

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 473**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015** **PCT/US2015/021007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015** **WO15142880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015** **E 15714103 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 3120145**

54 Título: **Reactivos y métodos para la detección de cáncer de mama**

30 Prioridad:

18.03.2014 US 201461954914 P

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

06.06.2018

73 Titular/es:

SANFORD HEALTH (100.0%)

1305 West 18th Street

Sioux Falls, SD 57105, US

72 Inventor/es:

EGLAND, KRISTI;

EVANS, RICK y

POTTALA, JAMES

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 671 473 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactivos y métodos para la detección de cáncer de mama

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 61/954.914, presentada el 18 de marzo de 2014.

10 Antecedentes

Para pacientes con cáncer de mama (BCa), el diagnóstico precoz y personalizado es crucial para optimizar los tratamientos que conducen a la supervivencia a largo plazo. Aunque la mamografía es el método más utilizado para detectar BCa, aproximadamente el 20 % de las mamografías de detección dan como resultado un diagnóstico de falso negativo en gran parte debido a la alta densidad mamaria. Además, 1 de cada 10 mujeres que se hacen una mamografía necesitarán imágenes adicionales. Sin embargo, la abrumadora mayoría de estas mujeres no tendrán BCa, ya que solo de 2 a 4 de cada 1.000 mamografías de detección conducen a un diagnóstico de cáncer. Por lo tanto, existe la necesidad clínica urgente de desarrollar una nueva estrategia de diagnóstico mínimamente invasiva para el diagnóstico precoz y la monitorización de BCa.

Resumen de la invención

El alcance de la protección se define por las reivindicaciones adjuntas. Todas las realizaciones mencionadas a continuación incluyen al menos la presencia o detección de ANGPTL4.

En un primer aspecto, la invención proporciona composiciones que consisten en entre 2 y 25 marcadores de detección de anticuerpos, en donde la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, LAMC2, SPON2, SSR2, GAL1, GFRA1, LRRC15, CD147, CD320, CDH3, LRP10, SPINT2, SUSP2, y CST2. En una realización, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2. En una realización adicional, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos 5 proteínas en el grupo mencionado. En otra realización, la composición incluye además reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra uno o ambos de MUC1 y GRN. En diversas realizaciones, la composición consiste en entre 2 y 20, 4 y 10, y 5-10 marcadores de detección de anticuerpos. En diversas realizaciones adicionales, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra uno de los siguientes conjuntos de marcadores:

ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, y GFRA1;

En otra realización, los reactivos para detectar autoanticuerpos humanos comprenden las al menos dos proteínas, o fragmentos antigénicos de las mismas. En una realización adicional, las al menos dos proteínas, o fragmentos antigénicos de las mismas, comprenden dominios extracelulares nativos y/o proteínas secretadas nativas o fragmentos antigénicos de las mismas. En una realización adicional, los reactivos están marcados de forma detectable. En otra realización, los reactivos se inmovilizan en una superficie.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para detectar cáncer de mama o recidiva de la enfermedad, que comprenden poner en contacto una muestra de fluido corporal de un sujeto con riesgo de cáncer de mama o recidiva

de cáncer de mama con uno o más reactivos para detectar autoanticuerpos contra uno o más de ANGPTL4, DKK1, EPHA2, LAMC2, SPON2, SSR2, GAL1, GFRA1, LRRC15, CD147, CD320, CDH3, LRP10, SPINT2, SUSP2 y CST2, en los que la presencia de autoanticuerpos contra la una o más proteínas se correlaciona con la probabilidad de que el sujeto tenga cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama. En otra realización, los reactivos comprenden

- 5 reactivos para detectar autoanticuerpos contra uno o más de ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2. En diversas realizaciones adicionales, los reactivos comprenden reactivos para detectar autoanticuerpos dos o más, o cinco o más de las proteínas mencionadas. En otra realización, los reactivos comprenden reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra uno de los siguientes conjuntos de marcadores:
- 10 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
- 15 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
- 20 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, GAL1, y GFRA1.

- En una realización adicional, los reactivos comprenden reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra
- 25 ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15. En otra realización, el uno o más reactivos comprenden la composición de cualquier realización o combinación de realizaciones de la invención. En una realización adicional, el contacto comprende el uso de ELISA. En otra realización, la muestra de fluido corporal comprende una muestra de suero del sujeto. En una realización adicional, el método identifica al sujeto como con probabilidad de tener cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama. En una realización adicional, el método comprende además tratar al
 - 30 sujeto con una cantidad de un agente terapéutico suficiente para tratar el cáncer de mama o la recidiva de cáncer de mama.

Se desvelan métodos para tratar un sujeto con cáncer de mama, que comprenden:

- 35 (a) analizar una muestra de fluido corporal de un sujeto con riesgo de cáncer de mama, e identificar sujetos candidatos que:
(i) tienen autoanticuerpos contra al menos uno de ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15; y/o
(ii) no tienen autoanticuerpos contra GFRA1, GRN y/o LRRC15; y
- 40 (B) tratar a los sujetos candidatos con una cantidad de un agente terapéutico suficiente para tratar el cáncer de mama.

- El contacto comprende el uso de cribado de ensayo longitudinal, en el que todos los biomarcadores diana pueden detectarse y cuantificarse en un único ensayo y dilución. La muestra de fluido corporal comprende una muestra de
- 45 suero del sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1. La conformación del antígeno afecta al reconocimiento del anticuerpo. A, análisis ELISA usando un
- 50 antígeno diseñado para tener una conformación nativa. Los pocillos se recubrieron con IgG anti-conejo seguido de la proteína HER-2-ECD-rFc generada en células 293T. Se usaron diluciones en serie de anticuerpos monoclonales anti-HER-2 generados contra HER-2 nativo, 3F32 (azul), Herceptina (verde) o contra HER-2 desnaturalizado, 3F27 (rojo) en ELISA. Las reacciones se desarrollaron después de la adición del anticuerpo secundario apropiado. La O.D. es la lectura de absorbancia para la reacción. B, análisis ELISA usando un antígeno desnaturalizado. Los
 - 55 pocillos se recubrieron con His-HER-2-ECD purificado generado en E. coli, y se añadieron diluciones en serie de 3F32 (azul), Herceptina (verde) o 3F27 (rojo). Después de la adición del anticuerpo secundario, se desarrollaron las reacciones. C, detección de HER-2 nativa en células SKBR3 mediante citometría de flujo. La fluorescencia indica el reconocimiento de anticuerpos de HER-2 en la superficie de las células SKBR3. D, ensayo de competencia de unión para demostrar la especificidad del ELISA de antígeno que lleva la conformación. Los pocillos se recubrieron

previamente con IgG anti-conejo seguido de HER-2-ECD-rFc. Las proteínas quiméricas purificadas HER-2-Fc (negro) o CD30-Fc (púrpura) se diluyeron en serie y se añadieron a una cantidad constante de Herceptina antes de la adición a los pocillos. Las reacciones se desarrollaron después de la incubación con el anticuerpo secundario.

- 5 Figura 2. Comparación de la curva ROC para la clasificación de pacientes con cáncer de mama. Las respuestas de autoanticuerpos contra siete antígenos (es decir, ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRN, LRRC15 y MUC1) se añadieron a un modelo de regresión logística que incluía edad, IMC, raza y estado de fumador actual. Las curvas ROC se determinaron para todos los sujetos (arriba) y por subtipos específicos de cáncer de mama, incluyendo ER positivo, invasivo, dimensión tumoral máxima >1 cm, *in situ*, afectación de ganglios linfáticos y amplificación de HER-2 (abajo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Dentro de esta solicitud, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de referencias ya conocidas tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.), "Guide to Protein Purification" en Methods in Enzymology (M. P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.), Gene Transfer and Expression Protocols, págs. 109-128, ed. E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), y el Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, Tex.).

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona composiciones que consisten en entre 2 y 25 marcadores de detección de anticuerpos, en donde la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos dos proteínas humanas seleccionadas del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, LAMC2, SPON2, SSR2, GAL1, GFRA1, LRRC15, CD147, CD320, CDH3, LRP10, SPINT2, SUSP2, y CST2. Los inventores han descubierto inesperadamente que los autoanticuerpos contra las proteínas mencionadas proporcionan una indicación de si un sujeto padece cáncer de mama (BCa). Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico para discriminar entre BCa y pacientes sanas mediante la detección de anticuerpos en una muestra del sujeto o para detectar la recidiva de la enfermedad en un paciente con cáncer de mama después del tratamiento. En una realización, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos dos proteínas humanas seleccionadas del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2.

- En diversas realizaciones, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis proteínas en el grupo mencionado. En diversas realizaciones adicionales, la composición consiste en entre 2-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-25, 3-24, 3-23, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-25, 4-24, 4-23, 4-22, 4-21, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-25, 5-24, 5-23, 5-22, 5-21, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-25, 6-24, 6-23, 6-22, 6-21, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-25, 7-24, 7-23, 7-22, 7-21, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-25, 8-24, 8-23, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-25, 9-24, 9-23, 9-22, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-11, 12, 13, 14, 15, o 16 reactivos de detección de anticuerpos.

- Como entenderán los expertos en la técnica, las composiciones pueden incluir marcadores y controles de detección de anticuerpos adicionales según sea apropiado para un uso pretendido de la composición. En una realización no limitante, las composiciones pueden comprender además reactivos para detectar anticuerpos contra uno o ambos de mucina-1 (MUC1), HER-2 (41), IGFBP2 y GRANULINA (GRN).

- En realizaciones adicionales, las composiciones comprenden o consisten en reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra uno de los siguientes conjuntos de marcadores, que se muestran en los ejemplos que siguen (véase la Tabla 5) para proporcionar un fuerte valor predictivo para diagnosticar el cáncer de mama:

ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;

ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;

- ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
 5 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
 ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 10 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1;
 ANGPTL4, GAL1, y GFRA1.

En otra realización, las composiciones comprenden o consisten en reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15 humanas.

- 15 Los marcadores de detección de anticuerpos pueden ser cualquier reactivo adecuado que pueda usarse para detectar anticuerpos contra las proteínas mencionadas, incluyendo, pero sin limitación, la proteína indicada, una versión secretada de la proteína (tal como una forma nativa secretada de la proteína), o un dominio extracelular de la proteína. Las proteínas secretadas se administran con más facilidad desde las células tumorales a los ganglios linfáticos, donde tienen lugar las interacciones de las células inmunitarias, lo que da como resultado abundantes anticuerpos de alta afinidad. Las proteínas de la superficie de la membrana se liberan comúnmente en forma soluble a partir de células tumorales a través de la escisión dependiente de metaloproteinasas. Las proteínas desprendidas se transfieren más fácilmente a los ganglios linfáticos que la proteína intracelular. Por lo tanto, en una realización, el marcador de detección de anticuerpos es una porción secretada o de membrana de la proteína mencionada. Las
 20 secuencias de aminoácidos ejemplares de la porción secretada o de membrana de las proteínas humanas mencionadas se muestran a continuación.

ANGTPL4 (SEQ ID NO: 1)

KSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTEGS
 TDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLSQS
 FGLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLHRLPRDCQELFQVGERQS
 GLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSDCGWTVIQRHDGSDFNRPWEAYKAGFGDPHGEF
 WLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAG
 QLGATTVPSPGLSVPFSTWDQDHDLLRRDKNCAKSLSGGWVFGTCSHSNLNGQYFRS
 IPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS

30

DKK1 (SEQ ID NO:2)

VSATLNSVLNSNAIKNLPPPLGGAAGHPGSAVSAAPGILYPGONKYQTIDNYQPYPC
 AEDEECGTDEYCASPTRGGDAGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNYCKNGICVSS
 DQNHFRGEIEETITESFGNDHSTLDGYSRRTTLSSKMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGL
 CCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLSRIQKDDHHQAS
 NSSRLHTCQRH

EPHA2 (SEQ ID NO:3)

KEVVLLDFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVNCNVMMSGDQDN
 WLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQK
 RLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAQDQIGACVALLSVR
 VYYKKCPPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDG
 EWLVPYGQCLCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSECE
 EEGFFRAPQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTC
 EQCWPESEGCPCASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVT
 SRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVSWSIPPPQQRVWKYEVYRKKGDSNS
 YNVRRTGFSVTLDDLAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPGSGNL

LAMC2 (SEQ ID NO:4)

TSRREVCDCNGKSRQCIFDRELHRQTGNGFRCLNCNDNTDQIHCEKCKNGFYRHRE
 RDRCLPCNCNSKGSLSARCDNSGRCSCKPGVTGARCDRCLPGFHMULTDAGCTQDQR
 LLDSKCDPAGIAGPCDAGRCVCKPAVTGERCDRCRSGYYNLDGGNPEGCTQCFC
 YGHSASCRSSAEYSVHKITSTFHQDQVDGWKAVQRNGSPAKLQWSQRHQDVFSSAQ
 RLDPVYFVAPAKFLGNQQVSYGQSLSEFYRVDRGGRHPSAHDVILEGAGLRITAPLM
 PLGKTLPCGLTKTYTFRNLNEHPSNNWSPQLSYFEYRRLLRNLTA LRIRATYGEYSTGY
 IDNVT LISARPVSGAPAPWVEQCICPVGYKGQFCQDCASGYKRDSARLGPFGTCPCN
 CQGGGACDPDTGDCYSGDENPDIECADCPIGFYNDPHDPRSCKPCPCHNGFSCSVMP
 ETEEVCNCPGVTGARCELCADGYFGDPFGEHGPVRPCQPCQCNNDVPSASGN
 CDRLTGRCCLKCIHNTAGIYCDQCKAGYFGDPLAPNPADKCRACNCNPMGSEPVGCR
 SDGTCVCKPGFGGPNCEHGAFSPACYNQVKIQMDQFMQQLQRMEALISKAQGGD
 GVVDPTELEGRMQQAEQALQDILRDAQISEGASRSLGLQLAKVRSQENSYSRLDDL
 KMTVERVRALGSQYQNRVRDTHRLITQMQLSLAESEASLGNTNIPASDHVGPNGF
 KSLAQEATRLAESHVESASNMEQLTRETEDYSKQALSLVRKALHEGVGSGSGSPDG
 AVVQGLVEKLEKTKSLAQQLTREATQAEIEADRSYQHSLRLLDSVSRLQGVSDQSFQ
 VEEAKRIKQKADSLSSLVTRHMDEFKRTQKNLGNWKEEAQQLLQNGKSGREKSDQ
 LLSRANLAKSRAQEALSMGNATFYEVESILKNLREFDLQVDNRKAEAEAMKRLSYI
 SQKVSDASDKTQQAERALGSAAADAQRAKNGAGEALEISSEIEQEIGSLNLEANVTA
 DGALAMEKGLASLKSEMREVEGELERKELEFDTNMDAVQMVITEAQKVDTRAKNA
 GVTIQDTLNTLDGLLHLMGM

5

SPON2 (SEQ ID NO:5)

QPLGGESICSARAPAKYSITFTGKWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAAHSSDYSM
WRKNQYVSNGLRDFEAERGEAWALMKEIEAAGEALQSVHEVFSAPAVPSGTGGQTS
ELEVQRRHSLVSFVVRIVPSPDWVFGVDSLDCDGRWREQAALDLYPYDAGTDSG
FTFSSPNFATIPQDTVTEITSSSPSHPANSEYYPRLKALPPIARVTLLRLRQSPRAFIPPA
PVLPSRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGHCGR LGTKSRTRYVRVQPANN
GSPCPELEEEAECVPDNCV

SSR2 (SEQ ID NO:6)

EEGARLLASKSLLNRYAVEGRDLTLQYNIYNVGSSAALDVELSDDSFPPEDFGIVSG
MLNVKWDRIAPASNVSHTVVLRPLKAGYFNFTSATITYLAQEDGPVVGSTSAFGQG
GILAQREFDRRFSPH

5

GAL1 (SEQ ID NO:7)

LRVRGEVAPDAKSEVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANTIVCNSKDOGAWGTE
QREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLDPGYEFKFPNRLNLEAINYMAADGDFKI
KCVAFD

GFRA1 (SEQ ID NO:8)

DRLDCVKASDQCLKEQSCSTKYRTL RQCVAGKETNFS LASGLEAKDECRSAMEALK
QKSLYNCRCKRGMKKEKNCLRIYWSMYQSLQGNDLLEDSPYEPVNSRLSDIFRVVP
FISDV FQQVEHIPKGNNCLDAAKACNLDDICKKYRSAYITPCTTSVSN DVCNRRKCH
KALRQFFDKVPAKHSYGMLFCSCRDIAC TERRRQTIVPVCSYEEREKPNCLNLQDSC
KTNYICRSRLADFFTNCQPESRSVSSCLKENYADCLLAYSGLIGTVMTPNYIDSSSLSV
APWCDCSNSGNDLEECLKFLNFFKDNTCLKNAIQAFGNGSDVTWQPAFPVQT TTA
TTTTALRVKNKPLGPAGSENEIPTHVLPPCANLQAQKLKSNVSGNTHLCISNGNYEK
EGLGASSHITTKSMAAPPSCGLSPLLVLVVTALSTLLSLTETS

10

LRR15 (SEQ ID NO:9)

YHGC PSECTCSRASQVECTGARIVAVPTPLPWNAMSLQILNTHITELNESPFLNISALI
ALRIEKNELSRITPGA FRNLGSLRYLSLANNKLQVLP IGLFQGLDSLESLLLSSNQLLQI
QPAHFSQCSNLKELQLHGNHLEYIPDGAFDHLVGLTKNLGKNSLTHISPRVFQHLG
NLQVRLRYENRLTDIPMOTFDGLVNLQELALQQNQIGLLSPGLFHNNHNLQRLYLSN
NHISQLPPSVFMQLPQLNRLTLFGNSLKE LSPGIFGMPPNLRELWLVDNHISSLPDNVF
SNLRQLQVLILSRNQISFISPGA FNGLTELRELSLHTNALQDL DGNVFRMLANLQNISL

QNNRLRQLPGNIFANVNGLMIAQLQNNQLENLPLGIFDHLGKLCELRLYDNPWRCDS
DILPLRNWLLLNQPRLGTDTPVPCFSPANVRGQSLIINNVNAVPSVHVPEVPSYPETP
WYPDTPSYPDTTSVSSTTELTSPVEDYTDLTITQVTDDRSVWGMTQAQSG

GRN (SEQ ID NO:10)

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCP DGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLARSPHVGVDVECGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLL

5

MUC1 (SEQ ID NO:11)

APKPATVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAFNSSLED PSTDYYQELQR
DISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAA
SRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPG

CD147 (SEQ ID NO:12)

AAGTVFTTVEDLGSKILLTCSLND SATEVTGHRWLKGGVVLKEDALPGQKTEFKVD
SDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRVKAVKSSEHINEGETAMLVCKSESVPV
TDWAWYKITDSEDKALMNGSES RFFVSS

10

CD320 (SEQ ID NO:13)

AGPSSGSCPPTKFQCR TSGLCVPLTWRCDRDLDCSDGSDEEECRIE PCTQKGQC PPP
GLPCPCTGVSDC'SGGTDK KLRNCSRLACLAGE LRCTLSDDCIPLTWRC DGHPCPDS
SDELGCGTNEILPEGDATTMGPPVTLESVTSLRNATTMGPPVTLESVPSVGNATSSSA
GDQSGSPTAYG

15 **CDH3 (SEQ ID NO:14)**

EPCRAVFREA EVTLEAGGAEQEPGQALGKVFMGCPGQEPALFSTDND DFTVRNGET
VQERRSLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPISVPENGKGPFQRLNQLKSNKDRD
TKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVSENGASVE
DPMNISIUVT DQNDHKPKFTQD TFRGSVLEGVLPGTSVMQMTATDEDDAIYTYNGVV
AYSIIHQEPKDPHDLMFTHIRSTGTISVISSGLDREKVPEYTLTIQATDMDGDGSTTTA
VAVVEILDANDNAPMFDPQKYEAHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYLI
MGGDDGDHFTITTHPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTTA
TIVVHVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPVCVYTAEDPDKENQKISYRILRDP
A
GWLAMD PDSGQVTA VGTLDREDEQFVRNNIYEVMLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTLI
DVNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLSPHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNE
EGDTVVL SLKKFLKQD TYDVHLSLSDHGNKEQLTVIRATVCDCHGHVETCPGPWKG
G

HER2 (SEQ ID NO:15)

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQE
VQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPG
GLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACH
PCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKH
SDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLST
DVGSC TLVCP LHNQEVT AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQ
EFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PD
LSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIIHNTHLCFVHT
VPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQF
LRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHY
KDPPFCVARCPSGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PAEQR
ASPLT

5

IGFBP2 (SEQ ID NO:6)

EVLFRCPCTPERLAACGPPPVAPPAVA AVAGGARMPCAELVREPGCGCCSVCAR
LEGEACGVYT PRCQGLRCYPHPGSELPLQALVMGEGTCEKRRDAEY GASPEQVAD
NGDDHSEGLVENHVDSTMNMLGGGGSAGRKPLKSGMKELAVFREKVTEQHRQM
GKGGKHHLGLEEPKKL RPPPARTPCQ QELDQVLERISTMRLPDERGPLEHLYSLHIPN
CDKHGLYNLKQCKMSLNGQRGECWCVNPNNTCKLIQCAPTIRGDPECHLFYNEQQEA
RGVHTQRMQ

LRP10 (SEQ ID NO:17)

HPDRIIFPNHACEDPPAVLLEVQGTQLQRPLVRDSRTSPANCTWLILGSKEQTVTIRFQK
LHLACGSERLTLRSPLQPLISLCEAPPSPLQLPGGNVTITYSYAGARAPMGQGFLSYS
QDWLMCLQEEFQCLNHRCVSAVQRCQDGV DACGDGSD EAGCSDPFPGLTPRPVPSL
PCNVTLED FYGVFSSPGYTHLASVSH PQSCHWLLDPHDGRRLAVRFTALDLGFGDA
VHVYDGP GPP ESSRLLRSLTHFSNGKAVTVETLSGQAVVS YHTVAWSNGRGFNATY
HVRGYCLPWDRPCGLGSGLGAGEGLGERCYSEAQRCDGSDCADGTDEEDCPGCP
PGHFPCGAAGTSGATAC YLPADRCNYQTF CADGADERRCRHCQPGNFRRCRDEKCV
YETWVCDGQPD CADGSD EWD C SYVLPRK

5 SPINT2 (SEQ ID NO:18)

ADRERSIHDFCLVSKVVGRCRASMPRWWYNVTDGSCQLFVYGGCDGNSNNYLTKE
ECLKKCATVTENATGDLATSRNAADSSVPSAPRRQDSEDHSSDMFN YEEYCTANAV
TGPCRASFP RWYFDVERN SCNNFIYGGCRGNKNSYRSEEACMLRCFRQQENPPLPLG
SKV

SUSD2 (SEQ ID NO:19)

QESCSMR CGALDGP CSCHPTCSGLGTCCLD FRDFCLEILPYSGSMMGGKDFVVRHFK
MSSPTDASVICRFKDSIQTLGHVDSSGQVHCVSPLLYESGRIPFTVSLDNHGSFPRACT
WLAVHPNKVSMMEKSELVNETRWQYYGTANTSGNLSLTWHVKSLPTQTITIELWG
YEETGMPYSQEW TAKWSYLYPLATHIPNSGSFTFTPKPAPPSYQRWRVGALRIIDSK
NYAGQKDVQALWTNDHALAWHLSDDFREDPVAWARTQCQAWEELEDQLPNFLEE
LPDCPCTLTQARADSGRFFTDY GCDMEQGSVCTYHPGAVHCVRSVQASLRYGSGQQ
CCYTADGTQLLTADSSGGSTPDRGHDWGAPPFRTPPRVPSMSHWLYDVLSFYCCL
WAPDCPRYMQR RPSNDCRN YRPPRLASAFGDPHFVTFDGTNFTFNGRGEYVLEAA
LTDLRVQARAQPGTMSNGTETRGTGLTAVAVQEGNSDVVEVRLANRTGGLEVLLN
QEVLSFTEQSWMDLKGMFLSVAAGDRVSIMLASGAGLEVSVQGPFLSVSVLLPEKFL
THTHGLLGTLNNDPTDDFTLHSGRVLPPGTSPQELFLFGANWTVHNASSLLTYDSWF
LVHNFLYQPKHDPTFEPLFPSETTLNPSLAQEAAKLCGDDHFCNFDVAATGSLSTGT
ATRV AHQLHQRRMQSLQPVVSCGWLAPPPNGQKEGNRYLAGSTIYFHCDNGYSLA
GAETSTCQADGTWSSPTPKCQPGRSYA

10

CST2 (SEQ ID NO:20)

WSPQEEDRIEAGGIYDADLNDERVQRALHFVISEYNKATEDEYYRLLLRVLRAREQIV
GGVNYFFDIEVGRITCKTSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSFQIYVWPWEDRMSLVN
SRCQEA

- En una realización adicional, el marcador de detección de anticuerpo es una proteína, tal como la desvelada anteriormente, es decir, en su forma nativa. Como se desvela en los ejemplos adjuntos, los inventores utilizaron un sistema de expresión eucariota para generar antígenos tumorales portadores de conformación que están plegados adecuadamente y que contienen epítomos no continuos para su uso en la detección de autoanticuerpos. La proteína puede usarse en cualquier formato adecuado; en una realización no limitante, la proteína puede ser una proteína de fusión Fc.
- 10 En todas las realizaciones anteriores, los reactivos de detección de anticuerpos se pueden marcar con un marcador detectable. En una realización, los marcadores detectables para reactivos para detectar autoanticuerpos contra una proteína son distinguibles de los marcadores detectables para detectar autoanticuerpos contra la otra proteína. Los métodos para detectar la etiqueta incluyen, pero sin limitación, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunológicas, físicas o químicas. Se puede usar cualquier etiqueta detectable adecuada.
- 15 Las composiciones se pueden almacenar congeladas, en forma liofilizada, o como una solución. En una realización, las composiciones pueden colocarse sobre un soporte sólido, tal como en un formato de micromatriz o microplaca; esta realización facilita el uso de las composiciones en diversos ensayos de detección. Por ejemplo, se puede usar anti-IgG para recubrir previamente los pocillos de una placa de micropocillos y los reactivos de detección de anticuerpos (tales como las proteínas analizadas en el presente documento) se pueden añadir a los pocillos recubiertos previamente.
- 20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos para detectar cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama, que comprenden poner en contacto una muestra de fluido corporal de un sujeto con riesgo de cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama con uno o más reactivos para detectar autoanticuerpos contra uno o más de ANGPTL4, DKK1, EPHA2, LAMC2, SPON2, SSR2, GAL1, GFRA1, LRRC15, CD147, CD320, CDH3, LRP10, SPINT2, SUSD2 y CST2 humanas, en los que la presencia de autoanticuerpos contra la una o más proteínas se correlaciona con la probabilidad de que el sujeto tenga cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama.
- 30 En una realización, la composición incluye reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2 humanas.
- 35 Como entenderán los expertos en la técnica, los métodos pueden incluir el uso de marcadores y controles de detección de anticuerpos adicionales según sea apropiado para un uso pretendido de la composición. En una realización no limitante, las composiciones pueden comprender además reactivos para detectar anticuerpos contra uno o ambos de mucina-1 (MUC1), HER-2 (41), IGFBP2 y GRANULINA.
- 40 En otra realización de los métodos de la invención, las composiciones comprenden o consisten en reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra uno de los siguientes conjuntos de marcadores:
- ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
- 45 ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
- 50 ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1;
ANGPTL4, GAL1, y GFRA1.

En otra realización, las composiciones comprenden o consisten en reactivos para detectar autoanticuerpos humanos contra ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15.

- 5 Los marcadores de detección de anticuerpos pueden ser cualquier reactivo adecuado que pueda usarse para detectar anticuerpos contra las proteínas mencionadas, incluyendo, pero sin limitación, la proteína indicada, una versión secretada de la proteína (tal como una forma nativa secretada de la proteína), o un dominio extracelular de la proteína. Las proteínas secretadas se administran con más facilidad desde las células tumorales a los ganglios linfáticos, donde tienen lugar las interacciones de las células inmunitarias, lo que da como resultado abundantes anticuerpos de alta afinidad. Las proteínas de la superficie de la membrana se liberan comúnmente en forma soluble a partir de células tumorales a través de la escisión dependiente de metaloproteinasas. Las proteínas desprendidas se transfieren más fácilmente a los ganglios linfáticos que la proteína intracelular. Por lo tanto, en una realización, el marcador de detección de anticuerpos es una porción secretada o de membrana de la proteína mencionada. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de la porción secretada o de membrana de las proteínas humanas son como se desvelan en el presente documento.

En otra realización, el marcador de detección de anticuerpo comprende o consiste en una composición de la invención.

- 20 La puesta en contacto puede realizarse bajo cualquier condición adecuada para promover la unión entre los autoanticuerpos en la muestra de fluido corporal y el reactivo para formar un complejo de unión que puede detectarse. Los expertos en la técnica pueden determinar tales condiciones apropiadas basándose en el ensayo pretendido, a la luz de las enseñanzas del presente documento. De forma similar, se puede usar cualquier etapa adicional adecuada en los métodos, tales como una o más etapas de lavado u otras etapas para eliminar los reactivos no unidos.

