

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 839**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2010** E 15194007 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** EP 3012631

54 Título: **Un procedimiento para diagnosticar cirrosis biliar primaria (CBP) usando nuevos autoantígenos**

30 Prioridad:

05.10.2009 US 248768 P

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

17.09.2018

73 Titular/es:

**AMBERGEN INC. (50.0%)
313 Pleasant Street
Watertown, MA 02472, US y
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIM, MARK J.;
OSTENDORFF, HEATHER P.;
ROTHSCHILD, KENNETH J. y
BLOCH, DONALD B.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 681 839 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

Un procedimiento para diagnosticar cirrosis biliar primaria (CBP) usando nuevos autoantígenos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la biología molecular, a la bioquímica, biología celular, a la medicina y a los diagnósticos médicos. Específicamente, la invención se refiere a nuevas moléculas de ácido nucleico, proteínas y fragmentos de polipéptido codificados por las mismas, a anticuerpos policlonales y monoclonales para los mismos y a procedimientos para usar las moléculas de ácido nucleico, proteínas/polipéptidos y anticuerpos en el diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos para el control de trastornos autoinmunes, enfermedades víricas y cánceres.

Antecedentes de la invención

10 Se han descrito más de 80 enfermedades que están asociadas con la activación de linfocitos autorreactivos y la producción de autoanticuerpos dirigidos contra el tejido normal o los componentes celulares (autoantígenos) [von Muhlen y Tan (1995) Semin Arthritis Rheum 24: 323-58; Mellors (2002) 2005]. Denominadas en conjunto enfermedades autoinmunes, se estima que afectan a 14,7-23,5 millones de personas, hasta el 8 % de la población total de los EE.UU. y constituyen una importante carga económica y sanitaria [Jacobson, Gange, Rose y Graham (1997) Clin Immunol Immunopathol 84: 223-43]. Por razones desconocidas, el número de personas afectadas por enfermedades autoinmunes va en aumento. Un diagnóstico de enfermedad autoinmune significa una vida de enfermedad y tratamiento, el posible daño al órgano, el debilitamiento y una mayor probabilidad de muerte. La naturaleza crónica y debilitante de las enfermedades autoinmunes dan como resultado una mala salud del paciente, un aumento en costes médicos y una productividad reducida. Las causas de la disfunción inmune que sustenta la enfermedad autoinmune aún no se entienden muy bien. Por consiguiente, las enfermedades autoinmunes generalmente siguen siendo difíciles de diagnosticar, debido a la amplia variabilidad de la presentación clínica, que típicamente implica una constelación de síntomas.

25 Las enfermedades autoinmunes son trastornos en los que el sistema inmunológico de un individuo se dirige y destruye tejido aparentemente normal. Los ejemplos de las enfermedades autoinmunes incluyen artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia (SCL), síndrome de Sjogren (SSj), polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), pénfigo vulgar (PV) y cirrosis biliar primaria (CBP). Los autoanticuerpos se dirigen comúnmente contra las proteínas y los ácidos nucleicos celulares. En determinadas enfermedades, tales como PV, se conoce la diana de los autoanticuerpos y se cree que el autoanticuerpo desempeña un papel en la patogénesis de la enfermedad. En otras enfermedades, tales como LES, se han identificado las dianas de muchos autoanticuerpos diferentes pero el papel de los autoanticuerpos en la patogénesis de LES todavía se desconoce.

35 La detección de los anticuerpos en el suero de los pacientes ayuda al diagnóstico de enfermedades autoinmunes. El factor reumatoide (anticuerpos IgM dirigidos contra la IgG humana) se detecta en la mayoría de los pacientes con AR y apoya ese diagnóstico en un individuo dado [Kelly, W.N., y col. 1985. Textbook of Rheumatology. 2ª ed. Saunders. pp. 667]. Los anticuerpos antinucleares (AAN) están presentes en aproximadamente el 98 % de los individuos con LES activa. Aunque los AAN no son específicos para el diagnóstico de LES, la ausencia de estos anticuerpos contradice el diagnóstico de LES en un paciente dado [Kelly y col., 1985, citado anteriormente, pp. 691].

40 Las hepatopatías y las enfermedades biliares en conjunto se clasifican dentro de las diez principales causas de mortalidad en los Estados Unidos. Las hepatopatías crónicas afectan entre el 5 y el 10 por ciento de los americanos y provocan del 1 al 2 por ciento de muertes en los Estados Unidos. La hepatopatía crónica y la cirrosis cuestan aproximadamente 1.370 millones de euros al año [(2004)]. -Las causas generales de las hepatopatías y de las enfermedades biliares incluyen agentes infecciosos, defectos heredados, alteraciones metabólicas, alcohol, toxinas y tóxicos ambientales. Las hepatopatías más comunes son hepatitis C crónica, hepatopatía inducida por alcohol, enfermedad del hígado graso no alcohólico, hepatitis B crónica, enfermedades autoinmunes del hígado y hepatopatías inducidas por fármacos. Mucghas de estas afecciones se pueden prevenir o tratar, pero si no, pueden llevar a una lesión hepática progresiva, a fibrosis hepática y, en última instancia, a cirrosis, hipertensión portal, hepatopatía en etapa terminal y, en algunos casos, cáncer de hígado. En la actualidad, la única terapia para la hepatopatía en etapa terminal es el trasplante de hígado. Cada año se hacen más de 5.000 trasplantes de hígado en los Estados Unidos. Al menos 17.000 personas están en una lista de espera para el trasplante de hígado y hasta 1.500 mueren al año mientras esperan [(2004)]. La investigación de la hepatopatía presenta muchas necesidades desafiantes. Las hepatopatías autoinmunes incluyen la cirrosis biliar primaria (CBP), hepatitis autoinmune y colangitis esclerosante primaria. Todas estas hepatopatías crónicas pueden llevar a una hepatopatía en etapa terminal. En conjunto, las hepatopatías autoinmunes del hígado son responsables del 13 % de los trasplantes de hígado en adultos al año en los Estados Unidos [(2004)].

55 La CBP es una enfermedad hepática colestásica progresiva, con una prevalencia estimada en los Estados Unidos de aproximadamente 40 adultos por población de 100.000 (incidencia de 2,7 por una población de Estados Unidos de 100.000) [Kim, Lindor y col. (2000) Gastroenterology 119: 1631-6; Feld y Heathcote (2003) J Gastroenterol

Hepatol 18: 1118-28; 2004)]. Las mujeres entre las edades de 40 y 65 se ven predominantemente afectadas por la CBP, con una proporción de mujeres frente a hombres de 9:1 [Kaplan y Gershwin (2005) N Engl J Med 353: 1261-73], como es típico para la enfermedad autoinmune. La CBP se caracteriza por la destrucción progresiva gradual de los conductillos biliares intrahepáticos que lleva a la fibrosis hepática y a una insuficiencia hepática (revisado en [Kaplan (1996) N Engl J Med 335: 1570-80; Heathcote (2000) Hepatology 31: 1005-13; Kaplan (2002) Gastroenterology 123: 1392-4; Talwalkar y Lindor (2003) Lancet 362: 53-61]). La CBP es un indicio significativo para el trasplante de hígado, y los pacientes de CBP constituyen el 11 % de todos los pacientes que se someten a trasplante de hígado por cirrosis [Milkiewicz (2008) Clin Liver Dis 12: 461-72; xi].

El tratamiento de CBP se realiza con ácido ursodesoxicólico (ursodiol), un ácido biliar natural que no es tóxico para el hígado, para reemplazar los ácidos biliares que se reducen por la CBP. Aunque no se comprenden por completo los mecanismos, este tratamiento reduce en última instancia la acumulación de otros ácidos biliares tóxicos para el hígado (que se causó por la destrucción del conducto biliar). Aunque el ursodiol reduce la progresión hacia la cirrosis, el tratamiento con ursodiol funciona mejor cuando se implementa temprano en el transcurso de la CBP, destacando la importancia de una prueba de diagnóstico de CBP rápida y fiable. De hecho, un estudio demostró que el tratamiento con ursodiol en las etapas III y IV no dio como resultado una ralentización significativa de la progresión hepática mientras que en los pacientes tratados de forma temprana en las etapas histológicas I y II mostraron una ralentización significativa de la destrucción hepática con el tratamiento con ursodiol. Esto destaca la necesidad de un diagnóstico temprano de CBP, para permitir un tratamiento médico rápido [Heathcote (2000) Hepatology 31: 1 005-13; Poupon, Lindor, Pares, Chazouilleres, Poupon y Heathcote (2003) J Hepatol 39: 12-6].

Aproximadamente la mitad de los pacientes de CBP presentan un análisis de sangre anómalo que desencadena el diagnóstico eventual de CBP. Generalmente, el ensayo de diagnóstico se activa inicialmente por los análisis anómalos de la función hepática y los síntomas de enfermedad biliar, seguido por el análisis de autoanticuerpos antimitocondriales (AAM) séricos, para los que aproximadamente un 87-95 % de los pacientes de CBP resultan positivos [Heathcote (2000) Hepatology 31: 1 005-13; Yang, Yu, Nakajima, Neuberg, Lindor y Bloch (2004) Clin Gastroenterol Hepatol 2: 1116-22; Kaplan y Gershwin (2005) N Engl J Med 353: 1261-73; Liu, Shi, Zhang, Zhang y Gao (2008) Liver Int 28:233-9]. Los análisis de imágenes del conducto biliar se usan para descartar otras causas de la enfermedad del tracto biliar, y las biopsias del hígado confirman el diagnóstico y proporcionan un indicador de la etapa de la enfermedad (basándose en el grado de fibrosis).

Sin embargo, aproximadamente la otra mitad de los pacientes de CBP presentarán solo una variedad de síntomas físicos relativamente no específicos, destacando las dificultades a las que se enfrenta el médico general o especialista responsable del diagnóstico. Los síntomas más comunes son prurito, cansancio y dolor musculoesquelético [Prince, Chetwynd, Newman, Metcalf y James (2002) Gastroenterology 123: 1044-51]. Además, se pueden encontrar numerosos trastornos autoinmunes en asociación con la CBP, que incluyen la hepatitis autoinmune (HAI) [Czaja (2006) J Hepatol 44: 251-2], disfunción tiroidea, síntomas de síndrome seco, síndrome de Raynaud, lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide [Heathcote (2000) Hepatology 31: 1005-13; Gershwin, Selmi, Worman, Gold, Watnik, Utts, Lindor, Kaplan y Vierling (2005) Hepatology 42: 1194-202]. En un estudio, se descubrió que el 19 % de los pacientes de CBP tenían características de otra enfermedad [Czaja (1998) Hepatology 28: 360-5], dificultando de este modo el diagnóstico. Es preocupante que las pruebas adecuadas no se puedan solicitar en muchos pacientes debido a una etiología no reconocida, especialmente cuando los pacientes presentan síntomas vagos de prurito o malestar en las articulaciones.

Los autoanticuerpos tienen la capacidad de servir no solo como herramientas de diagnóstico, sino también como precursores del futuro desarrollo de la CBP. De hecho, los autoanticuerpos antimitocondriales (AAM) han demostrado que son anteriores a las manifestaciones clínicas y al diagnóstico de CBP [Metcalf, Mitchison, Palmer, Jones, Bassendine y James (1996) Lancet 348: 1399-402]. Esto demuestra que puede ser posible diagnosticar CBP en una etapa temprana usando biomarcadores de autoanticuerpos. El sello distintivo serológico de la CBP son los AAM, que se pueden detectar en el 87-95 % de los pacientes [Kaplan (1996) N Engl J Med 335: 1570-80; Nishio, Keeffe y Gershwin (2002) Semin Liver Dis 22: 291-302.]. Los principales autoantígenos direccionados por estos AAM incluyen las subunidades E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC-E2); el complejo 2-oxo-ácido deshidrogenasa ramificado/en cadena (BCOADC-E2) y el complejo 2-oxo-glutarato deshidrogenasa (OGDC-E2) [Fussey, Guest, James, Bassendine y Yeaman (1988) Proc Natl Acad Sci U S A 85: 8654-8; Nishio, Keeffe y col. (2002) Semin Liver Dis 22: 291-302].

