Asp Phe Asp Glu  Tyr Ile Met
    1550                1555                1560

Ala Ile  Glu Gln Thr Ile Lys  Ser Gly Ser Asp Glu  Val Gln Val
    1565                1570                1575
```

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

```
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
```

```
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
```

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

```
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
```

```
    130                 135                 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
145                 150                 155                 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr
                165                 170                 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln
            180                 185                 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys
        195                 200                 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val
    210                 215                 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val
225                 230                 235                 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu
                245                 250                 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser
            260                 265                 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg
        275                 280                 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu
    290                 295                 300

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe
305                 310                 315                 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu
                325                 330                 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp
            340                 345                 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg
        355                 360                 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn
    370                 375                 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Lys Tyr Ser Cys Gln Glu Pro
385                 390                 395                 400

Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Asn Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala
```

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

675 680 685

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

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(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 *et al*.) 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 *et al*.) 04/08/2005, Párrafos [0091], [0092] y reivindicación 1.	1-30
A	US 2004241690 A1 (SOUKA TAKAYUKI *et al*.) 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 et al. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces.Analytical Biochemistry, 20061215 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. 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	**Examinador**	**Página**
10.02.2017	S. González Peñalba	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 *et al.)*	09.06.2011
D02	US 2005170445 A1 (REICHERT WILLIAM M *et al*.)	04.08.2005
D03	US 2004241690 A1 (SOUKA TAKAYUKI *et al*.)	02.12.2004
D04	ES 2536310T T3 (FUNDACIÓ HOSPITAL UNI VALL D HEBRON INST DE RECERCA)	22.05.2015
D05	MULLER R et al. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces.Analytical Biochemistry,20061215 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.