- Se puede usar cualquier técnica de detección adecuada, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), plataformas de ensayo basadas en microesferas tales como los sistemas Luminex, plataformas de ensayo basadas en matrices 2-D tales como SearchLight®, y la plataforma de "cribado de ensayo longitudinal" Inanovate® que puede ser capaz de cuantificar todos los biomarcadores de cáncer de mama enumerados de muestras de pacientes en sus concentraciones clínicamente relevantes en una sola prueba y dilución. En una realización, las composiciones se pueden colocar sobre un soporte sólido, tal como en una micromatriz, un portaobjetos de vidrio, una membrana, un formato de microplaca o perlas. La realización facilita el uso de las composiciones. Se proporcionan ejemplos de dichos ensayos en los ejemplos.

- 35 De manera similar, se puede usar cualquier fluido corporal adecuado, incluyendo, pero sin limitación, una muestra de suero, muestra de plasma o muestra de sangre del sujeto. El sujeto puede ser cualquier sujeto con riesgo de cáncer de mama, tal como un sujeto humano.

- 40 En una realización adicional, el método identifica al sujeto como con probabilidad de tener cáncer de mama, y en el que el método comprende adicionalmente tratar al sujeto con una cantidad de un agente terapéutico suficiente para tratar el cáncer de mama.

- En una realización no limitante de cualquiera de las realizaciones anteriores, la respuesta de autoanticuerpo contra ANGPTL4, DKK1, GAL1 y MUC1 está correlacionada con BCa; y las respuestas de autoanticuerpos contra GFRA1, GRN y LRRC15 están inversamente correlacionadas con BCa.

- En una realización específica, los reactivos incluyen ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15; donde, las respuestas de autoanticuerpos contra GFRA1, GRN y LRRC15 están inversamente correlacionadas con BCa. Como se detalla en los ejemplos, cuando las respuestas de autoanticuerpos contra los 7 antígenos se añadieron al modelo base, incluida la edad, el índice de masa corporal (IMC), la raza y el hábito de fumar actual, el ensayo tenía las siguientes capacidades de diagnóstico: estadística c (95 % de IC), 0,82 (0,78 a 0,86); sensibilidad, 73 %; especificidad, 76 %; y PLR (95 % de IC), 3,04 (2,34 a 3,94). El modelo se calibró a través de deciles de riesgo (Hosmer-Lemeshow, $p = 0,13$) y se realizó bien en subtipos específicos de BCa, incluyendo receptores de estrógeno positivos, HER-2 positivos, invasivos, in situ y tamaños tumorales >1 cm. Las capacidades de diagnóstico de otros conjuntos de marcadores ejemplares se proporcionan en la Tabla 5.

Se desvelan métodos para tratar un sujeto con cáncer de mama, que comprenden:

(a) analizar una muestra de fluido corporal de un sujeto con riesgo de cáncer de mama, e identificar sujetos candidatos que:

(i) tienen autoanticuerpos contra al menos uno de ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15; y/o

(b) no tienen autoanticuerpos contra GFRA1, GRN y/o LRRC15; y

5

(b) tratar a los sujetos candidatos con una cantidad de un agente terapéutico suficiente para tratar el cáncer de mama.

Ejemplo 1

10

Los pacientes con cáncer de mama (BCa) provocan una respuesta de autoanticuerpo contra las proteínas del cáncer, lo que refleja y amplifica los cambios celulares asociados con la tumorigénesis. La detección de autoanticuerpos en plasma puede proporcionar un mecanismo mínimamente invasivo para la detección temprana de BCa. Para identificar las proteínas del cáncer que provocan una respuesta humoral, se generó una biblioteca de

15 ADNc enriquecida para genes de BCa que codifican proteínas de membrana y secretadas, que tienen más probabilidades de inducir una respuesta de anticuerpos en comparación con las proteínas intracelulares. Para generar antígenos portadores de conformación que sean reconocidos de manera eficiente por los anticuerpos de los pacientes, se estableció una estrategia de expresión eucariota. Se midió el plasma de 200 pacientes de BCa y 200

20 controles sanos de la misma edad para determinar la actividad de autoanticuerpos contra 20 antígenos diferentes diseñados para tener epítomos conformacionales usando ELISA. Se utilizó un modelo de regresión logística condicional para seleccionar una combinación de respuestas de autoanticuerpos contra los 20 antígenos diferentes para clasificar a los pacientes con BCa de los controles sanos. La mejor combinación incluía ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15; sin embargo, las respuestas de autoanticuerpos contra GFRA1, GRN y LRRC15 se correlacionaron inversamente con BCa. Cuando las respuestas de autoanticuerpos contra los 7

25 antígenos se añadieron al modelo base, incluida la edad, IMC, la raza y el hábito de fumar actual, el ensayo tenía las siguientes capacidades de diagnóstico: estadística c (95 % de IC), 0,82 (0,78 a 0,86); sensibilidad, 73 %; especificidad, 76 %; y PLR (95 % de IC), 3,04 (2,34 a 3,94). El modelo se calibró a través de deciles de riesgo (Hosmer-Lemeshow, $p = 0,13$) y se realizó bien en subtipos específicos de BCa, incluyendo receptores de estrógeno positivos, HER-2 positivos, invasivos, in situ y tamaños tumorales >1 cm.

30

Introducción

Para pacientes con cáncer de mama (BCa), el diagnóstico precoz y personalizado es crucial para optimizar los tratamientos que conducen a la supervivencia a largo plazo. Aunque la mamografía es el método más utilizado para

35 detectar BCa, aproximadamente el 20 % de las mamografías de detección dan como resultado un diagnóstico de falso negativo en gran parte debido a la alta densidad mamaria (1). Además, 1 de cada 10 mujeres que se hacen una mamografía necesitarán imágenes adicionales (2). Sin embargo, la abrumadora mayoría de estas mujeres no tendrán BCa, ya que solo de 2 a 4 de cada 1.000 mamografías de detección conducen a un diagnóstico de cáncer (3). Por lo tanto, existe la necesidad clínica urgente de desarrollar una nueva estrategia de diagnóstico mínimamente

40 invasiva para el diagnóstico precoz de BCa.

Actualmente, no existe un marcador tumoral establecido que se secrete en la circulación periférica que se puede medir mediante un análisis de sangre para el diagnóstico de BCa. Actualmente, los marcadores tumorales que se aceptan en la práctica clínica son marcadores pronósticos basados en tejido, como el receptor de estrógenos (ER),

45 amplificación de HER-2, Oncotype DX de 21 genes y MammaPrint de 70 genes (6-12). Todos requieren una biopsia invasiva o un procedimiento quirúrgico para adquirir tejido tumoral para su evaluación, lo que conlleva una pesada carga para los pacientes. Los marcadores tumorales séricos son herramientas valiosas que permiten procedimientos mínimamente invasivos de muestreo para promover el diagnóstico precoz del cáncer, así como seguir el pronóstico después del tratamiento (4, 5). Sin embargo, los marcadores tumorales producidos por las células tumorales

50 normalmente tienen concentraciones relativamente bajas en la circulación periférica, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad.

Aquí se informa el uso de un enfoque molecular para identificar candidatos de antígenos tumorales que provocan una respuesta de anticuerpos en pacientes de BCa. Previamente, se generó una biblioteca de ADNc de BCa a partir

55 de ARN polirribosómico (MAP) asociado a la membrana, que codifica las proteínas secretadas y de membrana, y se sustrajo la biblioteca con ARN de tejidos normales (29). Las proteínas secretadas se administran con más facilidad desde las células tumorales a los ganglios linfáticos, donde tienen lugar las interacciones de las células inmunitarias, lo que da como resultado abundantes anticuerpos de alta afinidad. Las proteínas de la superficie de la membrana se liberan comúnmente en forma soluble a partir de células tumorales a través de la escisión dependiente de

metaloproteinasas. Las proteínas desprendidas se transfieren más fácilmente a los ganglios linfáticos que las proteínas intracelulares (30, 31). En consecuencia, la biblioteca sustraída obtenida, denominada biblioteca de ADNc polirribosómico asociada a membrana (MAPcL), está enriquecida con clones que codifican TAA de membrana y secretados que son muy abundantes en BCa y deberían inducir preferiblemente una respuesta de anticuerpos en los

5 pacientes (29). Además, se ha establecido un método para producir antígenos recombinantes como proteínas de fusión Fc diseñadas para tener conformaciones nativas, lo que es esencial para la expresión de proteínas secretadas y de membrana que pueden inducir una respuesta de anticuerpos en pacientes.

Se ha desarrollado una estrategia basada en ELISA de antígeno portador de conformación para discriminar entre

10 BCa y pacientes sanos mediante la detección de autoanticuerpos contra un panel de TAA. Se seleccionaron veinte antígenos de los genes más abundantes representados en la MAPcL, y se generaron proteínas de fusión Fc. Se recolectó sangre de 200 pacientes con BCa recién diagnosticados y 200 mujeres sanas como controles de la misma edad. Las 400 muestras de plasma se cribaron para determinar la presencia de autoanticuerpos contra los 20

15 antígenos derivados de MAPcL diferentes usando ELISA. Una combinación de siete antígenos con datos demográficos de los pacientes arrojó la mejor relación de probabilidad positiva para discriminar entre pacientes sanos y BCa.

Materiales y métodos

20 Construcción de plásmidos

Para la producción de antígenos marcados con Fc de MAPcL-conejo, se usaron dos construcciones, pSecTag2 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y pFUSE-rlgG-Fc1 (InvivoGen, San Diego, CA), para generar las construcciones de expresión de 20 MAPcL-rFc debido a la disponibilidad del sitio de restricción para la clonación. Se modificó

25 pSecTag2 amplificando la porción Fc de IgG de conejo usando los cebadores 5'-CCGGATATCAGCAAGCCCACGTGCCAC-3' (SEQ ID NO:21) y 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTC-ATTACCCGGAGAGCGGGAG-3' (SEQ ID NO:22) (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa) usando pFUSE-rlgG-Fc1 como plantilla. El producto de PCR de rFc se digirió con EcoRV y NotI y se insertó en pSecTag2, denominado pSecTag2-rFc, que contiene una secuencia de señal de IgK para la secreción. El pFUSE-rlgG-Fc1

30 contiene una secuencia señal IL2. Para mantener la secuencia señal consistente entre los dos plásmidos, la secuencia líder de IgK se amplificó mediante PCR usando pSecTag2 como plantilla. La secuencia líder de IL2 se reemplazó entonces con la secuencia señal de IgK, creando pFUSE-IgK-rFc.

Los números de acceso de los 20 genes MAPcL usados como plantillas para la clonación y las secuencias señal

35 predichas se indican en la Tabla 1. Las secuencias señal de cada proteína codificada se determinaron usando SignalP (32, 33). Si una proteína contenía un dominio transmembrana, solo se incluía la porción extracelular codificada. Los dominios transmembrana se predijeron utilizando la base de datos TMHMM (34). Los números de aminoácidos codificados por el fragmento clonado se muestran en la Tabla 1. *ANGPTL4*, *CDH3*, *DKK1*, *SPON2*, *SSR2*, *CST2*, *GFRA1* y *GAL1* se clonaron de manera personalizada en pSecTag2-rFc usando los sitios de

40 restricción SfiI y KpnI (Genscript, Piscataway, N.J.). *EPHA2*, *IGFBP2* y *LAMC2* se clonaron de manera personalizada en pSecTag2-rFc usando los sitios de restricción KpnI y BamHI. *GRN*, *MUC1* y *LRRC15* se clonaron de manera personalizada en pSecTag2-rFc usando los sitios de restricción SfiI y BamHI. *HER-2*, *LRP10*, *SPINT2* y *SUSD2* se clonaron en pFUSE-IgK-rFc usando los sitios de restricción SfiI y XhoI. *CD147* se clonó en pFUSE-IgK-rFc usando los sitios de restricción BamHI y SacII. *CD320* se clonó en pFUSE-IgK-rFc usando los sitios de restricción EcoRI y

45 XhoI.

Tabla 1. Candidatos MAPcL para la generación de proteínas de fusión rFc

Gen de MAPcL	Acceso N.º	Aminoácidos de secuencia señal*	Fragmento aminoácido codificado†
ANGPTL4 (angiopoyetina de tipo 4)	NM_139314	1-30	31-406
CD147	NM_198589	1-21	22-162
CD320	NM_016579	1-46	47-230
CDH3 (cadherina 3)	NM_001793	1-24	25-654
CST2 (cistatina SA)	NM_001322	1-20	21-141
DKK1 (inhibidor de la ruta de señalización de WNT dickkopf 1)	NM_012242	1-28	29-266
EPHA2 (receptor EPH A2)	NM_004431	1-26	27-535

Gen de MAPcL	Acceso N.º	Aminoácidos de secuencia señal*	Fragmento aminoácido codificado†
GAL1 (lectina, unión a galactósido, soluble, 1)	NM_002305	1-17	18-135
GFRA1 (proteína de anclaje ligada a GPI)	AF038421	1-24	25-465
GRN (granulina)	NM_002087	1-17	18-593
HER-2	NM_004448	1-22	23-652
IGFBP2 (proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 2)	NM_000597	1-39	40-328
LAMC2 (laminina, gamma 2)	NM_005562	1-21	22-1111
LRP10 (proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 10)	NM_014045	1-16	17-440
LRRC15 (repetición rica en leucina que contiene 15)	NM_001135057	1-27	28-544
MUC1 (mucina 1)	NM_002456	1-22	23-167
SPINT2 (inhibidor de serina peptidasa, tipo Kunitz, 2)	NM_021102	1-27	28-198
SPON2 (esporadina 2)	NM_012445	1-26	27-331
SSR2 (receptor de secuencia señal, beta (proteína beta asociada a translocón))	NM_003145	1-17	18-146
SUSD2 (dominio de sushi que contiene 2)	NM_019601	1-27	28-785

*Las secuencias señal de cada proteína codificada se determinaron usando SignalP (32, 33) y no se incluyeron en las construcciones de expresión. †Los números de aminoácidos indican la porción codificada de las proteínas clonadas entre la secuencia señal de Ig y la porción Fc de IgG de conejo para generar las proteínas de fusión MAPcL-rFc secretadas.

Para la producción de HER-2 marcado con His, *HER-2* se amplificó a través de PCR usando los cebadores 5'-CCCAAGCTTGCAGCACCCAAGTGTGCACCGGCAC-3' (SEQ ID NO: 23) y 5'-GTGCTCGAGTCACGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGCTCG-3' (SEQ ID NO: 24). El producto se digirió con HindIII y XhoI y se clonó 5 direccionalmente en el vector de expresión pET-28a.

Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares 293T y SKBR3 en DMEM con FBS al 10 %. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con el 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada. Todas las líneas celulares se autenticaron y se ensayaron negativamente para micoplasma.

Producción de proteínas

15 Las proteínas de fusión MAPcL-rFc se produjeron en células 293T. Brevemente, las células 293T se transfectaron usando Effectene (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Durante la transfección, las células se cultivaron en DMEM con SFB al 2 %. Los sobrenadantes que contenían las proteínas de fusión secretadas se recogieron, se centrifugaron para limpiar los restos celulares y se suplementaron con azida sódica al 0,1 %. His-HER-2 se produjo en BL21 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó usando 20 cromatografía de afinidad IMAC.