Los autoanticuerpos antinucleares (AAN) están presentes en el 50 % de los pacientes de CBP. Los autoanticuerpos que reconocen proteínas del complejo de la parte central del núcleo y múltiples puntos nucleares (MND, del inglés *multiple nuclear dots*) son marcadores útiles de CBP en pacientes negativos en AAM, con una prevalencia del 13-44 % [Manuel Lucena, Montes Cano, Luis Caro, Respaldiza, Alvarez, Sanchez-Roman, Nunez-Roldan y Wichmann (2007) Ann N Y Acad Sci 1109: 203-11]. Además, los AAN pueden servir como indicadores de pronóstico, estando los autoanticuerpos anticentrómeros y/o antiglicoproteína 210 del poro nuclear (gp210) asociados con la insuficiencia hepática en la CBP [Yang, Yu y col. (2004) Clin Gastroenterol Hepatol 2: 1116-22; Nakamura, Kondo y col. (2007) Hepatology 45: 118-27].

El cuerpo nuclear (CN, también conocido como dominio nuclear 10, el dominio oncogénico PML y el cuerpo Kr) es un orgánulo nuclear cuya función se desconoce [Ascoli, C. A. y Maul, G. G., J. Cell. Biol. 112:785-795 (1991);

Brasch, K. y Ochs, R. L., *Exp. Cell Res.* 202:211-223 (1992); Dyck, J. A. y col., *Cell* 76:333-343 (1994)]. Usando la tinción inmunohistoquímica, los CN aparecen como 5 a 30 regiones discretas, punteadas y en forma de puntos dentro del núcleo. El CN es distinto de otros dominios nucleares, incluyendo los implicados en la replicación del ADN y el procesamiento del ARNm. Además, los componentes del CN no se colocan con los cinetocoros o los centrómeros [Brasch, K. y Ochs, R. L., *Exp. Cell Res.* 202:211-223 (1992)]. El número de CN en la célula y la intensidad de tinción de anticuerpos de estas estructuras, aumentan en respuesta a los estímulos que incluyen los interferones (IFN), el choque térmico y la infección vírica [Ascoli, C. A. y Maul, G. G., *J. Cell. Biol.* 112:785-795 (1991)].

El CN es una diana de los autoanticuerpos en el suero de los pacientes con la enfermedad autoinmune de cirrosis biliar primaria (CBP). Aproximadamente el 40 % de los pacientes con CBP tienen anticuerpos dirigidos contra esta estructura [Evans, J., y col., *Arthr. Rheum.* 347:31-736 (1991); Szostecki, C. y col., *Scand. J. Immunol.* 36:555-564 (1992)]. Se usó el suero de pacientes con CBP para identificar y caracterizar un componente de 100 kDa del CN que se denominó Sp100 (de *Speckled*, moteado, 100 kDa) [Szostecki, C. y col., *J. Immunol.* 145:4338-4347 (1990)]. Se ha demostrado que la fusión de Sp100 al dominio de unión de ADN Lexa activa la transcripción génica en *Saccharomyces cerevisiae*, y se ha sugerido que Sp100 podría participar en la activación de la transcripción de regiones específicas en el genoma [Xie, K. y col., *Mol. Cell. Biol.* 13:6170-6179 (1993)].

Un segundo componente del CN, denominado NDP52, se caracterizó usando un anticuerpo monoclonal de murino que reaccionó con el CN [Koriath, F., y col., *J. Cell Biol.* 130:1-13 (1995)]. Se identificó un ADNc que codifica NDP52 y la secuencia de aminoácidos predicha que contenía motivos de superhélice, cremallera de leucina y dedos de zinc. Uno o más de estos dominios pueden estar implicados en las interacciones entre NDP52 y otros componentes del CN [Koriath, F., y col., *J. Cell. Biol.*; 130:1-13 (1995)].

Un tercer componente del CN, PML, fue identificado por varios investigadores que estudiaban la traslocación t(15;17) asociada a la leucemia promielocítica aguda (LPA) humana [de The, H. y col., *Nature (London)* 347:558-561 (1990); Borrow, J. y col., *Science* 249:1577-1580 (1990); Longo, L. y col., *J. Exp. Med.* 172:1571-1575 (1990); Kakizuka, A. y col., *Cell* 66:663-674 (1991)]. En esta traslocación, la parte de amino terminal de PML se fusiona con el receptor alfa del ácido retinoico. Se descubrió que PML se colocaliza con Sp100 en el CN [weis, K. y col., *Cell* 76:345-356 (1994); Koken, M. H. M. y col., *EMBO* 13:1073-1083 (1994)]. La expresión de la proteína de fusión alfa PML en células de LPA parece alterar al CN; en estas células, se detectan antígenos de CN en numerosas regiones más pequeñas en el núcleo descritas como "micromanchas". El tratamiento de las células de LPA con ácido retinoico (AR) da como resultado la diferenciación de células precursoras mieloides y la reformación de los CN [Dyck, J. A. y col., *Cell* 76:333-343 (1994); Weis, K. y col., *Cell* 76:345-356 (1994); Koken, M. H. M. y col., *EMBO* 13:1073-1083 (1994)]. En pacientes con LPA, el tratamiento con AR da como resultado la diferenciación de células leucémicas y una remisión temporal de la enfermedad [Warrell, R. P. y col., *N. Eng. J. Med.* 329:177-189 (1993)].

Sin embargo, es importante tener en cuenta, que los AAN también se encuentran en una variedad de otros trastornos autoinmunes predominantes y un amplio rango de cánceres [Bei, Masuelli, Palumbo, Modesti y Modesti (2008) *Cancer Lett.*].

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo en fase sólida son los dos formatos usados para establecer la presencia o ausencia de autoanticuerpos en pacientes. Ambos procedimientos tienen sus pros y sus contras tal como se trata a continuación:

Durante las últimas décadas, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha sido el procedimiento de elección por los médicos para la detección de autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes autoinmunes. Cabe destacar que, sigue siendo el estándar de oro para los ensayos de AAM y AAN, incluyendo para CBP. Normalmente, el suero del paciente se diluye de forma seriada en aumentos de dos veces y se permite la unión a un sustrato celular en un portaobjetos de microscopio (por ejemplo, células hepáticas HEp-2), que después se tiñen de forma fluorescente para detectar autoanticuerpos y se examinan en el microscopio por un técnico especializado para identificar los patrones de tinción celular/tisular. La IFI tiene la ventaja de que, como sustrato basado en células/tejidos, en teoría puede abarcar "forma universal" todos los autoantígenos celulares (a la espera de su expresión y preservación en el sustrato). Esto, en parte, se evidencia mediante la sensibilidad de diagnóstico del ensayo IFI, por ejemplo, el 93 % (AAN) para el lupus eritematoso sistémico (LES) [Solomon, Kavanaugh y Schur (2002) *Arthritis Rheum* 47: 434-44] y el 90 % (AAM) para CBP [Tanaka, Miyakawa, Luketic, Kaplan, Storch y Gershwin (2002) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48: 295-9].

Aunque el AAM basado en IFI es un marcador sensible para la CBP, la compensación puede ser la especificidad. Los pacientes asintomáticos se han considerado positivos en AAM, y aunque una gran parte solo desarrolla síntomas años más tarde, algunos nunca desarrollan síntomas [Metcalfe, Mitchison y col. (1996) *Lancet* 348: 1399-402]. Además, un estudio descubrió que el 34 % de los pacientes de HAI salieron positivos para AAM [Nezu, Tanaka, Yasui, Imamura, Nakajima, Ishida y Takahashi (2006) *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1448-54].

Además, el ensayo de IFI es problemático en general cuando se usa como una herramienta de detección de diagnóstico habitual, ya que es difícil de estandarizar debido a las variaciones en el sustrato y el proceso de fijación, variaciones en el aparato de microscopía y debido a la interpretación de los resultados altamente subjetiva

[Jaskowski, Schroder, Martins, Mouritsen, Litwin y Hill (1996) *Am J Clin Pathol* 105: 468-73]. La declaración de consenso en 2004 del Comité para la Serología Autoinmune del Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune (IAIHG) recomendó que se realice la IFI en tres órganos diferentes de los roedores [Vergani, Alvarez, Bianchi, Cancado, Mackay, Manns, Nishioka y Penner (2004) *J Hepatol* 41: 677-83]. Tanto AAM como los anticuerpos de tipo 1 microsomales de hígado y riñón (LKM1) tiñen los túbulos renales del riñón, con diferencias solo evidentes para el ojo entrenado, y esta confusión puede llevar a un diagnóstico de hepatitis autoinmune (HAI), en lugar de CBP [Bogdanos, Invernizzi, Mackay y Vergani (2008) *World J Gastroenterol* 14: 3374-87]. Además, algunos autoantígenos se pierden (irreconocibles) mediante difusión o desnaturalización durante el proceso de fijación de IFI. Otro factor de confusión es que múltiples enfermedades autoinmunes a menudo se pueden dar juntas en el mismo paciente, y los patrones solapantes de IFI pueden llevar a confusión en el diagnóstico correcto de cada una [Assassi, Fritzier y col. (2009) *J Rheumatol*; Norman, Bialek, Encabo, Butkiewicz, Wiechowska-Kozłowska, Brzoska, Shums y Milkiewicz (2009) *Dig Liver Dis* 41: 762-4]. Finalmente, la IFI es lenta, laboriosa y no apta para la automatización de alto rendimiento [Ulvestad, Kanestrom, Madland, Thomassen, Raga y Vollset (2000) *Scand J Immunol* 52: 309-15].

Aunque la IFI sigue siendo el estándar de oro en el ensayo de AAM, inmunoensayos en fase sólida, tales como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), están ganando popularidad, especialmente en laboratorios de alto rendimiento [Fritzier y Fritzier (2006) *Curr Med Chem* 13: 2503-12]. Estos procedimientos tienen la ventaja de la automatización de alto rendimiento, alta sensibilidad analítica, puntuación puramente objetiva, fiabilidad y la capacidad para probar especies de autoantígenos específicas, incluso de manera multiplexada [Fritzier y Fritzier (2006) *Curr Med Chem* 13: 2503-12]. Con una resolución a nivel antigénico del individuo, estos procedimientos tienen la capacidad de una mayor especificidad de la enfermedad, si se elige el marcador correcto. El inconveniente, sin embargo, es que se debe descubrir un número suficiente de autoantígenos y validar clínicamente para que coincida con la sensibilidad de diagnóstico del ensayo IFI basado en sustrato celular.

En un ejemplo de un inmunoensayo comercial en fase sólida para CBP, INOVA Diagnostics Inc. (San Diego, CA) comercializa el ensayo MIT3, un inmunoensayo basado en ELISA aprobado por la FDA para CBP basado en la detección de AAM. El MIT3 utiliza una proteína recombinante que contiene los epitopos inmunodominantes de las tres subunidades E2 del complejo piruvato deshidrogenasa [Moteki, Leung, Cappel, Dickson, Kaplan, Munoz y Gershwin (1996) *Hepatology* 24: 97-103]. La meta global de estos ensayos es imitar el ensayo de AAM basado en IFI celular para CBP, pero con todos los beneficios mencionados anteriormente de los inmunoensayos en fase sólida de los antígenos individuales. Aún así, este ensayo solo pretende ser una ayuda de diagnóstico, junto con los hallazgos clinicopatológicos sobre la CBP. En un estudio, el ensayo ELISA MIT3 basado en AAM tubo una sensibilidad de diagnóstico documentada del 81,6 %, sin embargo, es importante señalar que las muestras de suero con enfermedad de CBP negativas en AAM se excluyeron [Gabeta, Norman, Liaskos, Papamichalis, Zografos, Garagounis, Rigopoulou y Dalekos (2007) *J Clin Immunol* 27: 378-87]. En otro estudio, se ha demostrado que el ensayo MIT3, por ejemplo, carece de todos los autoantígenos mitocondriales necesarios para una máxima sensibilidad de diagnóstico de CBP [Dahnrich, Pares y col. (2009) *Clin Chem* 55: 978-85].

Esto destaca la necesidad del descubrimiento y la validación de biomarcadores de autoantígenos adicionales para su uso en inmunoensayos en fase sólida para el diagnóstico óptimo de enfermedades autoinmunes como la CBP. Los procedimientos más eficaces para el descubrimiento de autoantígenos son los que se basan en proteómica. La proteómica se puede definir como el análisis global (por ejemplo, paralelo o simultáneo) de todo el complejo de proteínas expresado del genoma [Wasinger, Cordwell y col. (1995) *Electrophoresis* 16: 1090-4]. Los procedimientos de la proteómica permiten el descubrimiento de nuevos autoantígenos de forma imparcial. Los procedimientos comunes de proteómica para el descubrimiento de nuevos autoantígenos incluyen SEREX (identificación serológica de antígenos mediante clonación de expresión recombinante) [Krebs, Kurrer, Sahin, Tureci y Ludewig (2003) *Autoimmun Rev* 2: 339-45] y micromatrices de proteoma humano ("microplacas", comúnmente las dimensiones de los portaobjetos de microscopios convencionales, que contienen miles de proteínas humanas recombinantes purificadas plasmadas en su superficie en una matriz ordenada de manchas microscópicas, por ejemplo, manchas de 100 micrómetros de diámetro) [Robinson, DiGennaro y col. (2002) *Nat Med* 8: 295-301; Robinson, Steinman y Utz (2002) *Arthritis Rheum* 46: 885-93].