ELISA sándwich

Se recubrieron placas de microtitulación (Nalge Nunc, Rochester, N.Y.) durante una noche con 2 µg/ml de Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.) diluido con una solución salina tamponada con fosfato. Los sobrenadantes que contenían las proteínas de fusión rFc se diluyeron 1:3 en serie en tampón de bloqueo estándar (albúmina sérica bovina al 0,5 % y azida sódica al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato). Las placas se lavaron una vez, y los sobrenadantes diluidos en serie se transfirieron a las placas de microtitulación. La IgG de conejo de concentración conocida se diluyó de forma similar y se añadió a una fila de la 30 placa de microtitulación con el fin de cuantificar la cantidad de proteína de fusión presente en el medio de cultivo. Después de incubar durante dos horas, las placas se lavaron dos veces y se diluyeron 50 µl de IgG de cabra anti-

conejo conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.) 1:3000 en tampón de bloqueo estándar con Tween 20 al 0,05 % añadido. Después de una incubación de 2 horas, las placas se lavaron 4 veces y se desarrollaron con 100 µl/pocillo de sustrato de TMB (Pierce, Rockford, IL). La reacción de desarrollo se detuvo después de cinco minutos con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N, y la absorbancia se midió a 450 nm para determinar la concentración. La absorbancia a 690 nm se sustrajo para eliminar la señal de fondo.

Reconocimiento de anticuerpos de proteína conformacional frente a la proteína HER-2 desnaturalizada

Para el ensayo HER-2 conformacional, se revistieron placas de microtitulación con 2 µg/ml de Fc anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.) en PBS durante una noche. Después, se añadió HER-2-ECD-rFc a cada pocillo, 100 µl/pocillo. Para HER-2 desnaturalizado, se recubrieron placas de microtitulación con 2 µg/ml de His-HER-2-ECD en PBS durante una noche.

Se usaron tres anticuerpos HER-2 en el ensayo: anti-HER-2 3F27 (US Biological, Swampscott, Mass.), anti-HER-2 3F32 (US Biological, Swampscott, Mass.) y Herceptina (Genentech, South San Francisco, Calif.). Cada anticuerpo se diluyó a 1 µg/ml en tampón de bloqueo estándar con Tween 20 al 0,05 %. A continuación, los anticuerpos se diluyeron en serie. Después de lavar una vez, se añadieron 50 µl/pocillo de los anticuerpos diluidos en serie a las placas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces, y se añadieron anticuerpos secundarios conjugados con HRP apropiados de la especie a una dilución 1:3000. Las placas se lavaron cuatro veces y se desarrollaron con 100 µl/pocillo de sustrato TMB durante cinco minutos. El desarrollo se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N. La absorbancia se midió a 450 nm, y la absorbancia de 690 nm se restó para tener en cuenta el fondo.

Se usaron los mismos anticuerpos para teñir HER-2 en células SKBR de BCa a través de citometría de flujo. Las células SKBR3 se separaron de la placa utilizando la Solución de Disociación Celular No enzimática 1 x (Sigma, St. Louis, Mo., catálogo N.º C5914). Se incubaron 2 x 10⁵ células con 0,5 µg/ml de cada anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron, y se añadió una dilución 1:200 de anticuerpo conjugado con PE para la especie apropiada. Las células se lavaron de nuevo, se resuspendieron en tampón FACS (PBS con albúmina de suero bovino al 5 % y azida sódica al 0,1 %) y se analizaron mediante citometría de flujo.

Competición de unión a herceptina

Se revistieron placas de microtitulación con 4 µg/ml de Fc anti-conejo de cabra y se incubaron durante una noche. Después de un lavado, se añadieron 100 µl/pocillo de HER-2-ECD-rFc a cada pocillo y se incubaron durante una noche. Las proteínas quiméricas HER-2-Fc y CD30-Fc (R & D Systems, Minneapolis, MN) se diluyeron en serie a partir de una concentración de partida de 10 µg/ml. Se añadió herceptina a una concentración final de 10 ng/ml en cada una de las diluciones de proteínas quiméricas en serie. Las placas se lavaron dos veces, y se aplicaron 50 µl/pocillo de mezcla de proteína quimérica/Herceptina a la placa. Después, las placas se lavaron tres veces, y se aplicó una dilución 1:3000 de IgG anti-humano de cabra HRP a cada pocillo, 50 µl/pocillo. Después de cuatro lavados, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato TMB a cada pocillo. El desarrollo se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N después de 5 minutos. La absorbancia se midió a 450 nm con una absorbancia de 690 nm restada.

Pacientes

Los criterios de inclusión para casos fueron mujeres mayores de 30 años que fueron diagnosticadas recientemente con BCa (cualquier tipo) en Sanford Health, Sioux Falls, S. Dak. A los pacientes se les pidió que proporcionaran un tubo adicional de EDTA de 10 ml de sangre antes de la mastectomía, tumorectomía, radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento. Los sujetos del caso se excluyeron solo si tenían antecedentes previos de cáncer de cualquier tipo. Los sujetos de control sanos tuvieron una mamografía negativa dentro de los seis meses anteriores a la extracción de sangre. Se excluyeron sujetos sanos si había antecedentes de cáncer previo de cualquier tipo o antecedentes de enfermedad autoinmune. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado por escrito, y el IRB de Sanford Health aprobó el protocolo de estudio. Se recogieron muestras de sangre de 200 pacientes con BCa de 10/08/09 a 17/07/12. Además, se recogieron 200 muestras de sangre control sanas de la misma edad del 16/10/09 al 19/01/11. Véase la Tabla 2 para conocer las características de los pacientes incluidos.

Tabla 2. Características clínicas y patológicas del paciente de los pacientes

Pacientes con cáncer de mama	N = 200
Edad: Media (DE)	58,9 (11,4)
Raza blanca: n (%)	193 (97 %)
IMC [kg/m ²]: Media (DE)	29,7 (6,6)
Hábito de fumar: n (%)	
Actual	22 (11 %)
Nueva	120 (60 %)
Pasado	58 (29 %)
Antecedentes familiares Sí: n (%)	114 (58 %)
Tipo de tumor: n (%)	
Invasivo	148 (74 %)
<i>in situ</i>	52 (26 %)
Histología: n (%)	
Ductal y Lobular	3 (2 %)
Ductal	173 (87 %)
Lobular	21 (11 %)
Otro	2 (1 %)
Positivo a ER: n (%)	171 (86 %)
Positivo a PR: n (%)	147 (74 %)
Amplificación de HER-2: n (%)	
Negativo	156 (78 %)
Positivo	33 (17 %)
Desconocido	11 (6 %)
Negativo triple Sí: n (%)	18 (12 %)
Dimensión máx. del tumor [cm]: n (%)	
≤1	66 (36 %)
>1 a ≤2	65 (35 %)
>2	53 (29 %)
Afectación de los nódulos linfáticos: n (%)	47 (24 %)
Controles de la misma edad con mamograma negativo	N = 200
Edad: Media (DE)	58,8 (11,3)
Raza blanca: n (%)	192 (97 %)
IMC [kg/m ²]: Media (DE)	27,1 (5,5)
Hábito de fumar: n (%)	
Actual	7 (4 %)
Nueva	125 (63 %)
Pasado	67 (34 %)

Recogida de suero

5

Se recogió sangre en un tubo EDTA de 10 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos. El plasma se eliminó del tubo, se separó en alícuotas y se almacenó a -80 grados Celsius hasta el cribado para determinar la presencia de autoanticuerpos.

10 ELISA de antígenos portadores de conformación

Se recubrieron placas de microtitulación (Nalge Nunc, Rochester, N.Y.) durante una noche con 4 µg/ml de Fc anti-conejo de cabra (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pa.) en una solución salina tamponada con fosfato. Las placas se lavaron una vez, y se añadieron 100 µl/pocillo de proteína de fusión MAPcL-rFc. Las placas se incubaron durante 2 horas y se lavaron dos veces. Las placas se recubrieron con 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo optimizado (solución salina tamponada con fosfato con albúmina de suero bovino al 0,5 %, leche en polvo al 0,2 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, L-glutamina 20 mM, L-arginina 20 mM, azida sódica al 0,1 %, suero de cabra al 10 % y Tween 20 al 0,05 %). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se lavaron una vez. Se añadieron muestras de suero diluidas 1:100 en tampón de bloqueo optimizado y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después, las placas se lavaron tres veces, y los autoanticuerpos se detectaron usando una IgG de cabra antihumana conjugada con HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pa.) diluida 1:3000 en tampón de bloqueo estándar con Tween 20 al 0,05 %. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron

cuatro veces y se desarrollaron con 100 µl/pocillo de sustrato TMB (Pierce, Rockford, IL) durante 15 minutos. El desarrollo se detuvo con 50 µl/pocillo de H_2SO_4 2 N, y se midió la absorbancia a 450 nm. La absorbancia a 690 nm se sustrajo para eliminar la señal de fondo. Cada placa de 96 pocillos incluyó 14 muestras de sujetos de BCa y 14 muestras de sujetos de mamografía normal. Cada muestra se ensayó por triplicado dentro de la misma placa. Una fila en cada placa se sometió solo a tampón de bloqueo como control negativo para el ELISA.

Métodos estadísticos

Los controles se emparejaron individualmente con 200 pacientes de BCa 1:1 dentro de una ventana de edad de 3 años usando un algoritmo voraz de comparación de calibrador (35) mientras se cegó a los datos del ensayo. Para cada sujeto, el nivel de antígeno se transformó restando la media del tampón de bloqueo de la media de las mediciones por triplicado. Si la diferencia fue menor de cero, se ajustó a cero, y se tomó la raíz cuadrada para obtener una distribución más simétrica.

Las diferencias en las respuestas demográficas y de autoanticuerpos entre los pacientes con BCa y los controles se ensayaron usando una prueba t de dos muestras y una prueba de Chi cuadrado para datos continuos y categóricos, respectivamente. La mejora creciente de la estadística c (es decir, índice de concordancia, área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC)) se ensayó añadiendo la respuesta de autoanticuerpo a cada antígeno a un modelo de regresión lógica que ya incluía edad, IMC, raza y actual hábito de fumar. La calibración del modelo se ensayó usando la medida de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow, que construye una estadística Chi-cuadrado comparando el número de casos predicho y observado por decil de probabilidad (36).

Después de evaluar los antígenos individuales, se usó un análisis de regresión logística condicional multivariable con estratos para el emparejamiento por edad para determinar el subconjunto de antígenos que minimizaban el criterio de información de Akaike (37); todos los modelos se ajustaron por IMC, raza y hábito de fumar actual. Se realizaron análisis de subgrupos exploratorios para determinar si el subconjunto multivariable de antígenos funcionaba de manera diferente en un tipo particular de BCa. El modelo multivariable se ensayó en los siguientes subgrupos: invasivo, *in situ*, positivo a ER, dimensión máxima del tumor >1 cm, afectación ganglionar, y positivo a HER-2. El nivel crítico alfa se ajustó a $\leq 0,05/20$ antígenos = 0,0025 usando la corrección de Bonferroni. Se utilizó el software SAS® (Cary, N.C.) versión 9.3 para todos los análisis.

Resultados

Generación de antígenos asociados a tumores diseñados para tener conformaciones nativas

Para identificar TAA que provocan una respuesta humoral en pacientes, se seleccionaron genes candidatos que codifican proteínas secretadas y de membrana a partir de los genes más abundantes representados en el MAPcL. Debido a que solo el 10 % de los epítomos en las proteínas están en una secuencia lineal continua (24), se usó un sistema de expresión eucariota para generar antígenos tumorales portadores de conformación que están plegados adecuadamente y contienen epítomos no continuos para su uso en la detección de autoanticuerpos. Las secuencias que codifican los dominios extracelulares (ECD) o las proteínas secretadas sin la secuencia señal de los genes MAPcL candidatos se clonaron 5' de la región Fc de IgG de conejo (rFc) en el vector pSecTag2-rFc o pFUSE-IgK-rFc, dependiendo de los sitios de clonación con enzimas de restricción. La secuencia líder de IgK contenida en los vectores dirige las proteínas de fusión a secretar. Los vectores que codificaban las proteínas de fusión se transfectoron transitoriamente en células 293T, y las proteínas de fusión correspondientes se secretaron en los medios. La producción de las proteínas de fusión secretadas se confirmó usando un ELISA tipo sándwich, y las concentraciones se determinaron por comparación con un estándar CD147-rFc establecido (datos no mostrados).

Para demostrar que las proteínas MAPcL-rFc generadas se diseñaron para plegarse en una conformación nativa, se realizó un análisis ELISA usando anticuerpos anti-HER-2 disponibles en el mercado generados contra proteína HER-2 nativa (anticuerpo monoclonal 3F32 y Herceptina) o desnaturalizada (anticuerpo monoclonal 3F27). Se analizaron dos antígenos que consistían en ECD de HER-2: la proteína HER-2-ECD-rFc portadora de conformación generada en células 293T y una proteína His-HER-2-ECD que se producía en bacterias y se purificaba sobre una columna de níquel. El anticuerpo anti-HER-2 nativo (3F32) reconoció la HER-2-ECD-rFc producida en 293T (Figura 1A), pero no pudo detectar la proteína His-HER-2-ECD purificada producida en bacterias (Figura 1B). Además, la Herceptina no pudo detectar la proteína His-HER-2-ECD desnaturalizada purificada a partir de bacterias (Figura 1B). Sin embargo, se observó una respuesta fuerte para Herceptina cuando se usó la proteína HER-2-ECD-rFc como el antígeno para el análisis ELISA (Figura 1A). Aunque el anticuerpo 3F27 generado contra HER-2 desnaturalizado no detectó la proteína HER-2-ECD-rFc (Figura 1A), este anticuerpo tuvo una respuesta fuerte a HER-2-ECD bacteriano (Figura

1B).

Para confirmar el reconocimiento específico de epítomos nativos frente a desnaturalizados por los anticuerpos adquiridos, se realizó citometría de flujo en células SKBR3 no fijadas, una línea celular BCa que se sabe que tiene
5 amplificación HER-2 (38). Debido a que HER-2 superficial retendría su confirmación nativa en las células SKBR3 no fijadas, el anticuerpo anti-HER-2 3F27, específico para HER-2 desnaturalizado, no pudo detectar HER-2 superficial en la membrana celular de las células SKBR3 mediante citometría de flujo (Figura 1C). Cuando el anticuerpo anti-HER-2 3F32 y Herceptina, ambos de los cuales reconocen HER-2 conformacional, se usaron para el análisis de
10 citometría de flujo, se observó un gran cambio en la fluorescencia que indicaba que los anticuerpos reconocían HER-2 presente en la membrana de las células SKBR3 (Figura 1C).