Sumario de la invención

La invención se define mediante las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se definen mediante las características de las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se refiere a procedimientos de uso de nuevos autoantígenos (Tablas I y V) hexocinasa humana 1 (HK1) y/o 12 de tipo kelch (KLHL12), o fragmentos de las mismas que comprenden un epítipo, en el diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos de la enfermedad hepática autoinmune cirrosis biliar primaria (CBP). La presente invención también se refiere a procedimientos de uso de homólogos, miembros de la familia, variantes del transcrito e isoformas (por ejemplo, Tabla VI), preferentemente al menos el 70 % idénticas, más preferentemente al menos el 90 % idénticas y lo más preferentemente al menos el 95 % idénticas, de hexocinasa humana 1 (HK1) y/o 12 de tipo Kelch (KLHL12) o fragmentos de las mismas que comprenden un epítipo, en el diagnóstico, pronóstico, estadificación y regímenes terapéuticos de la enfermedad hepática autoinmune cirrosis biliar primaria (CBP).

- Se desvelan anticuerpos aislados que se unen específicamente a los polipéptidos descritos anteriormente, o a fragmentos de los mismos que comprenden un epítipo. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser policlonales o monoclonales, pueden estar purificados por afinidad, pueden estar inmovilizados sobre un soporte sólido y se pueden detectar con marcadores. También se desvelan procedimientos para la detección de la presencia de una enfermedad autoinmune en un animal, preferentemente un ser humano, que comprende las etapas de aislar una muestra de fluido corporal, preferentemente sangre, suero o plasma, del animal, incubar el suero con un polipéptido de HK1 y/o KLHL12 descrito anteriormente, y detectar la unión de los autoanticuerpos en la muestra de suero al polipéptido aislado. La invención también proporciona procedimientos alternativos para detectar la presencia de una enfermedad autoinmune en un animal que comprenden las etapas de aislar la muestra de fluido corporal del animal, preferentemente sangre, suero o plasma, e inmovilizar los componentes del suero sobre un soporte sólido, poner en contacto los componentes del suero inmovilizados con un polipéptido aislado descrito anteriormente en condiciones que favorecen la formación de un complejo entre los componentes del suero y el polipéptido aislado, poner el complejo formado en contacto con un anticuerpo que se une de forma específica a HK1 y/o KLHL12, y detectar la unión del anticuerpo al complejo. Las enfermedades autoinmunes que se pueden diagnosticar mediante los procedimientos de la presente invención incluyen cirrosis biliar primaria (CBP) y lupus eritematoso sistémico (LES). Los cánceres que se pueden diagnosticar mediante los procedimientos de la presente invención incluyen cáncer colorrectal (CCR). La presente invención también proporciona procedimientos para determinar el pronóstico, la etapa de la enfermedad y los regímenes de tratamiento usando los procedimientos mencionados anteriormente de detección de autoanticuerpos frente a HK1 y/o KLHL12.
- En una realización preferida, los inmunoensayos heterogéneos u homogéneos, monoplexados o multiplexados, se usan para detectar autoanticuerpos presentes en fluidos corporales dirigidos contra dichos autoantígenos. Otras realizaciones preferidas de la presente invención serán aparentes para un experto en la materia a la luz de los siguientes dibujos (Figuras) y descripción de la invención y de las reivindicaciones.

Sección experimental

25 **Ejemplo 1: Descubrimiento de nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) basado en micromatriz de proteoma**

Selección sistemática de suero en micromatrices

Se seleccionaron sistemáticamente sueros de pacientes frente a micromatrices de proteoma humano comerciales comprendidas de 8.000 proteínas recombinantes humanas únicas (expresadas de forma eucarióticas) plasmadas por duplicado a alta densidad en una "microplaca" del tamaño de un portaobjetos de microscopio (Human ProtoArray® v4.0, Invitrogen, Carlsbad, CA) [Sheridan (2005) Nat Biotechnol 23: 3-4]. Las micromatrices se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron imágenes de la micromatrices en un lector de fluorescencia Array- WoRx® BioChip (Applied Precision, LLC, Issaquah, Washington) utilizando los adecuados conjuntos de filtros estándar incorporados. El análisis de imágenes y la adquisición de los datos se realizó usando el paquete informático GenePix Pro v6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la micromatriz (Human ProtoArray® v4.0, Invitrogen, Carlsbad; CA).

92 muestras de suero diferentes de individuos normales y de pacientes con diversas enfermedades se sometieron individualmente a una selección sistemática frente a las micromatrices de proteoma con el fin de detectar la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de la matriz (posibles autoantígenos). Para ello, se usaron 2 lotes diferentes de micromatrices en 2 estudios secuenciales. La composición de toda la población de pacientes fue la siguiente: Lote de micromatriz n.º 1 (80 muestras únicas) - 18 pacientes de cirrosis biliar primaria (CBP) frente a 62 muestras de control no de CBP [13 normales, 25 de cáncer colorrectal (CCR), 22 de lupus eritematoso sistémico (LES), 2 de síndrome de Sjögrens (SSj)]. Lote de micromatriz n.º 2 (12 muestras únicas) - 3 más de CBP y 9 más de controles no de CBP [4 normales y 5 de hepatitis autoinmune (HAI)]. Los sueros normales coincidían aproximadamente en edad y en género con la cohorte de CBP. Se usaron los sueros de HAI porque es una enfermedad hepática autoinmune diferente a la CBP de la que ya se sabe que está asociada con autoanticuerpos. Se usaron los sueros de CCR debido a que se sabe que los pacientes de cáncer también tienen diversos autoanticuerpos frente a los denominados autoantígenos asociados al tumor (AAT), que incluyen un repertorio común de autoanticuerpos nucleares observados tanto en cánceres como en la enfermedad autoinmune [Bei, Masuelli, Palumbo, Modesti y Modesti (2008) Cancer Lett]. Los sueros registrados se obtuvieron de los repositorios de las siguientes fuentes: El colaborador de los presentes inventores, el Dr. Donald Bloch, M.D., Centro de Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor ayudante de Medicina, Harvard Medical School proporcionó 12 de los sueros de LES así como los sueros de SSj y los de CBP. Los restantes sueros de LES y todos los sueros de HAI fueron de Bioreclamation Inc. (Hicksville, NY), los sueros normales fueron de ProMedDx, LLC (Norton, MA) y los sueros de CCR fueron de Asterand Inc. (Detroit, MI).

Análisis bioestadístico de los datos de micromatriz

Con el fin de identificar los biomarcadores de autoantígenos a partir de los datos de la micromatriz, los procedimientos bioestadísticos usados fueron las estrategias convencionales proporcionadas por el fabricante de las micromatrices en la forma del paquete informático ProtoArray® Prospector v4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando

el complemento de perfil de respuesta inmune (IRP) [Hudson, Pozdnyakova, Haines, Mor y Snyder (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104: 17494-9]. Se usaron dos de los procedimientos bioestadísticos de este paquete informático para crear dos listados de autoantígenos de CBPO correspondientes tal como sigue:

5 Listado de autoantígenos de "calificación de éxito": Para convertir los datos en formato binario, las proteínas (es decir, los posibles autoantígenos) en cada micromatriz (1 suero/micromatriz) se puntuaron como un "éxito" (es decir, positivo) o no éxito (es decir, negativo). Los éxitos de autoantígenos se calificaron en micromatrices utilizando la puntuación Z con un umbral de corte de 3 desviaciones estándar por encima de la media de la micromatriz. El número de éxitos en los grupos de CBP y de control para cada autoantígeno se usó para determinar el porcentaje de prevalencia de cada autoantígeno. Finalmente, los autoantígenos colocados en esta lista debían tener un mayor porcentaje de prevalencia en la cohorte de CBP que la cohorte de control (es decir, todas las muestras que no eran de CBP).

10 Listado de autoantígenos de los estadísticos de M: Esta estrategia usa datos de micromatriz normalizados al cuantil y realiza un test de la t de Student por pares para cada proteína entre los dos grupos de pacientes (es decir, el grupo de CBP y el grupo de control que se corresponde con todos los pacientes no CBP). Este algoritmo también estima la prevalencia del autoantígeno basándose en los límites establecidos por los datos normalizados al cuantil. Finalmente, los autoantígenos colocados en este listado tenían que tener un mayor porcentaje de prevalencia en la cohorte de CBP que en la cohorte de control (es decir, todas las muestras no de CBP) y tenían que tener p-valores de los estadísticos de M de $<0,1$.

15 Los lotes de micromatrices n.º 1 y 2 se analizaron por separado. Para componer un único listado final de autoantígenos de CBP que derivan de la micromatriz, se tomaron los que se observaron que solapaban en ambos listados bioestadísticos mencionados anteriormente para el lote de micromatrices n.º 1 (solo). A continuación, cualquiera de los marcadores de este listado compilado que fuese positivo en cualquiera de los pacientes de HAI (lote de micromatrices n.º 2), tal como se determina mediante el procedimiento de "clasificación de éxito", se eliminó. Finalmente, se priorizó el listado basándose en los p-valores de los estadísticos de M así como en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

Resultados:

20 Dos de los marcadores de autoantígeno de CBP, la hexocinasa 1 humana (HK1) y la 12 humana de tipo Kelch (KLHL12), identificados a partir de las micromatrices de proteoma y reivindicados en la presente patente, se enumeran en la **Tabla I**, junto con sus p-valores de los estadísticos M así como sus sensibilidades y especificidades al diagnóstico (calculadas a partir del lote de micromatrices n.º 1). Los datos de la micromatriz normalizados al cuantil (intensidad de la señal del autoanticuerpos normalizado) para las 92 muestras (es decir, las 92 micromatrices) se muestran en la **Figura 16** y en la **Figura 17** para HK 1 t KLHL12, respectivamente. En resumen, (**Tabla I**), la presencia de autoanticuerpos del suero frente a cualquier autoantígeno se correlaciona fuertemente con la cohorte de CBP, mostrando p-valores altamente significativos (1×10^{-10} y 8×10^{-5} para HK1 y KLHL12 respectivamente) así como sensibilidades del 85-89 % y del 33-40 % para HK1 y KLHL12 respectivamente, y, especificidades del 84-90 % y del 97-98 % para HK1 y KLHL12 respectivamente (véase la **Tabla I** para detalles). Por definición (véase "Análisis bioestadístico de los datos de micromatriz" anteriormente en este Ejemplo), ninguno de los 5 sueros de hepatitis autoinmune (HAI) fue positivo para HK1 o KLHL12 (véase también **Figura 16** y **Figura 17**; lote de micromatriz n.º 2). Los biomarcadores de los autoantígenos HK1 y KLHL12 también fueron objeto de validación adicional tal como se detalla en otros ejemplos experimentales.

25 También se debe de tener en cuenta que los autoanticuerpos de HK1 también se observan con baja prevalencia en lupus eritematoso sistémico (LES) y en cáncer colorrectal (CCR) (**Figura 16**). N-03 es la única muestra de suero "normal" positiva para HK1 (**Figura 16**; barra roja). N-03 también es la única muestra de suero "normal" positiva para KLHL12 (**Figura 17**; barra roja). Por lo tanto, de hecho, se cree que N-03 puede de hecho tener una CBP aún no diagnosticada o no informada / no documentada (tenga en cuenta que los autoanticuerpos han demostrado que son anteriores a los síntomas/manifestaciones clínicas de la enfermedad autoinmune, incluyendo la CBP).

Ejemplo 2: Prevalidación de nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 y KLHL12 usando un ELISA

30 Debe observarse que el ensayo ELISA descrito en este Ejemplo del presente documento y usado en muchos Ejemplos posteriores se denomina T²-ELISA y se basa en el uso de antígenos proteicos expresados sin células, marcados con dos epítomos. En este Ejemplo, estos antígenos son HK1 y KLHL12 y el T²-ELISA usado como una herramienta para la prevalidación clínica (y ocasionalmente la validación en los Ejemplos posteriores) de estos nuevos autoantígenos derivados de la micromatriz.

Expresión del autoantígeno

35 Se clonó la totalidad de los marcos de lectura abierta (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) de las HK1 y KLHL12 humanas, usando prácticas convencionales y aceptadas de biología molecular, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas sin células, que contienen el promotor T7 de la ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión a ribosoma), un codón de iniciación, un marcador del epítipo VSV-G de N-terminal (YTDIEMNRLGK(SEQ

ID NO: 19)), y un marcador del epítipo HSV de C-terminal (QPELAPEDPED(SEQ ID NO: 20)) además del inserto de ORF. Como ADN de origen para la clonación en el vector de expresión, se encargaron clones de longitud completa y secuencia verificada a OpenBiosystems (Huntsville, AL) [catálogo OHS1770-9381021 (UniGene Hs.370365) para HK1 y MHS1011-61211 (UniGene Hs.706793) para KLHL12]. Los vectores de expresión se verificaron para el inserto correcto de ORF usando procedimientos estándar de digestión de EcoRI y/o secuenciación de ADN.

Los autoantígenos se produjeron a partir de los clones de plásmidos mencionados anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo acoplado a transcripción / traducción (TNT® T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN plasmídico afín, mientras que las reacciones de expresión en blanco carecían únicamente del ADN plasmídico. Las reacciones de expresión se detuvieron diluyendo a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, a pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T²-ELISA) de autoantígenos

Se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno no tratadas, de fondo plano, opacas, blancas, de 96 pocillos, marca Nunc Polysorp™ Microwell™ (marca Nunc de Thermo-Fisher Scientific, Rochester, NY) para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich. Las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura monoclonal de ratón anti-marcador HSV® (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en carbonato/bicarbonato de sodio a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). Las placas se lavaron después 6 veces en TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) en un lavador de placas robótico ELx405 Select (BioTek, Winooski, VT). Todos los lavados de placas se realizaron de este modo salvo que se indique lo contrario. Las placas después se bloquearon durante 30 min a 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se eliminó de las placas y las reacciones de expresión sin células detenidas (es decir, diluidas) mencionadas anteriormente se añadieron después a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Las placas se lavaron y las muestras de suero (diluidas a 1/1.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T) se añadieron a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Cada muestra de suero se dejó correr frente a pocillos triplicados de autoantígeno y pocillos triplicados del blanco de expresión sin células. Además, se designó un conjunto de pocillos triplicados de autoantígeno y un conjunto de pocillos triplicados del blanco de expresión sin células para la detección del marcador de epítipo VSV-G, y por lo tanto recibieron BSA al 1 % (p/v) en TBS-T en lugar de suero diluido. Para evitar la contaminación del lavador de placas robótico con suero humano, las placas se lavaron posteriormente 4 veces mediante adición manual de TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) seguido de aspiración al vacío y después se lavaron 6 veces en el lavador de placas robótico tal como se describe anteriormente en este Ejemplo. Los pocillos designados para la detección del marcador del epítipo de VSV-G recibieron entonces un anticuerpo monoclonal anti-VSV-G marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Clon P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Los pocillos designados para la detección de autoanticuerpo del suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal anti-[IgG humana] de ratón marcado con HRP (mínima reactividad cruzada con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Las placas se agitaron durante 30 minutos. Las soluciones se descargaron manualmente de las placas mediante volteo seguido por una vigorosa palmada de las placas volteadas sobre una toalla de papel seca para eliminar el fluido residual. Las placas después se lavaron en el lavador de placas robótico tal como se describe anteriormente en este Ejemplo. Se generó una señal de quimioluminiscencia mediante la adición de 50 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal ELISA Pico (marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 minutos y después se leyeron en un lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición, PMT de 650V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA).

Resultados:

Para esta prevalidación de los nuevos marcadores de autoantígenos de CBP enumerados en la **Tabla I**, los sueros seleccionados aleatoriamente que se detectaron como positivos o negativos para un autoantígeno dado en los análisis de micromatriz (véase el Ejemplo 1) también se analizaron aquí mediante T²-ELISA.

El cálculo de las unidades de autoanticuerpo a partir del T²-ELISA, en resumen, se logró restando los datos de fondo y normalizando a la detección del marcador de epítipo VSV-G común para cada antígeno en cada ensayo (es decir, cada placa). De manera más específica, para cada par suero-autoantígeno, para cada uno de los pocillos triplicados de los datos de T²-ELISA, se calcularon las unidades de autoanticuerpo tal como sigue: **[señal de autoanticuerpo de un pocillo (es decir, suero frente a autoantígeno)] menos [fondo promedio de los triplicados (es decir, mismo suero frente al promedio de los tres pocillos de expresión de blanco)]** para generar valores de fondo sustraídos (BSV, del inglés *Background Subtracted Values*) para cada par suero-autoantígeno. Nótese que un ensayo se define como una placa de ELISA de microtítulo de 96 pocillos. Para normalizar las varianzas inter-ensayo (día a día y ensayo a ensayo) para cada autoantígeno, los pocillos en cada ensayo, para cada autoantígeno en ese ensayo, se dedicaron únicamente a la detección del marcador de epítipo de VSV-G común. El factor de normalización de VSV-G (VNF, del inglés *VSV-G Normalization Factor*) se calculó tal como sigue: **[señal de VSV-G promedio para pocillos triplicados (es decir, pocillos de autoantígeno sondados con anticuerpo VSV-G)] menos [fondo de VSV-G promedio para pocillos triplicados (es decir, pocillos de expresión de blanco**

sondados con anticuerpo VSV-G]. Por ensayo, el BSV para todos los pares de suero-autoantígeno se dividió entonces entre el VNF para ese ensayo y se multiplicó por 100, produciendo valores de unidad de autoanticuerpo por cada par de suero-autoantígeno (es decir, expresado como un porcentaje del VNF). Nótese que se estableció un nivel de cero para las unidades de autoanticuerpo. El promedio y la desviación estándar (barras de errores) se calcularon y se representaron gráficamente en las **Figuras 1 y 2** para los nuevos autoantígenos de CBP HK1 y KLHL12, respectivamente.

Los sueros se puntuaron "analíticamente", como positivos o negativos en el T²-ELISA con el fin de comprobar la concordancia con las micromatrices. Para ello, se deben cumplir los dos siguientes criterios para que cada par suero-autoantígeno se haya puntuado como analíticamente positivo en el T²-ELISA: i) un valor de $p \leq 0,05$ en un test de la t de Student unilateral homocedástica de 1 cola en los valores no tratados del T²-ELISA de los pocillos por triplicado de la señal de autoanticuerpo (es decir, suero frente a autoantígeno) en comparación con el fondo (es decir, mismos pocillos de expresión de suero frente a blanco); ii) proporción señal frente a fondo del autoanticuerpo ≥ 2 . En las **Figuras 1 y 2**, las puntuaciones de T²-ELISA y las puntuaciones de las micromatrices ("matrices") se denotan como positivas (+) o negativas (-). Para HK1 (**Figura 1**), de 12 sueros seleccionados aleatoriamente que fueron positivos mediante los análisis de micromatrices, 10 fueron positivos mediante ELISA en un 83 % de concordancia. Adicionalmente, para HK1 (**Figura 1**), se seleccionaron aleatoriamente 5 sueros que fueron negativos en las micromatrices, todos los cuales también fueron negativos mediante T²-ELISA en un 100 % de concordancia. Para KLHL12, de los 7 sueros negativos y los 4 positivos seleccionados aleatoriamente de los análisis de micromatrices (véase el Ejemplo 1), hubo una concordancia completa del 100 % con los resultados de T²-ELISA tal como se muestra en la **Figura 2**.

Ejemplo 3: Validación de nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 y KLHL12 usando un ELISA sobre una nueva cohorte de pacientes de CBP positiva en AAM no seleccionada anteriormente mediante micromatrices

Expresión del autoantígeno

Como en el Ejemplo 2.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T²-ELISA) de autoantígenos

Como en el Ejemplo 2.

Resultados:

Una validación crítica de los marcadores recientemente descubiertos es realizar estudios sobre una nueva cohorte de pacientes (22 muestras de CBP), no seleccionados sistemáticamente antes sobre las micromatrices de proteoma. En este Ejemplo, esto se ha hecho con ambos autoantígenos de CBP nuevos, HK1 y KLHL12 (previamente enumerado en la **Tabla I**).

Los nuevos sueros de CBP se obtuvieron del colaborador de los presentes inventores, el Dr. Donald Bloch, M.D., Centro de Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor ayudante de Medicina, Harvard Medical School y los sueros normales fueron de ProMedDx, LLC (Norton, MA).

El cálculo de las unidades de autoanticuerpo a partir del T²-ELISA, en resumen, se logró restando los datos de fondo y normalizando al control positivo en cada ensayo (es decir, cada placa), mediante lo cual, el control positivo se establece a 1.000 unidades de autoanticuerpos. De manera más específica, para cada par suero-autoantígeno, para cada uno de los pocillos triplicados de los datos de T²-ELISA, se calcularon las unidades de autoanticuerpo tal como sigue: **[señal de autoanticuerpo de un pocillo (es decir, suero frente a autoantígeno)] menos [fondo promedio de los triplicados (es decir, mismo suero frente al promedio de los tres pocillos de expresión de blanco)]**. Esto produce valores de fondo sustraído (BSV) para cada par suero-autoantígeno. Nótese que un ensayo se define como una placa de ELISA de microtítulo de 96 pocillos. Para normalizar las varianzas inter-ensayo (día a día y ensayo a ensayo) para cada autoantígeno, se dejó correr un suero de CBP de control positivo común para HK1 y KLHL12 en cada ensayo (seleccionado a partir de la corte de CBP de micromatrices en el Ejemplo 1). Los datos de T²-ELISA de control positivo se procesaron de la forma mencionada anteriormente en cada ensayo y se promedió el BSV por triplicado para producir el Factor de Normalización de Control Positivo (PCNF) para cada ensayo. Para cada ensayo, el BSV triplicado para todos los pares de suero-autoantígeno se dividió entonces entre el PCNF para ese ensayo y se multiplicó por 1.000, produciendo valores de unidad de autoanticuerpo para cada par suero-autoantígeno. Cabe destacar que, aún se usó la detección del marcador del epítipo común VSV-G (Ejemplo 2) para verificar la expresión de autoantígeno exitosa y consistente, pero no se usó aquí en el cálculo de las unidades de autoanticuerpos.

Con el fin de establecer los umbrales de puntuación del diagnóstico para un autoantígeno dado, se dejó correr el ensayo T²-ELISA sobre un grupo de 22 sueros de pacientes normales y después se establecieron los límites a 2 desviaciones estándar por encima de la media para esta cohorte normal, para una confianza estadística del 95 %. El uso de este procedimiento a 2-3 desviaciones estándar es una práctica común (por ejemplo, [Liu, Wang, Li, Xu, Dai, Wang y Zhang (2009) Scand J Immunol 69: 57-63]). Sin embargo, un requisito importante de este procedimiento de

cálculo del límite basado en la desviación estándar es que los datos sigan una distribución gaussiana, sin embargo, un test de Shapiro-Wilk para la normalidad determinó que este no era el caso. Como solución, los presentes inventores transformaron las unidades de autoanticuerpos a \log_2 y establecieron el nivel a 0 (es decir, los valores no transformados de ≤ 0 se dejaron como 0 sin transformación), produciendo una distribución gaussiana (de los valores >0) y permitiendo establecer límites basándose en la metodología de la desviación estándar mencionada anteriormente. Los valores de unidades de autoanticuerpos de ≤ 0 se excluyeron de los cálculos del límite debido a que se usa la resta del fondo en el cálculo de las unidades de autoanticuerpos, lo que significa que las muestras de pacientes que producen valores ≤ 0 por definición tendrían que puntuarse como autoanticuerpos negativos independientemente (es decir, no se necesita un límite ni es relevante para valores ≤ 0).

5 Tal como se ve con los datos en la **Figura 3** para HK1, usando un límite de 2,0, una sensibilidad de diagnóstico del 82 % (especificidad del 100%) en esta nueva cohorte de muestras concuerda bien con los análisis de micromatrices realizados en la cohorte de muestras originales (véase la Tabla I). Tal como se ve con los datos en la **Figura 4** para KLHL12, usando un límite de 2,5, una sensibilidad de diagnóstico del 36 % (especificidad del 100%) en esta nueva cohorte de muestras concuerda bien con los análisis de micromatrices realizados en la cohorte de muestras originales (véase la **Tabla I**).