Se realizó un ensayo de competición de unión para verificar que el ELISA de antígeno portador de conformación reconocía específicamente el antígeno MAPcL. Los pocillos se recubrieron previamente con IgG anti-conejo seguido de HER-2-ECD-rFc. Las proteínas quiméricas purificadas HER-2-Fc y CD30-Fc adquiridas (R & D Systems) se
15 diluyeron en serie y se añadieron a una cantidad constante de Herceptina (10 ng/ml) en cada pocillo. Después de la adición del anticuerpo IgG antihumano secundario conjugado con HRP, se desarrollaron las reacciones. La unión de Herceptina a HER-2-ECD-rFc compitió mediante la adición de HER-2-Fc pero no de la proteína CD30-Fc (Figura 1D). Este resultado indica que Herceptina se une específicamente a la porción HER-2-ECD de la proteína de fusión portadora de conformación.

20 Cribado de pacientes para autoanticuerpos usando el ELISA de antígeno portador de conformación

Se generaron veinte antígenos de fusión MAPcL-rFc diseñados para contener su conformación nativa clonando las secuencias que codificaban ECD o las proteínas secretadas 5' de la secuencia rFc (véase la Tabla 1 para determinar
25 la identidad de los 20 antígenos). Los plásmidos de expresión se transfectaron individualmente en células 293T, y las proteínas de fusión MAPcL-rFc se secretaron en los medios. Las 20 proteínas de fusión se cuantificaron por análisis ELISA tipo sándwich (datos no mostrados). Para detectar autoanticuerpos en plasma recogido de pacientes, se desarrolló un ELISA de antígeno portador de conformación utilizando los antígenos MAPcL-rFc generados. Para inmovilizar las proteínas de fusión MAPcL-rFc, se usó IgG anti-conejo para recubrir previamente los pocillos de una
30 placa de 96 pocillos. Los medios de las células 293T transfectadas, que contienen las proteínas de fusión MAPcL-rFc generadas diseñadas para tener conformaciones nativas, se añadieron a los pocillos recubiertos previamente. Para reducir la variación de la placa y aumentar la repetibilidad del ensayo, se distribuyeron tres muestras replicadas usando el plasma de cada paciente individual a través de la placa de 96 pocillos. Después de la adición de un anticuerpo secundario IgG anti-humano conjugado con HRP, las placas se desarrollaron y la absorbancia de cada
35 pocillo se midió. Las 200 muestras de plasma recogidas de los pacientes recién diagnosticados con BCa y el plasma de 200 sujetos sanos de la misma edad se evaluaron para determinar la reactividad del autoanticuerpo contra los 20 antígenos usando el ELISA portador de la conformación.

Los 200 pacientes de BCa y 200 controles sanos tenían una edad media (DE) de 59 (11) años y el 97 % se
40 identificaron como raza blanca (Tabla 2). Los pacientes con cáncer tenían más sobrepeso (29,7 frente a 27,1 kg/m², p <0,0001) y tenían diferentes hábitos de fumar (p = 0,014), de tal forma que había una mayor prevalencia de fumadores actuales (11 % frente a 4 %) en los sujetos con cáncer en comparación con los sanos. Los 200 pacientes con BCa representaron la heterogeneidad de la enfermedad consistente en 74 % invasiva, 24 % de afectación ganglionar, 86 % positiva a ER, 17 % positiva a HER-2 y 12 % de BCa triple negativo (Tabla 2).
45 Analizando la lectura de absorbancia de las respuestas de autoanticuerpos contra los antígenos individuales, se determinó que había diferencias significativas ajustadas de Bonferroni entre pacientes con BCa y controles en respuestas de autoanticuerpos contra 12 TAA, es decir, ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, HER-2, IGFBP2, LAMC2, MUC1, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2 (Tabla 3). Se detectaron niveles más altos de estos autoanticuerpos en pacientes con BCa. En los modelos de regresión logística ajustados por edad, raza, IMC y actual hábito de fumar,
50 las respuestas de autoanticuerpos contra MUC1 (1,83), DKK1 (1,77) y GAL1 (1,75) (todas p <0,0001) tuvieron las mayores relaciones de probabilidad (OR), de tal forma un paciente tenía aproximadamente 1,8 veces más probabilidades de tener BCa por 1 DE de aumento en la respuesta de autoanticuerpos contra cualquiera de estos tres antígenos (Tabla 3). Las respuestas de autoanticuerpos contra seis de los doce antígenos (es decir, GAL1, DKK1, MUC1, ANGPTL4, EPHA2 e IGFBP2) también aumentaron el área bajo la curva ROC cuando cada uno de
55 ellos se añadió individualmente al modelo de regresión logística base ajustado por edad, IMC, raza y el actual hábito de fumar (todos p <0,05). Cinco de los seis modelos se calibraron bien entre los deciles de probabilidad (Hosmer-Lemeshow mínimo p = 0,13), pero el modelo que incluía IGFBP2 no se calibró (p = 0,016)..

Tabla 3. Mediciones de absorbancia de autoanticuerpos y su asociación con cáncer de mama

Autoanticuerpo	Mamografía normal (n = 200)	Cáncer de mama (n = 200)	Valor de P*	Relación de probabilidad†	95 % de IC	Aumento en la estadística c‡	Valor de p
CD320	0,15 (0,12)	0,16 (0,12)	0,62	1,10	0,90-1,35	0,000	0,96
EPHA2	0,13 (0,06)	0,16 (0,10)	0,0006	1,64	1,21-2,24	0,034	0,037
GFRA1	0,18 (0,06)	0,20 (0,08)	0,0081	1,28	1,03-1,59	0,013	0,32
IGFBP2	0,21 (0,12)	0,25 (0,13)	0,0006	1,39	1,10-1,75	0,030	0,050
CST2	0,17 (0,09)	0,20 (0,10)	0,0013	1,39	1,12-1,73	0,026	0,13
GAL1	0,17 (0,06)	0,20 (0,07)	<0,0001	1,75	1,37-2,23	0,051	0,021
HER-2	0,13 (0,04)	0,15 (0,06)	<0,0001	1,65	1,28-2,13	0,039	0,054
LAMC2	0,15 (0,05)	0,17 (0,08)	0,0007	1,47	1,16-1,88	0,025	0,13
ANGPTL4	0,18 (0,05)	0,20 (0,06)	0,0001	1,57	1,24-1,99	0,041	0,032
DKK1	0,18 (0,10)	0,24 (0,11)	<0,0001	1,77	1,40-2,24	0,060	0,0093
MUC1	0,14 (0,06)	0,18 (0,08)	<0,0001	1,83	1,41-2,37	0,055	0,012
SSR2	0,14 (0,07)	0,17 (0,08)	0,0007	1,53	1,23-1,92	0,029	0,14
LRP10	0,14 (0,05)	0,15 (0,07)	0,0098	1,35	1,09-1,68	0,011	0,47
LRRC15	0,11 (0,04)	0,12 (0,05)	0,30	1,09	0,89-1,34	0,001	0,82
SPINT2	0,15 (0,07)	0,18 (0,09)	0,0022	1,40	1,13-1,74	0,018	0,31
SPON2	0,14 (0,07)	0,17 (0,08)	<0,0001	1,65	1,31-2,07	0,042	0,052
CD147	0,10 (0,05)	0,12 (0,06)	0,0039	1,43	1,15-1,78	0,016	0,38
CDH3	0,10 (0,04)	0,12 (0,04)	0,0033	1,43	1,14-1,79	0,014	0,40
GRN	0,12 (0,06)	0,13 (0,07)	0,19	1,16	0,94-1,43	0,004	0,65
SUSD2	0,12 (0,04)	0,13 (0,05)	0,0085	1,36	1,10-1,70	0,013	0,38

Datos mostrados como media (DE) de $\sqrt{(O.D.-Fondo)}$; *Las diferencias entre los grupos se ensayaron usando pruebas t; el valor de p ajustado a Bonferroni significativo $<0,05/20 = 0,0025$ se muestra en negrita; † Relación de probabilidades (95 % de IC) para la prevalencia de cáncer de mama por 1 DE de aumento en autoanticuerpos se determinó mediante modelos de regresión logística ajustados por edad, raza, IMC y el actual hábito de fumar; ‡ Se determinó el cambio en el área bajo la curva ROC (es decir, la estadística c) cuando se añadió el autoanticuerpo a los modelos de regresión logística ajustados.

Para aumentar la capacidad predictiva del ELISA portador de conformación, la respuesta de autoanticuerpo contra un grupo de antígenos se determinó usando un análisis de regresión logística condicional que incorporaba el diseño de estudio de coincidencia de edad individual y el ajuste para IMC, raza y actual hábito de fumar. El grupo con el mejor ajuste del modelo (es decir, AIC mínimo) contenía las respuestas de autoanticuerpos contra los siguientes 7 antígenos: ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15 (Tabla 4). De estos 7, solamente las respuestas de autoanticuerpos contra ANGPTL4, DKK1, MUC1 y GAL1 mostraron individualmente un aumento significativo en el área bajo la curva ROC cuando se añadieron al modelo base (Tabla 3). En el modelo de regresión

logística completamente ajustado que incluye el grupo de antígenos, el actual hábito de fumar tuvo la mayor OR (95 % de IC) de OR de BCa prevalente = 7,88 (2,68-23,2); y el IMC también fue una OR del factor de riesgo significativo = 1,09 (1,04-1,13) por aumento de 1 kg/m² (Tabla 4). GAL1 tenía una OR de 6,73 (3,42-13,3), por lo que un paciente tenía casi 7 veces más probabilidades de tener BCa por 1 DE de aumento en la respuesta de autoanticuerpos contra GAL1. Las respuestas de autoanticuerpos contra GFRA1 (OR = 0,41), GRN (OR = 0,55) y LRRC15 (OR = 0,32) tuvieron asociaciones inversas con las probabilidades de BCa prevalente cuando se ajustaron para determinar las respuestas frente a los demás antígenos (Tabla 4). En conjunto, la respuesta de autoanticuerpos contra el grupo de 7 antígenos aumentó el área bajo la curva ROC de 0,64 a 0,82 (p < 0,0001) y tuvo las siguientes medidas de diagnóstico: sensibilidad (72,9 %), especificidad (76,0 %) y relación de probabilidad positiva (95 % de IC) 3,04 (2,34 a 3,94) (Figura 2). El modelo también se calibró a través de deciles de riesgo (Hosmer-Lemeshow, p = 0,13).

Tabla 4. Relaciones de probabilidad del modelo de regresión logística multivariable para cáncer de mama

Variable	Relación de probabilidad	95 %	IC
Edad (por 1 año)	1,00*	0,98	1,02
Raza blanca	0,70	0,19	2,68
IMC (por 1 kg/m ²)	1,09	1,04	1,13
Actual hábito de fumar	7,88	2,68	23,2
ANGPTL4 (por 1 DE)	1,71	1,16	2,50
DKK1 (por 1 DE)	1,87	1,28	2,73
GAL1 (por 1 DE)	6,73	3,42	13,3
GFRA1 (por 1 DE)	0,41	0,21	0,82
GRN (por 1 DE)	0,55	0,38	0,81
LRRC15 (por 1 DE)	0,32	0,19	0,55
MUC1 (por 1 DE)	1,67	1,16	2,41

*Debido a la correspondencia de edad 1:1 individual.

Debido a que BCa es una enfermedad heterogénea, es posible que la respuesta de autoanticuerpos contra una combinación de antígenos pueda categorizar un subtipo de BCa de manera diferente que analizando todos los subtipos de BCa como un todo. Las muestras de BCa se agruparon en subtipos individuales de BCa: invasivo, *in situ*, positivo a ER, implicación máxima del tumor >1 cm, afectación ganglionar y positivo a HER-2. La capacidad de discriminar casos de controles en cada subtipo se ensayó usando la reactividad de autoanticuerpos contra la combinación de 7 antígenos además de la edad, el IMC, la raza y el actual hábito de fumar (Figura 2). El modelo de combinación de 7 antígenos se realizó de manera similar en todos los subtipos de BCa; la estadística c fue de 0,81 a 0,85. De los subtipos de BCa, los tumores *in situ* tenían el mayor área bajo la curva ROC (0,8520, p < 0,0001) cuando se analizaron las respuestas de autoanticuerpos contra la combinación de 7 antígenos. El modelo no se calibró cuando se consideraron solo aquellos cánceres con afectación de ganglios linfáticos debido a cuatro BC inesperados con muy pocas probabilidades de modelo (Hosmer-Lemeshow p = 0,0036).

ANÁLISIS

La detección precoz de BCa permite a un médico tratar la fase inicial de la enfermedad antes de la metástasis, permitiendo de ese modo una mayor tasa de remisión o supervivencia a largo plazo para el paciente. La detección de la presencia de autoanticuerpos generados contra las proteínas tumorales en la sangre de los pacientes sería un método ideal para la detección de BCa. Sin embargo, es necesario identificar los antígenos tumorales antes de poder determinar las respuestas específicas de autoanticuerpos en pacientes. Se generó una biblioteca que codifica proteínas secretadas y de membrana que están altamente expresadas en BCa y pueden provocar una respuesta inmune.

Se ha demostrado que la conformación del antígeno altera la afinidad de unión al anticuerpo en este ensayo, y la detección de autoanticuerpos está limitada por la conformación del epítipo (Figura 1). Se usó un conjunto de muestras robusto para desarrollar el ELISA portador de conformación que consiste en 200 muestras de plasma recogidas de pacientes con BCa recién diagnosticados antes de la cirugía, la quimioterapia o el tratamiento con radiación. Además, se recolectó plasma de 200 sujetos emparejados por edad definidos por una mamografía normal confirmada en los seis meses anteriores (Tabla 2). Las 400 muestras de plasma se cribaron individualmente para determinar la respuesta de autoanticuerpos contra 20 TAA diseñados para contener su conformación nativa usando ELISA. Cuatro de los 20 TAA analizados en nuestro este han informado previamente que generan una respuesta de anticuerpos en pacientes con BCa: MUC1 (39, 40), HER-2 (41), IGF2BP2 (15) y GRN (42). La detección de autoanticuerpos contra 12 de los 20 antígenos fue estadísticamente significativa para discriminar entre muestras

normales y de cáncer (Tabla 3, negrita). Sin embargo, no observó una respuesta de autoanticuerpos significativa contra GRN en este ensayo. De los 12 antígenos significativos, 9 no se han asociado previamente con autoanticuerpos de BCa. Hasta donde se sabe, este es el primer informe de la detección de autoanticuerpos contra ANGPTL4, CST2, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPINT2, SPON2 y SSR2 en pacientes con BCa (Tabla 3).