Ejemplo 4: Validación de nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 y KLHL12 usando un ELISA sobre una nueva cohorte de pacientes de CBP Negativo en anticuerpos antimitocondriales no seleccionada anteriormente mediante micromatrices

20 Los pacientes de los que se sospecha de CBP pero con un estado negativo de anticuerpos antimitocondriales (AAM) constituyen aproximadamente el 5-20 % de todos los pacientes con CBP [Oertelt, Rieger y col. Hepatology 2007; 45:659-665], y los pacientes de CBP negativos en AAM son particularmente difíciles de confirmar su diagnóstico basándose en los seroensayos. El uso de los autoantígenos conocidos y validados Sp 100 y gp210 solo da como resultado la detección de una parte de los pacientes de CBP negativos en AAM (por ejemplo, el 17-33 % en un estudio reciente [Liu, Shi, Zhang, Zhang y Gao (2008) Liver Int 28: 233-9]), mostrando una necesidad por autoantígenos específicos que puedan detectar pacientes de CBP negativos en AAM.

25 Para ensayar la capacidad de los nuevos autoantígenos de los presentes inventores, HK1 y KLHL12, para detectar pacientes de CBP negativos en AAM, los presentes inventores utilizaron 17 sueros de pacientes que eran negativos en AAM mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) pero con CBP confirmado por procedimientos convencionales [Heathcote (2000) Hepatology 31: 1005-13] y mediante biopsia del hígado. Los nuevos sueros de CBP negativos en AAM se obtuvieron del colaborador de los presentes inventores, el Dr. Donald Bloch, M.D., Centro de Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor ayudante de Medicina, Harvard Medical School. Los presentes inventores compararon la capacidad de sus nuevos autoantígenos, HK1 y KLHL12, con los ensayos comercialmente disponibles para detectar estos pacientes con CBP confirmada pero con un estado conocido negativo en AAM.

35 *Expresión del autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T^2 -ELISA) de autoantígenos

Como en el Ejemplo 2.

ELISA de CBP comercial aprobados por la FDA

40 Los ELISA comerciales aprobados por la FDA para el diagnóstico de CBP también se dejaron correr y fueron los ensayos Quanta Lite™ M2 EP (MIT3), Quanta Lite™ sp100, Quanta Lite™ gp210, Quanta Lite™ CBP de selección de IgG/IgA de INOVA Diagnostics (San Diego, CA); y se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados:

45 Con fines de puntuación, los cálculos de las unidades de autoanticuerpos y los umbrales de diagnóstico establecidos en el Ejemplo 3 se emplearon una vez más aquí para cada autoantígeno (HK1 y KLHL12).

Tal como se representa mediante los datos en la Figura 5 para HK1, 4 de 17 sueros de CBP negativos en AAM dieron positivo para este autoantígeno (sensibilidad del 24 %). Tal como se ve mediante los datos en la Figura 6 para KLHL12, 6 de 17 sueros de CBP negativos en AAM dieron positivo en diagnóstico (sensibilidad del 35 %).

50 Los presentes inventores también ensayaron los 17 sueros de CBP negativos en AAM en sobre los cuatro ensayos de CBP de INOVA Diagnostics comercialmente disponibles y aprobados por la FDA, concretamente, los ELISA Quanta Lite™ M2 EP (MIT3), Quanta Lite™ sp100, Quanta Lite™ gp210 and Quanta Lite™ CBP de selección de IgG/IgA. Los resultados de estos ensayos, así como los resultados de los T^2 -ELISA de los presentes inventores con HK1 y KLHL12, se resumen en la Tabla II. Los ensayos de INOVA fueron incapaces de detectar 3 de los 17 pacientes (el 18 %). Sin embargo, sorprendentemente, HK1 y KLHL12 fueron capaces de detectar, cada uno, uno de

los sueros de CBP negativos en AAM anteriormente indetectables (PB-AMN-044 y PB-AMN-263, respectivamente). El tercer paciente (PB-AMN-084) permaneció sin detectar por los autoantígenos anteriormente mencionados, pero se detectó mediante Sp140 (véase el Ejemplo 6 para detalles). Estos resultados se resumen en la Figura 7 como un Diagrama de Venn, que representa el solapamiento (o la ausencia del mismo) entre los diversos biomarcadores. Nótase que los resultados del ELISA Quanta Lite™ CBP de selección de IgG/IgA no se muestran en el Diagrama de Venn (Figura 7), sin embargo, tal como se ve en la Tabla II, este ensayo no aumentó la detección en comparación con los otros ensayos de INOVA. Conjuntamente, estos hallazgos indican que los dos nuevos autoantígenos de los presentes inventores, HK1 y KLHL12, son diagnósticamente muy significativos. Se sugiere que la adición de los nuevos biomarcadores de los presentes inventores al panel existente de biomarcadores de CBP podría dar como resultado una detección mejorada y, por lo tanto, un tratamiento más temprano y unos mejores resultados de los pacientes de CBP, en particular, de los pacientes de CBP negativos en AAM.

Ejemplo 5: Evaluación de HK1 y KLHL12 en pacientes con tinción atípica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los presentes inventores proponen que el número de pacientes de CBP puede ser mayor del que previamente se sospecha, debido a la extrema dificultad de establecer un diagnóstico concluyente de CBP en ausencia de tinción de AAM o del apropiado patrón de tinción de autoanticuerpos antinucleares (AAN) tal como se determina mediante la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para probar esta teoría, los presentes inventores examinaron sueros de pacientes no diagnosticados con patrones de tinción de IFI difusos en membrana citoplasmática o nuclear. Estos nuevos sueros de pacientes se obtuvieron del colaborador de los presentes inventores, el Dr. Donald Bloch, M.D., Centro de Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor ayudante de Medicina, Harvard Medical School.

Expresión del autoantígeno

Como en el Ejemplo 2.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T²-ELISA) de autoantígenos

Como en el Ejemplo 2.

ELISA Quanta Lite™ M2 EP (MIT3)

El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

Resultados:

Los presentes inventores dejaron correr HK1, KLHL12 y el ensayo M2 EP (MIT3) Quanta Lite™ (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) en 20 pacientes, cuyos resultados se muestran en la Figura 8. Las muestras del suero prefijadas con "Cyto" o "NM" son de pacientes con tinción IFI difusa de membrana citoplasmática o nuclear, respectivamente. El cálculo de unidades de autoanticuerpos para el T²-ELISA tal como se dejó correr en HK1 y KLHL12 se realizó como en el Ejemplo 2. La puntuación para el ensayo T²-ELISA se hizo de acuerdo con el procedimiento "analítico" descrito en el Ejemplo 2 (nótase que cualquier muestra de suero con una barra representada en la gráfica de la Figura 8 es positiva). Para evitar los efectos de escala, los datos representados en la gráfica para cada antígeno en la Figura 8 se normalizan como un porcentaje del paciente que tiene las máximas unidades de autoanticuerpo para ese antígeno (ese paciente se marca con una flecha azul para cada antígeno). Los presentes inventores establecen el eje Y al límite de MIT3 de INOVA de 25 unidades (basándose en el bajo control positivo; límite determinado por las instrucciones del fabricante), que se correspondía con el 17 %, de manera que todas las barras mostradas representan resultados positivos.

Un paciente se detecta mediante los tres marcadores. El nuevo autoantígeno KLHL12 detecta dos pacientes de membrana nuclear que no detectan los otros marcadores. Finalmente, MIT3 detecta una membrana nuclear y varios pacientes citoplasmáticos que no detectan otros marcadores. Estos resultados sugieren fuertemente que la detección de los antígenos HK1, KLHL12 y MIT3 puede ser útil en la revelación de un gran número de pacientes no diagnosticados previamente que padecen CBP, pero con tinción atípica de IFI.

Ejemplo 6: Sensibilidad de diagnóstico mejorada mediante ELISA para cirrosis biliar primaria (CBP) mediante la detección de Sp140

Los anticuerpos antinucleares que reaccionan con 5-20 puntos nucleares se detectan en el 20-30 % de los pacientes con cirrosis biliar primaria (CBP). El patrón de tinción de "múltiples puntos nucleares" (MND) producido por estos anticuerpos se dirige frente a los componentes de está dirigido contra los componentes del cuerpo nuclear de proteína de leucemia promielocítica (CN LPM), uno de los cuales se identificó recientemente como Sp140. Se ha documentado que Sp140 está presente en el 13 % de los pacientes de CBP, con una gran proporción de pacientes de CBP negativos en AAM en comparación con los pacientes de CBP positivos en AAM (el 53 % frente al 8 %) [Granito, A. Yang, W. y col., 2009, Am J Gastroenterol, En prensa]. Por lo tanto, los presentes inventores ensayaron Sp140 en su T²-ELISA.

Los sueros de pacientes de CBP se obtuvieron del colaborador de los presentes inventores, el Dr. Donald Bloch, M.D., Centro de Inmunología y Enfermedades Inflamatorias, Hospital General de Massachusetts, Profesor ayudante de Medicina, Harvard Medical School. el estado de Sp140 se determinó inicialmente mediante IFI en células que expresan Sp140 frente a células negativas.

5 *Expresión del autoantígeno*

Como en el Ejemplo 2.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T²-ELISA) de autoantígenos

Como en el Ejemplo 2.

ELISA QUANTA Lite™ Sp100

10 El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

Resultados:

Los cálculos de unidades de autoanticuerpos de T²-ELISA y la puntuación "analítica" se realizaron como en el Ejemplo 2. La puntuación para el ELISA de Sp100 de INOVA Diagnostics se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados están en la Tabla III. Notablemente, aunque fue incapaz de detectar Sp100 en los
15 pacientes de CBP PB-AMP-020 o PB-AMN-084 (sombreado naranja) mediante el T²-ELISA de los presentes inventores o mediante el ensayo de INOVA, la plataforma del T²-ELISA fue capaz de detectar estos pacientes de CBP usando el autoantígeno Sp140. La detección de PB-AMN-084 es la más notable, dado que este paciente no se detectó mediante ninguno de los siguientes: los procedimientos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de Sp140 (no mostrados), ninguno de los ensayos de ELISA de CBP disponibles de INOVA, o cualquiera de los autoantígenos
20 HK1 y KLHL12 tal como se determina mediante el T²-ELISA (véase lo anterior en el Ejemplo 4 y la Tabla II para estos resultados de ELISA).

Juntos, HK1, KLHL12 y Sp140 pueden servir como un potente panel de diagnóstico de autoantígenos que permite el diagnóstico rápido y preciso de pacientes de CBP que no se detectaron previamente.

Este Ejemplo también demuestra otro resultado importante, es decir, con respecto a Sp100, la plataforma de T²-
25 ELISA de los presentes inventores esencialmente concuerda al 100 % con el ELISA de Sp100 de INOVA aprobado por la FDA. Los únicos resultados discordantes fueron 2 casos en los que el T²-ELISA dio un resultado negativo y el ensayo INOVA un resultado equívoco, es decir, demasiado cerca del límite designado por INOVA para ser concluyente (según los procedimientos de puntuación del fabricante).

30 **Ejemplo 7: Detección con ELISA colorimétrico frente a quimioluminiscente de autoanticuerpos frente a los nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 y KLHL12 usando suero del paciente de CBP**

Los experimentos de ELISA que exploran la unión entre autoantígenos y autoanticuerpos normalmente emplean una de las dos estrategias de detección. Generalmente se acepta que la quimioluminiscencia es más sensible y tiene un rango dinámico más amplio, mientras que generalmente se acepta que la colorimetría es más estable y consistente. El fin de estos experimentos fue realizar el mismo experimento exacto dos veces y después desarrollarlo en paralelo,
35 una vez mediante detección colorimétrica, y una vez mediante detección quimioluminiscente.

Expresión del autoantígeno y T²-ELISA

Realizado como en el Ejemplo 2, salvo que para la detección de ELISA colorimétrico, se utilizaron los siguientes reactivos de la plataforma de ELISA QUANTA Lite™ de INOVA Diagnostics (San Diego, CA): Diluyente de muestra de HRP, Concentrado de lavado de HRP, Conjugado de IgG de HRP, Cromógeno TMB, Solución de parada de HRP. Se siguieron las instrucciones del fabricante. La puntuación de diagnóstico para el ELISA quimioluminiscente fueron las que ya se determinaron en el Ejemplo 4 para los mismos sueros.
40

Resultados:

Los resultados de ELISA de HK1 sobre sueros de pacientes de CBP se muestran en la **Figura 9A** y KLHL12 en la **Figura 9B**, demostrando tanto la detección colorimétrica como la quimioluminiscente. Los resultados del ensayo colorimétrico se representan como señal menos fondo, siendo el fondo el mismo suero que se deja correr frente a un blanco de expresión (sin antígeno expresado). La puntuación de ELISA quimioluminiscente se enumera bajo el eje X como "+" (positivo) o "-" (negativo). Nótese que las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente fueron aquellas ya determinadas en el Ejemplo 4 para los mismos sueros (con los sueros PB-AMN-044 y PB-AMN-263, contorno verde en las **Figuras 9A y B**, que son los que puntuaron anteriormente negativos para todos los ensayos de ELISA de CBP disponibles de INOVA Diagnostics pero positivos para HK1 y KLHL12, respectivamente). Estos resultados demuestran claramente la concordancia entre los procedimientos de lectura de ELISA quimioluminiscente y colorimétrico.
50

Ejemplo 8: Viabilidad de los diagnósticos de análisis colorimétrico por transferencia de puntos en autoanticuerpos cerca de los pacientes frente al nuevo autoantígeno de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 usando suero de paciente de CBP

5 El fin de este ejemplo es mostrar la viabilidad del uso de autoantígenos en un ensayo de diagnóstico basado en autoanticuerpos realizado junto al paciente (POC, de *point-of-care*) (es decir, un ensayo que se realiza rápidamente y fácilmente en el consultorio médico, por ejemplo, por un especialista en medicina interna, un médico general o un reumatólogo).

10 Un formato común de un inmunoensayo en fase sólida para diagnósticos realizados junto al paciente (POC) es el procedimiento inmunocromatográfico basado en flujo lateral, realizado sobre una matriz de membrana sólida porosa, tal como nitrocelulosa. Por ejemplo, se permite que una muestra de sangre así como un reactivo detector marcado coloriméricamente (comúnmente un marcador de oro coloidal) fluyan por acción capilar a lo largo de la longitud de una tira de nitrocelulosa, poniendo posteriormente en contacto la zona del ensayo donde, por ejemplo, un antígeno, un anticuerpo de captura u otro agente de captura se ha inmovilizado previamente (es decir, en bandas). Un resultado positivo se visualiza como una banda coloreada en la zona del ensayo.

15 La forma más ubicuamente reconocida de tal ensayo es la prueba de embarazo "casera", sin embargo, son posibles diversos formatos para detectar rápidamente anticuerpos en sangre humana, por ejemplo, para la detección de infección por patógenos [Biagini, Sammons, Smith, MacKenzie, Striley, Snawder, Robertson y Quinn (2006) Clin Vaccine Immunol 13: 541-6; Laderman, Whitworth, Dumaul, Jones, Hudak; Hogrefe, Carney y Groen (2008) Clin Vaccine Immunol 15: 159-63].

20 Para imitar este tipo de dispositivos y demostrar la viabilidad con el nuevo autoantígeno HK1 de CBP documentado en esta patente, se realizó un ensayo de transferencia de puntos. En este ensayo, el autoantígeno se inmoviliza sobre una membrana de nitrocelulosa que después se sondea con el suero del paciente. La detección del autoanticuerpo unido se logra con un anticuerpo detector anti-IgG humana marcado con oro coloidal. Los detalles del procedimiento y los resultados son como sigue:

25 *Análisis colorimétrico por transferencia de puntos del autoantígeno*

La proteína hexocinasa 1 humana recombinante (HK-1, Alpha Diagnostic, International, San Antonio, TX) se diluyó a 200 ng/μl en TBS (Tris 50 mM, a pH 7,5, NaCl 200 mM). La IgG humana se diluyó a 250 ng/μl en PBS (fosfato de sodio 50 mM, a pH 7,5, NaCl 100 mM).

30 Se cortó la nitrocelulosa (HiFlow Plus, Millipore Corporation, Bedford, MA) para formar tiras de 0,5 cm x 3 cm. Se colocaron individualmente gotas de 1 μl cada una de TBS, HK1 e IgG humana en la nitrocelulosa y se dejó que se secase a conciencia mediante la incubación durante 1 hora a 37 °C. Las tiras se trataron después con tampón de bloqueo [BSA al 1 % (p/v) en TBS-T (TBS con Tween-20 al 0,05 % v/v)] durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). El tampón de bloqueo se aspiró al vacío. El suero del paciente se diluyó a 1:100 en tampón de bloqueo y después se incubó con tiras de nitrocelulosa durante 30 minutos a TA. Se aspiró el suero y se lavaron las tiras con 1,5 ml de TBS-T: 4 x 5 minutos cada una. Las tiras se sondaron con anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal [anticuerpo anti-IgG (H+L) humano, marcado con oro (40 nm), KPL, Gaithersburg, MD] se diluyeron a 1:10 en tampón de bloqueo con agitación a TA durante 3 horas.

Resultados:

40 Los inmunoensayos de flujo lateral ofrecen un formato simple, preciso, rápido de informe de resultados y fácil de usar y, por lo tanto, son una popular plataforma de diagnóstico junto al paciente (POC). Los dispositivos basados en el flujo lateral usan los principios de la inmunocromatografía para ensayar fluidos biológicos tales como sangre para diversos analitos en cuestión de minutos, en condiciones de "campo" sin instrumentación o experiencia especial. Para ensayar la viabilidad de un ensayo POC de flujo lateral colorimétrico de autoantígenos de CBP, los presentes inventores realizaron un experimento modelo de transferencia de puntos.

45 La HK1 humana purificada recombinante se colocó en puntos sobre la nitrocelulosa, así como un tampón de vehículo (control negativo) e IgG humana (control positivo). Se permitió la unión de los sueros diluidos (a 1:100) de un paciente de CBP y un paciente normal y se lavó antes de añadir anti-IgG humana marcada con oro coloidal. Los resultados se muestran en la **Figura 10**. Tras 1 hora y 20 minutos, todos los puntos de IgG (controles positivos) se habían vuelto rosas. El punto de HK1 se volvió rosa con una dilución 1:100 del suero del paciente de CBP, pero fue negativo (sin color) con el suero normal. Los puntos de control negativo (solo tampón de vehículo) permanecieron incoloros.

Ejemplo 9: Un ensayo heterogéneo en fase sólida basado en marcador de epítipo doble (T²-ELISA) como una herramienta para detectar interacciones de proteína

55 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo ensayo de alto rendimiento y de fase sólida internamente normalizado que se basa en proteínas diana expresadas en sin células (*in vitro*) marcadas con epítipos dobles capturadas sobre una superficie. El ensayo puede detectar la unión de "sondas" (por ejemplo, fármacos,

oligonucleótidos o anticuerpos) a proteínas diana expresadas sin células e inmovilizadas en superficie a la vez que es capaz de normalizar la cantidad de proteína diana en la misma superficie. Aunque el Ejemplo mostrado aquí se refiere a la detección de la unión de autoanticuerpos del suero humano a autoantígenos expresados sin células como las proteínas diana, la metodología es ampliamente aplicable. Además, aunque el formato de ensayo usado en este Ejemplo es un formato de ELISA basado en placa de micropocillos (microtítulo), son posibles diversos formatos.

Una realización del nuevo ensayo de los presentes inventores, que los presentes inventores llamarán el procedimiento T²-ELISA, comprende la captura de un autoantígeno (proteína diana) en el pocillo de la placa de microtítulo con un marcador de epítipo (marcador de captura) seguido de la lectura de la señal del autoanticuerpo (sonda) en el mismo pocillo, a la vez que se usa el otro marcador (marcador de detección) para normalizar la cantidad de proteína expresada en pocillos separados. Con el fin de comparar el ensayo T²-ELISA de los presentes inventores con el ensayo ELISA semicuantitativo, comercialmente disponible y aprobado por la FDA para la detección de anticuerpos anti-IgG de sp100 en suero humano (QUANTA Lite™ sp100; INOVA Diagnostics, San Diego, CA) los presentes inventores prepararon el siguiente experimento: En resumen, los autoantígenos se expresan sin células, purificados en línea con el ensayo basado en placa de microtítulo (es decir, capturados sobre la superficie del pocillo) y seleccionados sistemáticamente frente a los sueros de pacientes para la unión de los autoanticuerpos usando un formato tradicional de ELISA tipo sándwich. Los anticuerpos detectores marcados con enzima (teniendo cada uno un sustrato quimioluminiscente diferente) se añaden en serie, tras lo cual, se añaden dos sustratos quimioluminiscentes a los pocillos apropiados a la vez con el fin de leer tanto la unión del autoanticuerpo así como el marcador de detección (señal de normalización).

Expresión del autoantígeno

Se clonó la totalidad del marco de lectura abierta (ORF) del presunto autoantígeno (en este caso, Sp100 de humano), usando prácticas convencionales y aceptadas de biología molecular, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas sin células, que contienen el promotor T7 de la ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión a ribosoma), un codón de iniciación, un marcador del epítipo VSV-G de N-terminal (YTDIEMNRLGK(SEQ ID NO: 19)), y un marcador del epítipo HSV de C-terminal (QPELAPEDPED(SEQ ID NO: 20)) además del inserto de ORF. Como ADN de origen para la clonación en el vector de expresión, se encargaron clones de longitud completa con secuencia verificada de OpenBiosystems (Huntsville, AL). Los vectores de expresión se verificaron para el inserto correcto de ORF usando procedimientos estándar de digestión de EcoRI.

Los autoantígenos se produjeron a partir de los clones de plásmidos mencionados anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo acoplado a transcripción / traducción (TNT® T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: Las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN plasmídico afín, mientras que las reacciones de expresión en blanco carecían únicamente del ADN plasmídico. Las reacciones de expresión se detuvieron diluyendo a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, a pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de autoantígenos

Se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno no tratadas, de fondo plano, opacas, blancas, de 96 pocillos, marca Nunc Polysorp™ Microwell™ (marca Nunc de Thermo-Fisher Scientific, Rochester, NY) para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich. Las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura monoclonal de ratón anti-marcador HSV® (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en carbonato/bicarbonato de sodio a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). Todos los lavados de placas consistieron en una adición manual de TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo, es decir, 300 µl) seguido de la aspiración al vacío, repetido 4 veces. Todos los lavados de placas se realizaron de este modo salvo que se indique lo contrario. Las placas después se bloquearon durante 30 min a 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se eliminó de las placas y las reacciones de expresión sin células detenidas (es decir, diluidas) mencionadas anteriormente se añadieron después a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Las placas se lavaron y las muestras de suero (diluidas a 1/1.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T) se añadieron a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Las placas se lavaron y las muestras de suero (diluidas a 1/1.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T) se añadieron a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Cada muestra de suero se dejó correr frente a pocillos duplicados del blanco de expresión sin células designado para la detección del marcador de epítipo VSV-G [por lo tanto, recibió BSA al 1 % (p/v) en TBS-T en lugar de suero diluido]. Los pocillos designados para la detección del marcador del epítipo de VSV-G recibieron entonces un anticuerpo monoclonal anti-VSV-G marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), mientras que los pocillos designados para la detección de autoanticuerpo del suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal anti-[IgG humana] de ratón marcado con HRP. Las placas se lavaron posteriormente 4 veces mediante adición manual de TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) seguido de aspiración al vacío tal como se describe anteriormente en este Ejemplo. Los pocillos designados para la detección del marcador del epítipo de VSV-G recibieron entonces un anticuerpo monoclonal anti-VSV-G marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Clon P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Los pocillos designados para la detección de autoanticuerpo del suero recibieron un anticuerpo secundario monoclonal anti-[IgG humana] de ratón marcado con HRP (mínima reactividad cruzada con inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluido a 1/20.000 en

BSA/TBS-T al 1 %. Las placas se agitaron durante 30 minutos. Las soluciones se descargaron manualmente de las placas mediante volteo seguido por una vigorosa palmada de las placas volteadas sobre una toalla de papel seca para eliminar el fluido residual. Las placas después se lavaron tal como se describe anteriormente en este Ejemplo. Se generó una señal de quimioluminiscencia mediante la adición de 50 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal ELISA Pico (marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 minutos y después se leyeron en un lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición 1s, PMT de 650 V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA).

ELISA QUANTA Lite™ sp100

El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INOVA Diagnostics, San Diego, CA).