5

Anteriormente se ha demostrado que el cribado del suero frente a un panel de antígenos para detectar autoanticuerpos en comparación con un solo antígeno aumenta la sensibilidad del ensayo (17). Este hallazgo es consistente con el hecho de que BCa es una enfermedad heterogénea (43), y el sistema inmune de cada paciente individual es distinto. Una combinación de siete TAA, que consistía en ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15, tenía la mayor capacidad de diagnóstico (Tabla 4). En comparación con los paneles de antígenos múltiples publicados previamente utilizados para detectar autoanticuerpos de BCa (17, 44-46), la combinación de estos siete TAA es única, y este estudio contiene la mayor población de pacientes de BCa y muestras sanas. Curiosamente, en la combinación de siete antígenos, cuatro de los antígenos tienen significación estadística individual (Tabla 3), pero tres de los antígenos, GFRA1, GRN y LRRC15, no fueron estadísticamente significativos por sí solos (Tabla 3). Sin embargo, GFRA1, GRN y LRRC15 se asociaron inversamente con BCa, lo que indica que cantidades menores de estos autoanticuerpos en un paciente, en combinación con niveles más altos de los autoanticuerpos directamente asociados, aumentaron la probabilidad de tener BCa (Tabla 4). Cuando los 7 antígenos se añadieron al conocimiento del hábito de fumar actual y el IMC, la sensibilidad y especificidad del ensayo fue del 72,9 % y del 76,0 %, respectivamente. El área bajo la curva ROC (95 % de IC) fue de 0,82 (0,77 a 0,85), y la relación de probabilidad positiva fue de 3,04 para el ELISA portador de la conformación. Debido a que BCa es una enfermedad heterogénea, los pacientes se agruparon en las características del tumor, incluyendo positivo a ER, positivo a HER-2, *in situ*, invasivo, tamaño del tumor y afectación de los ganglios linfáticos. La combinación de 7 antígenos se realizó bien para todos los grupos (Figura 2). Estos resultados sugieren que el ensayo tiene potencial aplicación clínica. Un marcador de recurrencia en suero para BCa que se usa actualmente en la clínica es el antígeno asociado a mucina CA27.29. El antígeno CA27.29 se detecta en la sangre de un paciente que usa un anticuerpo monoclonal que reconoce MUC1. Debido a la baja sensibilidad del marcador tumoral CA27.29, el ensayo se usa para el seguimiento de un paciente con recidiva de BCa (47). En comparación con el marcador tumoral CA27.29 tradicional, el ELISA portador de conformación descrito aquí muestra una gran promesa.

Actualmente, la mamografía es el método estándar para el cribado de BCa. Sin embargo, la maquinaria necesaria para realizar una mamografía es costosa, requiere personal médico especializado para la manipulación y es un reto para el transporte a áreas médicamente desatendidas. El desarrollo de una prueba de sangre para la detección precoz de BCa podría aumentar en gran medida el acceso a la detección. La extracción de sangre es un procedimiento común, y la sangre se puede enviar fácilmente a un laboratorio clínico para su análisis. Este estudio demuestra que una combinación de respuestas de autoanticuerpos contra antígenos diseñados para contener epítopos conformacionales es una estrategia prometedora para la detección de BCa. Los estudios futuros se centrarán en la identificación de antígenos adicionales para mejorar la sensibilidad y la especificidad del ensayo para su traslado a la clínica.

40 **Tabla 5. Subconjuntos de combinación de autoanticuerpos y su asociación con cáncer de mama**

Unidad	Conjuntos de autoanticuerpos	% de sensibilidad	% de especificidad	PLR	ROC AUC	Aumento en ROC AUC*
7	ANGPTL4 DKK1 GAL1 GFRA1 GRANULINA LRRC15 MUC1	72,9	76,0	3,04	0,818	0,181
6	ANGPTL4 DKK1 GAL1 GRANULINA LRRC15 MUC1	72,4	75,5	2,96	0,810	0,173
4	ANGPTL4 DKK1 GAL1 LRRC15	69,8	74,5	2,74	0,790	0,152
5	ANGPTL4 DKK1 GAL1 GFRA1 LRRC15	69,3	74,5	2,72	0,803	0,165
6	DKK1 GAL1 GFRA1 GRANULINA LRRC15 MUC1	70,4	74,0	2,71	0,809	0,172
6	ANGPTL4 DKK1 GAL1 GFRA1 GRANULINA LRRC15	70,9	73,5	2,68	0,812	0,175
5	DKK1 GAL1 GRANULINA LRRC15 MUC1	69,8	73,0	2,59	0,805	0,167

Unidad	Conjuntos de autoanticuerpos	% de sensibilidad	% de especificidad	PLR	ROC AUC	Aumento en ROC AUC*
5	DKK1 GAL1 GFRA1 GRANULINA LRRC15	68,3	73,5	2,58	0,799	0,162
5	DKK1 GAL1 GFRA1 LRRC15 MUC1	68,8	73,0	2,55	0,797	0,160
5	ANGPTL4 DKK1 GAL1 GRANULINA LRRC15	68,3	73,0	2,53	0,804	0,166
4	DKK1 GAL1 GFRA1 LRRC15	68,3	73,0	2,53	0,791	0,153
4	DKK1 GAL1 GRANULINA LRRC15	68,8	72,4	2,49	0,796	0,159
5	ANGPTL4 DKK1 GAL1 LRRC15 MUC1	69,8	71,4	2,44	0,794	0,157
3	DKK1 GAL1 LRRC15	66,8	72,4	2,42	0,784	0,147
4	ANGPTL4 GAL1 LRRC15 MUC1	66,8	72,4	2,42	0,784	0,147
4	GAL1 GFRA1 LRRC15 MUC1	68,3	71,4	2,39	0,788	0,151
3	GAL1 GFRA1 LRRC15	66,8	71,9	2,38	0,770	0,132
3	ANGPTL4 GAL1 LRRC15	71,6	69,8	2,37	0,774	0,137
4	DKK1 GAL1 LRRC15 MUC1	67,8	71,4	2,37	0,789	0,152
4	ANGPTL4 GAL1 GFRA1 LRRC15	68,8	70,9	2,36	0,793	0,156
3	GAL1 LRRC15 MUC1	67,3	71,4	2,35	0,778	0,141
5	ANGPTL4 GAL1 GFRA1 LRRC15 MUC1	68,8	69,9	2,29	0,798	0,161
3	ANGPTL4 GAL1 GFRA1	64,8	66,3	1,92	0,753	0,116
3	DKK1 GAL1 GFRA1	65,3	65,8	1,91	0,746	0,109
3	GAL1 GFRA1 MUC1	63,3	64,8	1,80	0,746	0,109

PLR = relación de probabilidad positiva, sensibilidad/(100 - especificidad); ROC = curva característica operativa del receptor; AUC = área debajo de la curva; *El cambio en el área bajo la curva ROC (es decir, estadística c) se determinó cuando el conjunto de autoanticuerpos se añadió a un modelo de regresión logística ajustado por edad, raza, IMC y actual hábito de fumar (todos los valores de $p < 0,0001$).

BIBLIOGRAFIA

1. National Cancer Institute at the National Institutes of Health 2012 [updated Jul. 24, 2012; cited 2013]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/mammograms>.
2. Breastcancer.org, Mammography: Benefits, Risks, What You Need to Know 2013. Available from: http://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/mammograms/benefits_risks.jsp.
3. American Cancer Society, Find Support & Treatment, Mammograms and Other Breast Imaging Procedures 2012. Available from: <http://www.cancer.org/Treatment/UnderstandingYourDiagnosis/ExamsandTestDescriptions/MammogramsandOtherBreastImagingProcedures/mammograms-and-other-breast-imaging-procedures-having-a-mammogram>.
4. Agnantis N J, Goussia A C, Stefanou D. Tumor markers. An update approach for their prognostic significance. Part I. In Vivo. 2003; 17(6):609-18. PubMed PMID: 14758728.
5. Arciero C, Somiari S B, Shriver C D, Brzeski H, Jordan R, Hu H, et al. Functional relationship and gene ontology classification of breast cancer biomarkers. Int J Biol Markers. 2003; 18(4):241-72. PubMed PMID: 14756541.
6. Bernoux A, de Cremoux P, Laine-Bidron C, Martin E C, Asselain B, Magdelenat H. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: pathological characteristics and clinical outcome. Institut Curie Breast Cancer Study Group. Breast Cancer Res Treat. 1998; 49(3):219-25. PubMed PMID: 9776505.
7. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick W J, Gusterson B, Mallon E, et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? Eur J Cancer. 2000; 36(2):170-6. PubMed PMID: 10741274.
8. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. Semin Oncol. 1999; 26(4 Suppl 12):71-7. PubMed PMID: 10482196.
9. Slamon D J, Clark G M, Wong S G, Levin W J, Ullrich A, McGuire W L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987; 235(4785):177-82. PubMed PMID: 3798106.

10. Slamon D J, Godolphin W, Jones L A, Holt J A, Wong S G, Keith D E, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244(4905):707-12. PubMed PMID: 2470152.
11. Kaklamani V. A genetic signature can predict prognosis and response to therapy in breast cancer: Oncotype DX. Expert review of molecular diagnostics. 2006; 6(6):803-9. Epub 2006/12/05. doi: 10.1586/14737159.6.6.803. PubMed PMID: 17140367.
12. Manjili M H, Najarian K, Wang X Y. Signatures of tumor-immune interactions as biomarkers for breast cancer prognosis. *Future Oncol*. 2012; 8(6):703-11. Epub 2012/07/07. doi: 10.2217/fon.12.57. PubMed PMID: 22764768.
13. Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2009; 58(10):1535-44. Epub 2009/06/30. doi: 10.1007/s00262-009-0733-4. PubMed PMID: 19562338; PubMed Central PMCID: PMC2782676.
14. Casiano C A, Mediavilla-Varela M, Tan E M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5(10):1745-59. Epub 2006/05/31. doi: R600010-MCP200 [pii] 10.1074/mcp.R600010-MCP200. PubMed PMID: 16733262.
15. Lu H, Goodell V, Disis M L. Humoral Immunity Directed against Tumor-Associated Antigens As Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Cancer. *J Proteome Res*. 2008; 7(4):1388-94. PubMed PMID: 18311901.
16. Desmetz C, Mange A, Maudelonde T, Solassol J. Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011; 15(10):2013-24. Epub 2011/06/10. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01355.x. PubMed PMID: 21651719.
17. Piura E, Piura B. Autoantibodies to tailor-made panels of tumor-associated antigens in breast carcinoma. *Journal of oncology*. 2011; 2011:982425. Epub 2011/03/23. doi: 10.1155/2011/982425. PubMed PMID: 21423545; PubMed Central PMCID: PMC3056218.
18. Piura E, Piura B. Autoantibodies to tumor-associated antigens in breast carcinoma. *Journal of oncology*. 2010; 2010:264926. Epub 2010/11/30. doi: 10.1155/2010/264926. PubMed PMID: 21113302; PubMed Central PMCID: PMC2989457.
19. Finn O J. Immune response as a biomarker for cancer detection and a lot more. *N Engl J Med*. 2005; 353(12):1288-90. PubMed PMID: 16177255.
20. Pavoni E, Pucci A, Vaccaro P, Monteriu G, Ceratti Ade P, Lugini A, et al. A study of the humoral immune response of breast cancer patients to a panel of human tumor antigens identified by phage display. *Cancer Detect Prev*. 2006; 30(3):248-56. PubMed PMID: 16876336.
21. Sioud M, Hansen M H. Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage-displayed cDNA libraries. *Eur J Immunol*. 2001; 31(3):716-25. PubMed PMID: 11241275.
22. Storr S J, Chakrabarti J, Barnes A, Murray A, Chapman C J, Robertson J F. Use of autoantibodies in breast cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6(8):1215-23. PubMed PMID: 16925487.
23. Tan E M, Shi F D. Relative paradigms between autoantibodies in lupus and autoantibodies in cancer. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134(2):169-77. PubMed PMID: 14616773.
24. Barlow D J, Edwards M S, Thornton J M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*. 1986; 322(6081):747-8. PubMed PMID: 2427953.
25. Laver W G, Air G M, Webster R G, Smith-Gill S J. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell*. 1990; 61(4):553-6. PubMed PMID: 1693095.
26. Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau A Y, et al. Self-assembling protein microarrays. *Science*. 2004; 305(5680):86-90. Epub 2004/07/03. doi: 10.1126/science.1097639 305/5680/86 [pii]. PubMed PMID: 15232106.
27. Ehrlich J R, Qin S, Liu B C. The 'reverse capture' autoantibody microarray: a native antigen-based platform for autoantibody profiling. *Nature protocols*. 2006; 1(1):452-60. Epub 2007/04/05. doi: 10.1038/nprot.2006.66. PubMed PMID: 17406268.
28. Tan H T, Low J, Lim S G, Chung M C. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *The FEBS journal*. 2009; 276(23):6880-904. Epub 2009/10/29. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07396.x. PubMed PMID: 19860826.
29. Egdal K A, Vincent J J, Strausberg R, Lee B, Pastan I. Discovery of the breast cancer gene BASE using a molecular approach to enrich for genes encoding membrane and secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(3):1099-104. PubMed PMID: 12538848.
30. Boyle J S, Koniaras C, Lew A M. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol*. 1997; 9(12):1897-906. PubMed PMID: 9466317.
31. Drew D R, Lightowlers M, Strugnell R A. Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen. *Vaccine*. 2000; 18(23):2522-32. PubMed PMID: 10775786.
32. Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 2004; 340(4):783-95. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028. PubMed PMID: 15223320.

33. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*. 1997; 10(1):1-6. PubMed PMID: 9051728.
34. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer E L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001; 305(3):567-80. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315. PubMed PMID: 11152613.
35. Bergstralh E J, Kosanke J L. Computerized matching of cases to controls. Rochester, Minn.: Mayo Clinic Department of Health Science Research, 1995.
36. Hosmer D W, Lemeshow S. Goodness of fit tests for the multiple logistic regression model. *Communications in Statistics—Theory and Methods*: Taylor & Francis Group; 1980. p. 1043-69.
37. Akaike H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: Kotz S, Johnson N L, editors. *Breakthroughs in Statistics*. Springer Series in Statistics: Springer New York; 1992. p. 610-24.
38. Neve R M, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner F L, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006; 10(6):515-27. Epub 2006/12/13. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008. PubMed PMID: 17157791; PubMed Central PMCID: PMC2730521.
39. Kotera Y, Fontenot J D, Pecher G, Metzgar R S, Finn O J. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res*. 1994; 54(11):2856-60. Epub 1994/06/01. PubMed PMID: 7514493.
40. von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch M M, Kenemans P, Verstraeten A A, Litvinov S V, van Kamp G J, et al. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(8):1325-31. Epub 1996/07/01. PubMed PMID: 8869094.
41. Disis M L, Pupa S M, Gralow J R, Dittadi R, Menard S, Cheever M A. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997; 15(11):3363-7. Epub 1997/11/18. PubMed PMID: 9363867.
42. Ladd J J, Chao T, Johnson M M, Qiu J, Chin A, Israel R, et al. Autoantibody signatures involving glycolysis and spliceosome proteins precede a diagnosis of breast cancer among postmenopausal women. *Cancer Res*. 2013; 73(5):1502-13. Epub 2012/12/28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2560. PubMed PMID: 23269276.
43. Perou C M, Sorlie T, Eisen M B, van de Rijn M, Jeffrey S S, Rees C A, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-52. Epub 2000/08/30. doi: 10.1038/35021093. PubMed PMID: 10963602.
44. Lacombe J, Mange A, Jarlier M, Bascoul-Mollevis C, Rouanet P, Lamy P J, et al. Identification and validation of new autoantibodies for the diagnosis of DCIS and node negative early-stage breast cancers. *Int J Cancer*. 2013; 132(5):1105-13. Epub 2012/08/14. doi: 10.1002/ijc.27766. PubMed PMID: 22886747.
45. Mange A, Lacombe J, Bascoul-Mollevis C, Jarlier M, Lamy P J, Rouanet P, et al. Serum autoantibody signature of ductal carcinoma in situ progression to invasive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(7):1992-2000. Epub 2012/02/11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2527. PubMed PMID: 22322670.
46. Ye H, Sun C, Ren P, Dai L, Peng B, Wang K, et al. Mini-array of multiple tumor-associated antigens (TAAs) in the immunodiagnosis of breast cancer. *Oncology letters*. 2013; 5(2):663-8. Epub 2013/02/20. doi: 10.3892/ol.2012.1062. PubMed PMID: 23420714; PubMed Central PMCID: PMC3573153.
47. Gion M, Mione R, Leon A E, Dittadi R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin Chem*. 1999; 45(5):630-7. Epub 1999/05/01. PubMed PMID: 10222349.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Sanford Health
Egland, Kristi
Evans, Rick
Pottala, James V.
- <120> Reactivos y métodos para la detección de cáncer de mama
- <130> 13-761-PCT
- <150> 61/954914
<151> 18-03-2014
- <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1

<211> 376
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 1

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

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

	<210> 2
	<211> 238
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Sintético
10	<400> 2

ES 2 671 473 T3

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

Gln Ala Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
 225 230 235

5
 <210> 3
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 3

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe
450 455 460

Ser Val Thr Leu Asp Asp Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln
465 470 475 480

Val Gln Ala Leu Thr Gln Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys Val His
485 490 495

Glu Phe Gln Thr Leu Ser Pro Glu Gly Ser Gly Asn Leu
500 505

<210> 4
<211> 1090
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 4

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Gly	Leu	Gln	Leu	Ala	Lys	Val	Arg	Ser	Gln	Glu	Asn	Ser	Tyr	Gln	Ser		
			660					665					670				
Arg	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Met	Thr	Val	Glu	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Gly		
		675					680					685					
Ser	Gln	Tyr	Gln	Asn	Arg	Val	Arg	Asp	Thr	His	Arg	Leu	Ile	Thr	Gln		
	690					695					700						
Met	Gln	Leu	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Asn	Thr	Asn		
705					710					715					720		
Ile	Pro	Ala	Ser	Asp	His	Tyr	Val	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Lys	Ser	Leu		
				725					730					735			
Ala	Gln	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu	Ala	Glu	Ser	His	Val	Glu	Ser	Ala	Ser		
			740					745					750				
Asn	Met	Glu	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Thr	Glu	Asp	Tyr	Ser	Lys	Gln	Ala		
		755					760					765					
Leu	Ser	Leu	Val	Arg	Lys	Ala	Leu	His	Glu	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Ser		
	770					775					780						
Gly	Ser	Pro	Asp	Gly	Ala	Val	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Glu	Lys	Leu	Glu		
785					790					795					800		
Lys	Thr	Lys	Ser	Leu	Ala	Gln	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ala	Thr	Gln	Ala		
				805					810					815			
Glu	Ile	Glu	Ala	Asp	Arg	Ser	Tyr	Gln	His	Ser	Leu	Arg	Leu	Leu	Asp		
			820					825					830				
Ser	Val	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Val	Ser	Asp	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Glu		
		835					840					845					
Glu	Ala	Lys	Arg	Ile	Lys	Gln	Lys	Ala	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Val		
	850					855					860						
Thr	Arg	His	Met	Asp	Glu	Phe	Lys	Arg	Thr	Gln	Lys	Asn	Leu	Gly	Asn		
865					870					875					880		
Trp	Lys	Glu	Glu	Ala	Gln	Gln	Leu	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Gly	Arg		
				885					890					895			
Glu	Lys	Ser	Asp	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Ser	Arg		

900	905	910
Ala Gln Glu Ala Leu Ser Met Gly Asn Ala Thr Phe Tyr Glu Val Glu		
915	920	925
Ser Ile Leu Lys Asn Leu Arg Glu Phe Asp Leu Gln Val Asp Asn Arg		
930	935	940
Lys Ala Glu Ala Glu Glu Ala Met Lys Arg Leu Ser Tyr Ile Ser Gln		
945	950	955
Lys Val Ser Asp Ala Ser Asp Lys Thr Gln Gln Ala Glu Arg Ala Leu		
965	970	975
Gly Ser Ala Ala Ala Asp Ala Gln Arg Ala Lys Asn Gly Ala Gly Glu		
980	985	990
Ala Leu Glu Ile Ser Ser Glu Ile Glu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn		
995	1000	1005
Leu Glu Ala Asn Val Thr Ala Asp Gly Ala Leu Ala Met Glu Lys		
1010	1015	1020
Gly Leu Ala Ser Leu Lys Ser Glu Met Arg Glu Val Glu Gly Glu		
1025	1030	1035
Leu Glu Arg Lys Glu Leu Glu Phe Asp Thr Asn Met Asp Ala Val		
1040	1045	1050
Gln Met Val Ile Thr Glu Ala Gln Lys Val Asp Thr Arg Ala Lys		
1055	1060	1065
Asn Ala Gly Val Thr Ile Gln Asp Thr Leu Asn Thr Leu Asp Gly		
1070	1075	1080
Leu Leu His Leu Met Gly Met		
1085	1090	

<210> 5
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 5

	Gln	Pro	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Ile	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Pro	Ala	Lys
5	1				5					10					15	

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

260

265

270

Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser
275 280 285

Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys
290 295 300

Val
305

<210> 6
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 6

ES 2 671 473 T3

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

His

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 7

ES 2 671 473 T3

Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu
1 5 10 15

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

Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys Asp
35 40 45

Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe Gln
50 55 60

Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn Leu
65 70 75 80

Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg Leu
85 90 95

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

Lys Cys Val Ala Phe Asp
115

<210> 8
<211> 441
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 8
Asp Arg Leu Asp Cys Val Lys Ala Ser Asp Gln Cys Leu Lys Glu Gln
1 5 10 15

Ser Cys Ser Thr Lys Tyr Arg Thr Leu Arg Gln Cys Val Ala Gly Lys
20 25 30

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

Arg Ser Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln Lys Ser Leu Tyr Asn Cys Arg

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala
305 310 315 320

Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val
325 330 335

Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys
340 345 350

Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu
355 360 365

Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser
370 375 380

Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly
385 390 395 400

Leu Gly Ala Ser Ser His Ile Thr Thr Lys Ser Met Ala Ala Pro Pro
405 410 415

Ser Cys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Val Leu Val Val Thr Ala Leu Ser
420 425 430

Thr Leu Leu Ser Leu Thr Glu Thr Ser
435 440

<210> 9
<211> 517
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 9

ES 2 671 473 T3

Tyr His Gly Cys Pro Ser Glu Cys Thr Cys Ser Arg Ala Ser Gln Val
1 5 10 15

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

Asn Ala Met Ser Leu Gln Ile Leu Asn Thr His Ile Thr Glu Leu Asn
35 40 45

Glu Ser Pro Phe Leu Asn Ile Ser Ala Leu Ile Ala Leu Arg Ile Glu
50 55 60

Lys Asn Glu Leu Ser Arg Ile Thr Pro Gly Ala Phe Arg Asn Leu Gly

ES 2 671 473 T3

65					70						75				80
Ser	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Pro
				85					90					95	
Ile	Gly	Leu	Phe	Gln	Gly	Leu	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser
			100					105					110		
Ser	Asn	Gln	Leu	Leu	Gln	Ile	Gln	Pro	Ala	His	Phe	Ser	Gln	Cys	Ser
		115					120					125			
Asn	Leu	Lys	Glu	Leu	Gln	Leu	His	Gly	Asn	His	Leu	Glu	Tyr	Ile	Pro
	130					135					140				
Asp	Gly	Ala	Phe	Asp	His	Leu	Val	Gly	Leu	Thr	Lys	Leu	Asn	Leu	Gly
145					150					155					160
Lys	Asn	Ser	Leu	Thr	His	Ile	Ser	Pro	Arg	Val	Phe	Gln	His	Leu	Gly
				165					170					175	
Asn	Leu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Tyr	Glu	Asn	Arg	Leu	Thr	Asp	Ile	Pro
		180						185					190		
Met	Gly	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Gln
		195					200					205			
Gln	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser	Pro	Gly	Leu	Phe	His	Asn	Asn	His
	210					215					220				
Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Tyr	Leu	Ser	Asn	Asn	His	Ile	Ser	Gln	Leu	Pro
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Met	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Asn	Arg	Leu	Thr	Leu	Phe
				245					250					255	
Gly	Asn	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Pro	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Met	Pro
			260					265					270		
Asn	Leu	Arg	Glu	Leu	Trp	Leu	Tyr	Asp	Asn	His	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro
		275					280					285			
Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Arg	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Ser
	290					295					300				
Arg	Asn	Gln	Ile	Ser	Phe	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Asn	Gly	Leu	Thr
305					310					315					320

ES 2 671 473 T3

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

<210> 10
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 10

Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu Asp

ES 2 671 473 T3

1		5		10		15											
Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Tyr	Ser	Cys	Cys	Arg	Pro	Leu	Leu	Asp	Lys	Trp		
			20					25					30				
Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Arg	His	Leu	Gly	Gly	Pro	Cys	Gln	Val	Asp	Ala		
		35					40					45					
His	Cys	Ser	Ala	Gly	His	Ser	Cys	Ile	Phe	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Ser		
	50					55					60						
Ser	Cys	Cys	Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Cys	Gly	Asp	Gly	His	His		
65					70				75						80		
Cys	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe	His	Cys	Ser	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	Phe		
				85					90					95			
Gln	Arg	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Gln	Cys	Pro	Asp	Ser		
			100					105					110				
Gln	Phe	Glu	Cys	Pro	Asp	Phe	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Met	Val	Asp	Gly		
		115					120					125					
Ser	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Ser	Cys	Cys	Glu	Asp	Arg		
	130					135					140						
Val	His	Cys	Cys	Pro	His	Gly	Ala	Phe	Cys	Asp	Leu	Val	His	Thr	Arg		
145					150					155					160		
Cys	Ile	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	Ala		
				165					170					175			
Gln	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Cys	Pro		
			180					185					190				
Asp	Ala	Arg	Ser	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Cys	Cys	Glu	Leu	Pro		
	195						200					205					
Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Asn	Ala	Thr	Cys	Cys	Ser		
	210					215					220						
Asp	His	Leu	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Leu	Ile	Gln		
225				230						235				240			
Ser	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Thr	Lys		
			245						250					255			

ES 2 671 473 T3

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

Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys Pro
515 520 525

Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro Ala
530 535 540

Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu Ala
545 550 555 560

Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
565 570 575

<210> 11
<211> 145
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 11

ES 2 671 473 T3

Ala Pro Lys Pro Ala Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser
1 5 10 15

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

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

Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe
50 55 60

Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys
65 70 75 80

Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu
85 90 95

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
100 105 110

Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
115 120 125

Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro
130 135 140

Gly
145

- 5 <210> 12
<211> 141
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Sintético
- <400> 12

ES 2 671 473 T3

Ala Ala Gly Thr Val Phe Thr Thr Val Glu Asp Leu Gly Ser Lys Ile
1 5 10 15

Leu Leu Thr Cys Ser Leu Asn Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His
20 25 30

Arg Trp Leu Lys Gly Gly Val Val Leu Lys Glu Asp Ala Leu Pro Gly
35 40 45

Gln Lys Thr Glu Phe Lys Val Asp Ser Asp Asp Gln Trp Gly Glu Tyr
50 55 60

Ser Cys Val Phe Leu Pro Glu Pro Met Gly Thr Ala Asn Ile Gln Leu
65 70 75 80

His Gly Pro Pro Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn
85 90 95

Glu Gly Glu Thr Ala Met Leu Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro
100 105 110

Val Thr Asp Trp Ala Trp Tyr Lys Ile Thr Asp Ser Glu Asp Lys Ala
115 120 125

Leu Met Asn Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val Ser Ser
130 135 140

<210> 13

<211> 184

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 13

Ala Gly Pro Ser Ser Gly Ser Cys Pro Pro Thr Lys Phe Gln Cys Arg
1 5 10 15

ES 2 671 473 T3

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

<210> 14
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 14

ES 2 671 473 T3

Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala
1 5 10 15

Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met
20 25 30

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe
 290 295 300

Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His
 305 310 315 320

Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro
 325 330 335

Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His
 340 345 350

Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr
 355 360 365

Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val
 370 375 380

Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr
 385 390 395 400

Ala Thr Ile Val Val His Val Glu Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe
 405 410 415

Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly
 420 425 430

Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln
 435 440 445

Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met
 450 455 460

Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu
 465 470 475 480

Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala
 485 490 495

Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu
 500 505 510

Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln
 515 520 525

Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr
 530 535 540

ES 2 671 473 T3

Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr
545 550 555 560

Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp
565 570 575

Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp
580 585 590

Val His Leu Ser Leu Ser Asp His Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val
595 600 605

Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys His Gly His Val Glu Thr Cys Pro
610 615 620

Gly Pro Trp Lys Gly Gly
625 630

<210> 15
<211> 630
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 15

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125

Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175

Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190

Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205

Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220

Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240

Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255

Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270

Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser
 275 280 285

Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp
 290 295 300

Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys
 305 310 315 320

Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 325 330 335

Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 340 345 350

Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 355 360 365

ES 2 671 473 T3

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn
 405 410 415
 Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
 435 440 445
 Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
 450 455 460
 Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp
 465 470 475 480
 Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly
 485 490 495
 His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe
 500 505 510
 Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu
 515 520 525
 Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu
 530 535 540
 Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp
 545 550 555 560
 Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala
 565 570 575
 Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp
 580 585 590
 Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 595 600 605
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln

	610	615	620
	Arg Ala Ser Pro Leu Thr		
	625	630	
5	<210> 16 <211> 289 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sintético <400> 16		

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Gln Glu Leu Asp Gln Val Leu Glu Arg Ile Ser Thr Met Arg Leu Pro
195 200 205