10 *Resultados:*

Los presentes inventores compararon su T²-ELISA con un ELISA comercial para ensayar la concordancia (**Figura 11**). Esto se hizo ensayando 35 sueros de cirrosis biliar primaria (CBP) para anticuerpos frente al autoantígeno conocido Sp100. El ELISA comercial (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) es un ELISA colorimétrico aprobado por la FDA y comprendido de autoantígeno inmovilizado sobre la superficie de la placa y se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se muestran en la **Figura 11** usando un subconjunto de la cohorte de CBP. El suero estándar de control positivo INOVA usado para calcular "unidades" se dejó correr sobre ambos ensayos para convertir las señales de cada ensayo a la misma escala (unidades/µl de suero neto). Ambos ensayos se puntuaron usando la metodología INOVA, es decir, positivo cuando las unidades son >25; que es a lo que se le asigna el suero de control positivo estándar "Bajo Positivo". Tal como indica la **Figura 11**, en términos de puntuar los sueros positivos o negativos, hay una perfecta concordancia. Sin embargo, el ensayo INOVA se satura muy rápidamente, mientras que el T²-ELISA presenta al menos un rango dinámico 5 veces más amplio.

Ejemplo 10: Comparación del T²-ELISA con un ELISA comercial convencional para la detección del autoanticuerpo p53 asociado a tumor de sueros de cáncer con el fin de evaluar la concordancia

Expresión del autoantígeno para T²-ELISA

25 Se clonó la totalidad de los marcos de lectura abierta (ORF) de p53, usando prácticas convencionales y aceptadas de biología molecular, en un vector de plásmido compatible con la expresión de proteínas sin células, que contienen el promotor T7 de la ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión a ribosoma), y HSV en C-terminal (QPELAPEDPED(SEQ ID NO: 20)) y marcadores de epítipo 6X His, además del inserto de ORF. Los vectores de expresión se verificaron para el inserto correcto de ORF usando secuenciación de ADN.

30 El autoantígeno p53 se produjo a partir del clon de plásmido mencionado anteriormente mediante expresión de proteínas sin células. Las reacciones de expresión de proteínas sin células se realizaron usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo acoplado a transcripción / traducción (TNT® T7 Quick para ADN de PCR; Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de expresión de autoantígeno contenían el ADN plasmídico afín, mientras que las reacciones de expresión en blanco carecían únicamente del ADN plasmídico. Las reacciones de expresión se detuvieron diluyendo a 1/20 en TDB [BSA al 1 % (p/v) y Triton X-100 al 0,1 % (v/v) en TBS-T (Tris 50 mM, a pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween-20 al 0,05 % (v/v))].

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (T²-ELISA) de autoantígenos

40 Los sueros (ProMedDx, Norton, MA) de 34 pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal (CCR) de etapas variables (que oscilan de la etapa I a la etapa IV del AJCC/UICC) y de 7 individuos sin enfermedad se seleccionaron sistemáticamente por duplicado para autoanticuerpos contra el autoantígeno de tumor p53 usando un ELISA comercial (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) comprendido de p53 expresado en células humanas y el T²-ELISA. Para el ELISA comercial, los sueros, aclarados previamente con una centrifugación de 5 minutos a 16.000 x g en una microcentrífuga a 4 °C, se diluyeron a 1:100 y se dejaron correr por duplicado siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante y descritas en las referencias [Oshikawa y Sugiyama (2000) Respir Med 94: 1085-91]. Un suero de control negativo validado (proporcionado por el fabricante) también se dejó correr por duplicado y se utilizó para determinar el fondo del ensayo. Las lecturas de absorbancia a 450 nm para cada pocillo se recolectaron en un espectrofotómetro de microplaca SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

50 Para la selección de sueros con el T²-ELISA, se usó el siguiente protocolo. Se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno no tratadas, de fondo plano, opacas, blancas, de 96 pocillos, marca Nunc Polysorp™ Microwell™ (marca Nunc de Thermo-Fisher Scientific, Rochester, NY) para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich. Las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de un anticuerpo de captura monoclonal de ratón anti-marcador HSV® (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en carbonato/bicarbonato de sodio a pH 9,3 durante 30 min con agitación (50 µl/pocillo). Las placas se lavaron entonces de forma manual 4 veces en 300 µl de TBS-T usando una pipeta multicanal para añadir el tampón de lavado y el volteo seguido por una vigorosa palmada de las placas volteadas sobre una toalla de papel seca para eliminar el tampón de lavado y el fluido residual. El bloqueo se realizó durante 30 minutos con 300 µl/pocillo en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. La solución se eliminó de las placas tal como se ha descrito y las reacciones de expresión sin células detenidas (es decir, diluidas) mencionadas

anteriormente se añadieron después a 100 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos. Las placas se lavaron como anteriormente y las muestras de suero (aclaramos previamente con una centrifugación de 5 minutos a 16.000 x g en una microcentrifuga a 4 °C) se diluyeron a 1/2.000 en BSA al 1 % (p/v) en TBS-T. Se añadió un volumen de 100 µl de suero/pocillo y las placas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra de suero se dejó 5 correr frente a los pocillos duplicados sobre cada una de las dos placas separadas, una que contiene el autoantígeno expresado sin células y la otra que contiene el blanco de expresión sin células (reacción de expresión menos molde de ADN). Tras la incubación del suero, se eliminó el suero mediante aspiración al vacío y las placas se lavaron 4 veces con TBS-T. Para la detección del autoanticuerpo del suero, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo secundario monoclonal de ratón anti-[IgG humana] marcado con HRP (mínima reactividad cruzada con la inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluidos a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Las placas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de lavado 4 veces 10 en 300 µl de TBS-T tal como se describe anteriormente. Se generó una señal de quimioluminiscencia mediante la adición de 50 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal ELISA FEMTO (marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 segundos a temperatura ambiente y después se leyeron en un lector de placas de luminiscencia LumiCount (exposición Is, PMT de 693V, ganancia 1) (Packard/PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, "MA").

Resultados:

Para ensayar la concordancia del T²-ELISA de los presentes inventores con el ELISA comercial en la detección de autoanticuerpos frente a p53, un autoantígeno de tumor conocido, se ensayaron por duplicado en cada uno de los 20 dos ensayos 34 sueros de pacientes de CCR (**Figura 12**, 1-34) y 7 sueros de individuos "normales" sin enfermedades [**Figura 12**, N1-N7 (enmarcados en el recuadro verde)]. Después de dejar correr cada ELISA, se calculó en primer lugar los valores de señal menos fondo para cada uno de los sueros. Para el ELISA comercial, el fondo se calculó como el promedio de los valores no tratados de cada uno de los dos pocillos sondeados con un suero negativo validado proporcionado por el fabricante. Este valor de fondo se restó después a los valores sin tratar 25 de cada uno de los pocillos de ensayo sondeados con sueros de CCR o "normal", produciendo valores duplicados de señal menos fondo para cada uno de los sueros. Nótese que se estableció un nivel de cero para estos valores de señal menos fondo (es decir, cualquiera de los valores negativos se estableció a cero). Los valores duplicados de señal menos fondo para cada uno de los sueros se promediaron después, produciendo un único valor promedio de señal menos fondo. Para el T²-ELISA, se determinó el fondo como el promedio de los pocillos duplicados para cada suero que se deja correr frente al blanco de expresión sin células (menos la reacción de molde de ADN). Este valor de fondo se restó de manera independiente a cada uno de los valores duplicados sin tratar para el mismo suero que se dejó correr frente al autoantígeno expresado sin células (p53) produciendo dos valores de señal menos fondo para cada uno de los sueros. Como con el análisis de los datos del ELISA comercial, de nuevo se estableció un nivel de cero para los valores de señal menos fondo. Los valores duplicados de señal menos fondo se promediaron 30 después, produciendo un único valor promedio de señal menos fondo para cada uno de los sueros. A continuación, tanto para el ELISA comercial como para el T²-ELISA, los sueros se puntuaron simplemente como analíticamente positivos o negativos (la **Figura 12** muestra solo aquellos sueros puntuados como analíticamente positivos) con el fin de comprobar la concordancia entre los dos ensayos. Para ello, se deben cumplir los dos siguientes criterios para que cada par suero-autoantígeno se haya puntuado como analíticamente positivo en el ELISA: i) un valor de p ≤0,05 en un test de la t de Student unilateral homocedástica de 1 cola en los valores no tratados del ELISA de los pocillos por duplicado de la señal de autoanticuerpo (suero frente a autoantígeno) en comparación con los valores de los pocillos duplicados de la señal de fondo (mismos pocillos de expresión de suero frente a blanco); ii) proporción señal frente a fondo del autoanticuerpo ≥2. Los pares de suero-autoantígeno que no cumplen estos criterios se establecen a 0. Finalmente, para cada ensayo, de manera independiente, los valores promedio de señal menos fondo de esos 35 sueros puntuados como analíticamente positivos se normalizaron al suero con el valor más alto en ese mismo ensayo (CCR 12 para el ELISA comercial y CCR19 para el T²-ELISA), que se estableció al 100 %. Estos valores normalizados se representaron gráficamente después con barras de error que representan las desviaciones estándar (**Figura 12**). Como se puede ver en la **Figura 12**, todos los sueros que puntuaron positivos para autoanticuerpos de p53 en el ELISA comercial también puntuaron positivos (también con una fuerza relativa de la señal aproximadamente igual) en el T²-ELISA. Además, un suero de CCR adicional (suero 18) pero no un suero normal adicional, se registró ligeramente positivo mediante el T²-ELISA y negativo mediante el ELISA comercial. Conjuntamente, los datos sugieren que el T²-ELISA es al menos tan sensible como el ELISA comercial y quizás puede incluso ser ligeramente más sensible tal como se indica mediante capacidad de identificar una muestra 40 adicional de CCR. Ningún ensayo detectó una señal de autoanticuerpo en ninguno de los sueros normales, lo que sugiere una concordancia muy buena con respecto a la especificidad, también.

Ejemplo 11: Un ensayo heterogéneo en fase sólida basado en reporteros dobles y marcadores de epítomos dobles como una herramienta para detectar interacciones con proteínas

El T²-ELISA marcado doblemente descrito en el Ejemplo 2 utiliza un sistema de un único reportero para la detección de autoanticuerpos y la normalización de proteína diana. Mientras que el Ejemplo 2 demuestra que el uso de pocillos separados para la lectura de sondas (autoanticuerpo en ese caso) y lectura de marcadores de epítomo, este Ejemplo 60 representa la capacidad del ensayo para detectar la unión de "sondas" (por ejemplo, fármacos, oligonucleótidos o anticuerpos) a las proteínas diana expresadas sin células e inmovilizadas en superficie mientras que es capaz de normalizar para la cantidad de proteína diana sobre la misma superficie (es decir, el mismo pozo), usando un

sistema de doble reportero. Aunque el Ejemplo mostrado aquí se refiere a la detección de la unión de autoanticuerpos del suero humano a autoantígenos expresados sin células como las proteínas diana, la metodología es ampliamente aplicable. Además, aunque el formato de ensayo usado en este Ejemplo es un formato de ELISA basado en placa de micropocillos (microtítulo), son posibles diversos formatos.

- 5 Con el fin de demostrar que es posible capturar un autoantígeno (proteína diana) en la placa de microtítulo bien con un marcador de epítipo (marcador de captura) y normalizar con el otro (marcador de detección), mientras que se lee la señal de autoanticuerpo (sonda) en el mismo pocillo, los presentes inventores realizaron el ensayo T²-ELISA tal como se describe en el Ejemplo 2, con las siguientes excepciones: tras la expresión sin células y la captura del antígeno, y la adición secuencial de los anticuerpos marcados con enzimas, también se añadieron dos sustratos quimioluminiscentes diferentes de manera secuencial, permitiendo así que las señales de unión de autoanticuerpos y las señales de marcador de detección (normalización) se lean secuencialmente dentro del mismo pocillo.

- Además de demostrar que la detección doble en el mismo pocillo es posible, los presentes inventores compararon directamente la detección de pocillo doble con la detección de un único pocillo en una variedad de autoantígenos con diversos sueros de pacientes, con el fin de demostrar las posibles ventajas de la normalización por pocillo, concretamente, normalizando para la posible expresión de proteína o variaciones de captura.