Asp Glu Arg Gly Pro Leu Glu His Leu Tyr Ser Leu His Ile Pro Asn
210 215 220

Cys Asp Lys His Gly Leu Tyr Asn Leu Lys Gln Cys Lys Met Ser Leu
225 230 235 240

Asn Gly Gln Arg Gly Glu Cys Trp Cys Val Asn Pro Asn Thr Gly Lys
245 250 255

Leu Ile Gln Gly Ala Pro Thr Ile Arg Gly Asp Pro Glu Cys His Leu
260 265 270

Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu Ala Arg Gly Val His Thr Gln Arg Met
275 280 285

Gln

<210> 17
<211> 424
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Thr	Ile	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Pro	Met	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Phe	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ser	Gln	Asp	Trp	Leu	Met	Cys	Leu	Gln	Glu	Glu	115	120	125	
Phe	Gln	Cys	Leu	Asn	His	Arg	Cys	Val	Ser	Ala	Val	Gln	Arg	Cys	Asp	130	135	140	
Gly	Val	Asp	Ala	Cys	Gly	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Gly	Cys	Ser	Ser	145	150	155	160
Asp	Pro	Phe	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Pro	Ser	Leu	Pro	Cys	165	170	175	
Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Gly	Val	Phe	Ser	Ser	Pro	Gly	Tyr	180	185	190	
Thr	His	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	His	Pro	Gln	Ser	Cys	His	Trp	Leu	Leu	195	200	205	
Asp	Pro	His	Asp	Gly	Arg	Arg	Leu	Ala	Val	Arg	Phe	Thr	Ala	Leu	Asp	210	215	220	
Leu	Gly	Phe	Gly	Asp	Ala	Val	His	Val	Tyr	Asp	Gly	Pro	Gly	Pro	Pro	225	230	235	240
Glu	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Lys	245	250	255	
Ala	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Ser	Gly	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Tyr	His	260	265	270	
Thr	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Gly	Arg	Gly	Phe	Asn	Ala	Thr	Tyr	His	Val	275	280	285	
Arg	Gly	Tyr	Cys	Leu	Pro	Trp	Asp	Arg	Pro	Cys	Gly	Leu	Gly	Ser	Gly	290	295	300	
Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Gly	Leu	Gly	Glu	Arg	Cys	Tyr	Ser	Glu	Ala	Gln	305	310	315	320
Arg	Cys	Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Cys	Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Asp	325	330	335	
Cys	Pro	Gly	Cys	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Pro	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	340	345	350	

Ser Gly Ala Thr Ala Cys Tyr Leu Pro Ala Asp Arg Cys Asn Tyr Gln
355 360 365

Thr Phe Cys Ala Asp Gly Ala Asp Glu Arg Arg Cys Arg His Cys Gln
370 375 380

Pro Gly Asn Phe Arg Cys Arg Asp Glu Lys Cys Val Tyr Glu Thr Trp
385 390 395 400

Val Cys Asp Gly Gln Pro Asp Cys Ala Asp Gly Ser Asp Glu Trp Asp
405 410 415

Cys Ser Tyr Val Leu Pro Arg Lys
420

5 <210> 18
<211> 171
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético
<400> 18

ES 2 671 473 T3

Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile His Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val
1 5 10 15

Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Asp Gly Asn Ser
35 40 45

Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys Cys Ala Thr Val
50 55 60

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

Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln Asp Ser Glu Asp His Ser
85 90 95

Ser Asp Met Phe Asn Tyr Glu Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr
100 105 110

Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg
115 120 125

Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn
130 135 140

Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Gln Gln
145 150 155 160

Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys Val
165 170

5 <210> 19
 <211> 758
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 19

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

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

ES 2 671 473 T3

Ser Thr Gly Thr Ala Thr Arg Val Ala His Gln Leu His Gln Arg Arg
675 680 685

Met Gln Ser Leu Gln Pro Val Val Ser Cys Gly Trp Leu Ala Pro Pro
690 695 700

Pro Asn Gly Gln Lys Glu Gly Asn Arg Tyr Leu Ala Gly Ser Thr Ile
705 710 715 720

Tyr Phe His Cys Asp Asn Gly Tyr Ser Leu Ala Gly Ala Glu Thr Ser
725 730 735

Thr Cys Gln Ala Asp Gly Thr Trp Ser Ser Pro Thr Pro Lys Cys Gln
740 745 750

Pro Gly Arg Ser Tyr Ala
755

<210> 20

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 20

ES 2 671 473 T3

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

5	<210> 21 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 21 ccggatatca gcaagcccac gtgccacc	29
20	<210> 22 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintético	
	<400> 22 aaggaaaaaa gcggccgctc atttaccgg agagcgggag	40
	<210> 23 <211> 34 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
5		
	<400> 23	
	cccaagcttg cagcacccaa gtgtgcaccg gcac	34
10		
	<210> 24	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15		
	<220>	
	<223> Sintético	
	<400> 24	
	gtgctcgagt cacgtcagag ggctggctct ctgctcg	37

REIVINDICACIONES

1. Una composición que consiste en entre 2 y 25 marcadores de detección de anticuerpos, en la que la composición incluye al menos dos proteínas, en la que las al menos dos proteínas comprenden (a) angiopoyetina tipo 4 (ANGPTL4) o un fragmento antigénico de la misma, y (b) al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en el inhibidor de la ruta de señalización WNT Dickkopf 1 (DKK1), receptor de de efrina de tipo A 2 (EPHA2), subunidad de laminina gamma 2 (LAMC2), espondina 2 (SPON2), subunidad del receptor de secuencia señal 2 (SSR2), Lectina, unión a galactosa, soluble 1 (GAL1), proteína de anclaje ligada a GPI (GFRA1), repetición rica en leucina que contiene 15 (LRRC15), CD147, CD320, cadherina 3 (CDH3), proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad 10 (LRP10), inhibidor de serina peptidasa Kunitz tipo 2 (SPINT2), dominio de sushi que contiene 2 (SUSD2), y cistatina SA (CST2), o fragmentos antigénicos de los mismos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición incluye ANGPTL4, o un fragmento antigénico de la misma, y al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en ANGPTL4, DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2, o fragmentos antigénicos de los mismos.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición incluye al menos 5 proteínas en el grupo citado, o fragmentos antigénicos de las mismas.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la composición comprende las siguientes proteínas, o fragmentos antigénicos de las mismas:
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1; o
 - ANGPTL4, GAL1, y GFRA1.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las proteínas comprenden ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15, o fragmentos antigénicos de los mismos.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las al menos dos proteínas, o fragmentos antigénicos de las mismas comprenden dominios extracelulares nativos y/o proteínas secretadas nativas o fragmentos antigénicos de las mismas.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las proteínas están marcadas de forma detectable y/o están inmovilizadas en una superficie.
8. Un método *ex vivo* para detectar cáncer de mama o recidiva de la enfermedad, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de fluido corporal de un sujeto con riesgo de cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama con ANGPTL4, o un fragmento antigénico de la misma, en el que la presencia de autoanticuerpos contra ANGPTL4 en la muestra de fluido corporal del sujeto se correlaciona con la probabilidad de que el sujeto tenga cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el método comprende además poner en contacto la muestra de fluido corporal con uno o más de DKK1, EPHA2, GAL1, LAMC2, SPON2, CST2, SPINT2 y SSR2, o fragmentos antigénicos de los mismos, en el que la presencia de autoanticuerpos contra la una o más proteínas adicionales o fragmentos antigénicos de las mismas se correlacionan con la probabilidad de que el sujeto tenga cáncer de mama o recidiva de cáncer de mama.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el método comprende poner en contacto la muestra de fluido corporal con 5 o más de las proteínas mencionadas.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el método comprende poner en contacto la muestra de fluido corporal con uno de los siguientes conjuntos de marcadores, o fragmentos antigénicos de los mismos:

- 5
- ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 - 10 ANGPTL4, DKK1, GAL1, GFRA1, GRANULINA, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, GRANULINA, y LRRC15;
 - ANGPTL4, DKK1, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, GAL1, LRRC15, y MUC1;
 - ANGPTL4, GAL1, y LRRC15;
 - 15 ANGPTL4, GAL1, GFRA1, y LRRC15;
 - ANGPTL4, GAL1, GFRA1, LRRC15, y MUC1; o
 - ANGPTL4, GAL1, y GFRA1.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que el método comprende poner en
20 contacto las muestras de fluido corporal con ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN y LRRC15, o fragmentos antigénicos de los mismos.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que el método comprende poner en
25 contacto la muestra de fluido corporal con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que la muestra de fluido corporal comprende una muestra de suero o una muestra de sangre del sujeto.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-14, en el que los métodos comprenden el uso
30 de cribado de ensayo longitudinal, en el que todos los biomarcadores diana pueden detectarse y cuantificarse en un único ensayo y dilución.

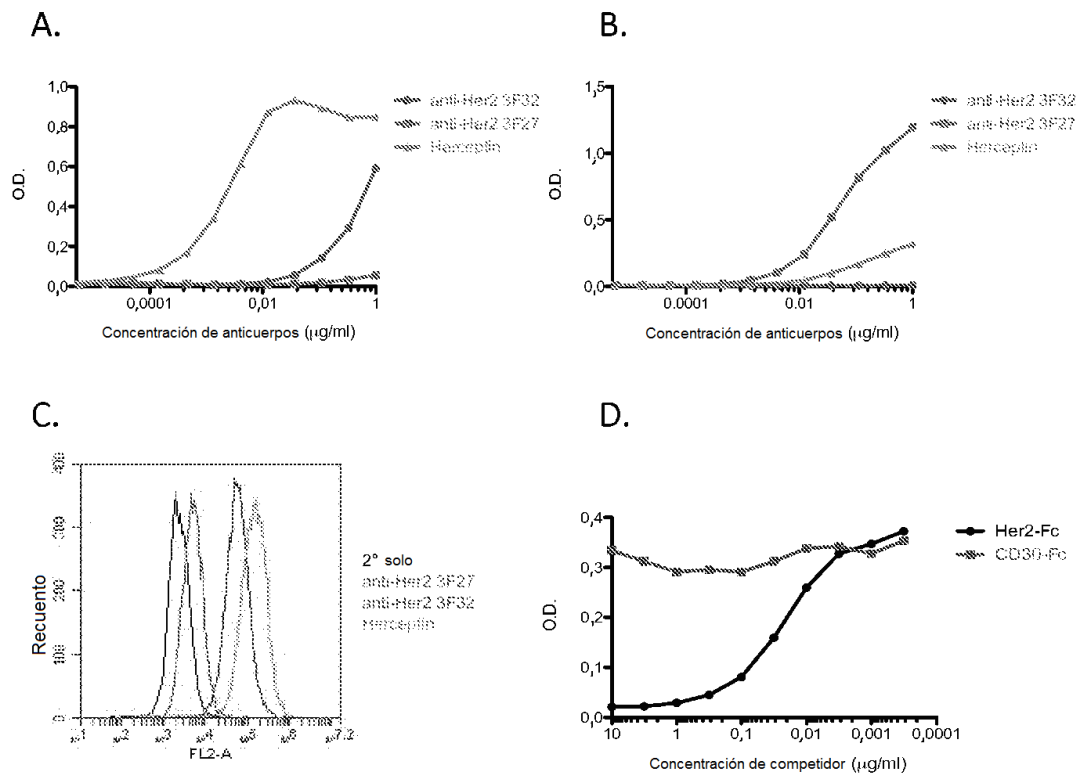


Figura 1

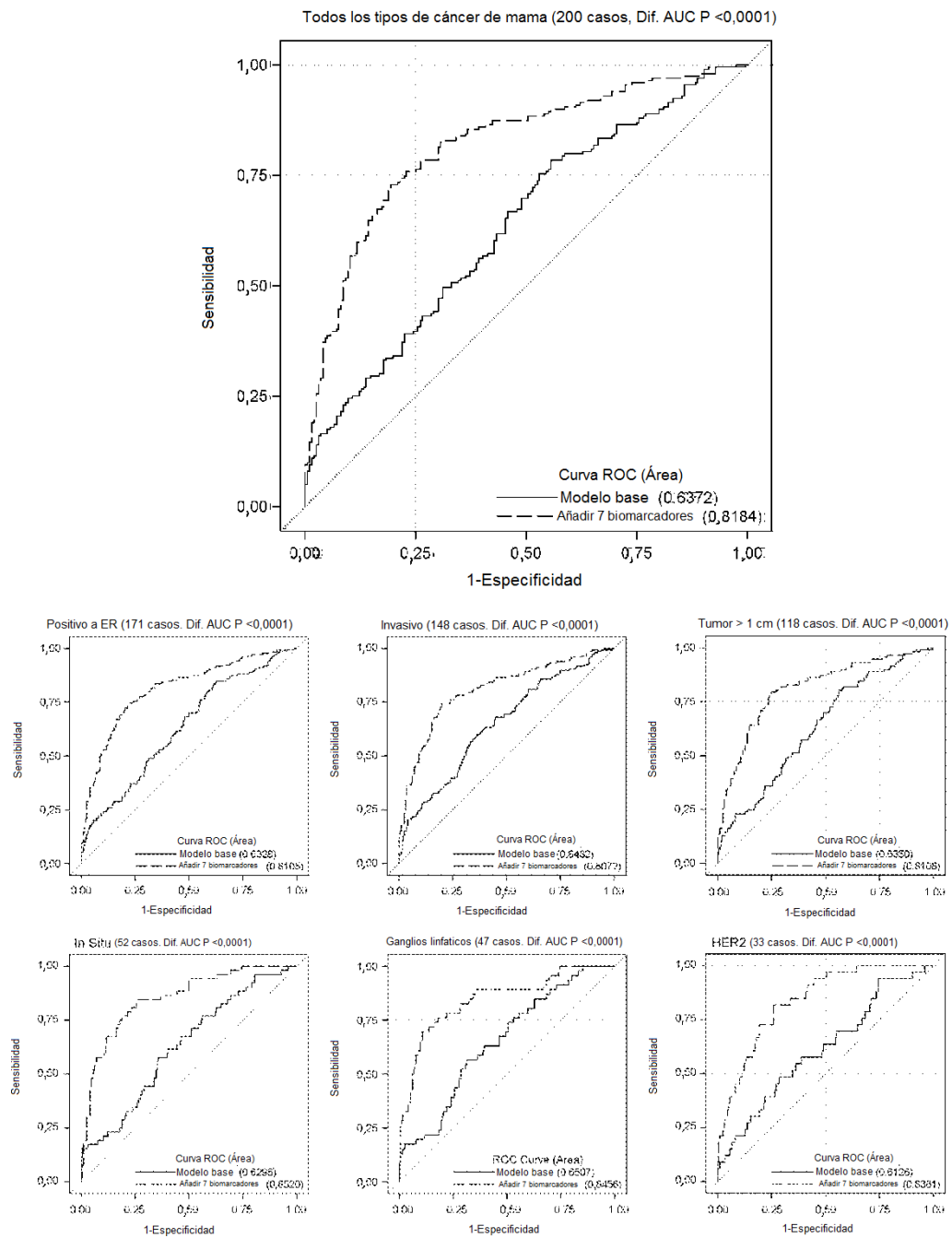


Figura 2