Expresión del autoantígeno

- Realizada como en el Ejemplo 2, con la excepción de Rap55, que se expresó a partir de un producto de PCR purificado en columna. Rap55 se amplificó por PCR a partir de ADNc usando las prácticas convencionales y aceptadas de biología molecular. Se diseñaron cebadores para producir un producto de PCR compatible con la expresión de proteínas sin células, que contienen el promotor T7 de la ARN polimerasa, una secuencia Kozak (de unión a ribosoma), un codón de iniciación, un marcador del epítipo VSV-G de N-terminal (YTDIEMNRLGK(SEQ ID NO: 19)), y un marcador del epítipo HSV de C-terminal (QPELAPEDPED(SEQ ID NO: 20)) además del inserto de Rap55.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (T²-ELISA) de autoantígenos

- 25 Realizada como en el Ejemplo 2, con las siguientes excepciones. Para el ensayo de doble reportero (diferente al ensayo de reportero único tal como se describe en el Ejemplo 2) no se separaron pocillos adicionales para la detección del marcador del epítipo VSV-G, dado que el marcador y la sonda (autoanticuerpo) se detectaron de forma secuencial en el mismo pocillo. Los anticuerpos marcados con enzimas se añadieron secuencialmente a todos los pocillos, seguido cada vez de lavado, tal como se describe a continuación: En primer lugar, se añadió anticuerpo secundario monoclonal de ratón anti-[IgG humana] marcado con fosfatasa alcalina (AP) (mínima reactividad cruzada con la inmunoglobulina de ratón; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) diluidos a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Después se agitaron las placas durante 30 minutos. Las soluciones se descargaron manualmente de las placas mediante volteo seguido por una vigorosa palmada de las placas volteadas sobre una toalla de papel seca para eliminar el fluido residual. Las placas después se lavaron manualmente tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 8. Este procedimiento se repitió para un anticuerpo monoclonal anti-VSV-G marcado con peroxidasa de rábano p picante (HRP) (Clon P5D4, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) diluido a 1/20.000 en BSA/TBS-T al 1 %. Se generó una señal de quimioluminiscencia mediante la adición de 50 µl/pocillo de sustrato de ELISA de quimioluminiscencia BM (detección de fosfatasa alcalina; Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras permitir que se desarrolle la señal, se leyeron las placas tal como se describe en el Ejemplo 8, seguido de una segunda lectura cuando se estableció la PMT en relación con la señal más alta sobre la placa. Tras leer la placa, la placa se lavó de forma manual seguido por la adición de 50 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal ELISA Pico (marca Pierce de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las placas se desarrollaron mediante agitación durante 15 minutos y después se leyeron tal como se describe en el Ejemplo 1, seguido de una segunda lectura cuando se estableció la PMT en relación con la señal más alta sobre la placa.

- A diferencia de los datos en la **Tabla IV**, los ELISAS de doble reportero y de reportero único realizados para la **Figura 13** se lavaron con la ayuda de un lavador de placas robótico. Específicamente, las placas se lavaron 6 veces en TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) en un lavador de placas robótico ELx405 Select (BioTek, Winooski, VT). Tras la adición del suero, con el fin de evitar la contaminación del lavador de placas robótico con suero humano, las placas se lavaron posteriormente 4 veces mediante adición manual de TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) seguido de aspiración al vacío y después se lavaron 6 veces en el lavador de placas robótico tal como se describe anteriormente en este Ejemplo.

Resultados:

- 55 En primer lugar, con el fin de establecer que el procedimiento de detección doble del T²-ELISA es tan eficaz como la detección simple, los presentes inventores compararon esto usando Rap55, un autoantígeno de CBP conocido, y una muestra de suero de paciente de CBP. Tal como se ve en la **Tabla IV-A**, la señal de (AP) del autoanticuerpo [calculada como el ruido de la señal de AP (es decir, el mismo suero frente a pocillos de expresión del blanco)] del ensayo de doble reportero se calculó como un porcentaje de la correspondiente señal de autoanticuerpo del ensayo

de (AO) de reportero único. Ambos procedimientos resultados casi idénticos (la señal AP del doble reportero fue del 97% del correspondiente reportero único, la señal HRP del doble reportero fue del 96 % del correspondiente reportero único), lo que demuestra claramente que la detección del marcador del epítipo VSV-G (HRP) no inhibe la posterior detección de la señal de autoanticuerpo (AP) en el mismo pocillo. Asimismo, la detección de autoanticuerpo (AP) no interfiere de manera significativa con la detección del marcador del epítipo VSV-G (HRP) en el mismo pocillo. Los presentes inventores también calcularon las proporciones de señal frente a ruido para la señal de autoanticuerpo (AP): [calculado como señal AP/ruido (es decir, los mismos pocillos de suero frente a blanco)] del ensayo de doble reportero en comparación con el ensayo de reportero único (**Tabla IV-B**) y demostró que la detección doble en el mismo pocillo no reduce las proporciones de señal frente a ruido en la más ligera.

En segundo lugar, los ensayos de T²-ELISA de doble reportero y de reportero único se compararon con varios pares de suero-antígeno. La **Figura 13** muestra los datos del ejemplo del T²-ELISA para sueros de pacientes normales, o de lupus eritematoso sistémico (LES) y CBP frente a una variedad de autoantígenos conocidos (CENPB, Ro-60, Smith B y Sp140). Como referencia, ya se sabía que las muestras eran positivas para los diversos autoantígenos tal como se documenta mediante la anotación clínica de las muestras. Los valores de ELISA de unidades de autoanticuerpo se determinaron para cada par suero-autoantígeno, para los que se calculó el promedio y la desviación estándar (barras de error) y se representó en la **Figura 13** de manera individual para los autoantígenos mencionados anteriormente. Nótese que se estableció un nivel de cero para las unidades de autoanticuerpo. Los sueros normales ensayados con CENPB son, de hecho, negativos como se esperaba. Las proporciones de señal frente a ruido de los resultados positivos varió del 3:1 (Smith B frente a SLE-H) a 300:1 (SP140 frente a PBC-I-21). Este experimento también compara el ensayo de doble reportero con un ensayo de reportero único en el que se usaron pocillos separados únicamente para la detección del marcador del epítipo de normalización VSV-G. La posible ventaja de la detección de reportero doble es que cada señal de autoanticuerpo se normaliza por pocillo para la posible expresión de proteína (por ejemplo, día a día) o variaciones de captura (intraensayo o interensayo). Los datos no muestran detrimento significativo del uso de ensayo de doble reportero. Además, tal como se esperaba, las desviaciones estándar del ensayo de doble reportero, que es una normalización por pocillo, son significativamente menores que en el ensayo de reportero único, que se normaliza solo por ensayo (por placa).

Ejemplo 12: Detección de autoanticuerpos frente a los nuevos autoantígenos de cirrosis biliar primaria (CBP) HK1 y KLHL12 expresados de manera recombinante en un sistema basado en germen de trigo y ensayados usado un recubrimiento directo de autoantígeno en la superficie de la placa de ELISA

Autoantígenos y ensayo ELISA

En este Ejemplo, una característica clave es que el ensayo ELISA se realizó en placas de microtítulo de poliestireno recubiertas directamente con autoantígenos prepurificados expresados de manera recombinante (en lugar de captura/purificación in situ mediada por anticuerpos en la superficie de la placa ELISA como en T²-ELISA). Otra característica notable es que HK1 y KLHL12 se expresaron en un sistema diferente en comparación con los ejemplos anteriores. Las proteínas recombinantes humanas HK1 y KLHL12 de longitud completa expresadas sin células en un sistema basado en germen de trigo y purificadas por su marcador de fusión de GST en N-terminal se encargaron de Abnova (Taiwan). Las placas se recubrieron toda la noche con 100 µl por pocillo de 0,5 µg/ml de proteína recombinante diluida en PBS. Tal como se detalla en el Ejemplo 2, las placas se lavaron después 6 veces en TBS-T (con los pocillos rellenos al máximo) y después se bloquearon durante 30 minutos a 300 µl/pocillo en BSA (p/v) al 1 % en TBS-T. La solución del bloque se eliminó de las placas y las muestras de suero (diluidas a 1/100) (diluyentes del sistema ELISA QUANTA Lite™, de INOVA Diagnostics; San Diego, CA) se añadieron a 50 µl/pocillo y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El lavado de las placas y la adición del anticuerpo secundario se describen en el Ejemplo 2. El ELISA se desarrolló usando el sustrato colorimétrico y la solución de parada del sistema ELISA QUANTA Lite™ de INOVA Diagnostics (San Diego, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados:

La **Figura 14** muestra que el ensayo colorimétrico funciona bien para HK1 frente a varios sueros de CBP y normales y los resultados concuerdan al 100 % con los resultados esperados (basándose en los resultados de la micromatriz y de T²-ELISA; véase los Ejemplos 1 y 2). Nótese que estas puntuaciones esperadas se indican mediante "+" y "-" en el gráfico. Nótese que la línea roja es el límite para este ensayo (establecido a 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas). Nótese también que esto es un recubrimiento directo de placa con un antígeno recombinante y aquí no hay resta del fondo (no es necesario sin anticuerpo de captura presente). Finalmente, nótese que, de hecho, se supone que N-03 sería positivo (y CBP-04 y CBP-05 negativo) basándose en los resultados previos de los Ejemplos 1 y 2.

De forma similar, la **Figura 15** para KLHL12 muestra los resultados del ensayo colorimétrico que concuerdan al 100 % con los resultados esperados (basándose en los resultados de la micromatriz y T²-ELISA; véase los Ejemplos 1 y 2). Nótese que estas puntuaciones esperadas se indican mediante "+" y "-" en el gráfico. El límite se indica como la línea roja y se estableció a 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas. Se espera que N-03 sea positivo y CBP-02 y CBP-07 negativo basándose en los resultados previos de los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 13: Detección de autoanticuerpos en cirrosis biliar primaria (CBP) usando homólogos de HK1 y KLHL12

La información de los siguientes párrafos se obtuvo de la base de datos UniProt disponible públicamente [TheUniProt-Consortium (2009) Nucleic Acids Res 37: D169-74] así como las diversas bases de datos del NCBI [National (United States) Center for Biotechnology Information] públicamente disponibles.

La Hexocinasa 1 (HK1) es una proteína que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias. El corte y empalme alternativo del gen que codifica la HK1 da como resultado cinco variantes del transcrito que codifican diferentes isoformas. Cada isoforma tiene un extremo N-terminal diferente pero el resto de la proteína es idéntico entre todas las isoformas [NCBI RefSeq]. Por lo tanto, es razonable asumir que cualquiera de las isoformas mencionadas anteriormente sería suficiente para la detección de autoanticuerpos para hexocinasa 1 en cirrosis biliar primaria (CBP).

Además, la hexocinasa 1 es un miembro de una familia de proteínas, que incluye hexocinasa 2, hexocinasa 3, glucocinasa (hexocinasa 4) y el dominio de hexocinasa que contiene 1. Las proteínas mencionadas anteriormente demuestran una homología de secuencia significativa, (por ejemplo, usando la herramienta BLAST del NCBI, la HK1 y la HK2 humanas tienen el 73 % de identidades y el 86 % de positivos; registro del NCBI BC008730.2 secuencia codificante y NP_000180.2, respectivamente) así como comparten dominios conservados comunes, incluyendo los dominios_1 y _2 de hexocinasa (pfam00349 y pfam03727, respectivamente), así como los multidominios conservados COG5026 de hexocinasa [transporte y metabolismo de carbohidratos].

La proteína 12 tipo Kelch (KLHL12) es una proteína implicada en la conjugación de ubiquitina ligasa y en la vía de señalización celular wnt. Contiene 6 dominios de repetición de kelch y un dominio BTB (POZ). Existen varias proteínas de tipo Kelch y otras que contienen los dominios mencionados anteriormente (por ejemplo, véase la Tabla VI).

Debido a la similitud de secuencias de las proteínas y al fenómeno de extensión intra e intermolecular del epítipo [Vanderlugtand Miller (2002) Nat Rev Immunol2: 85-95], los presentes inventores esperaban por completo que los homólogos de HK1 y KLHL12 mencionados anteriormente (véase también los Ejemplos en la Tabla VI) presentasen un rendimiento similar con respecto a la detección de autoanticuerpos específicos de la enfermedad en la cirrosis biliar primaria (CBP). Además, el uso de homólogos puede aumentar la sensibilidad y/o la especificidad del diagnóstico. En este Ejemplo, esto se evaluará.

Expresión del autoantígeno

Se realizará como en el Ejemplo 3, salvo en que los homólogos de HK1 y KLHL12 se expresarán y se usarán como autoantígenos para la detección de autoanticuerpos, tales como los mencionados anteriormente en este Ejemplo y los ejemplos de homólogos enumerados en la Tabla VI.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble marcador (T²-ELISA) de autoantígenos

Se realizará como en el Ejemplo 3.

Resultados:

Como en el Ejemplo 3, con el fin de establecer los umbrales de puntuación del diagnóstico para una especie de autoantígeno dada, se dejará correr el ensayo T²-ELISA sobre un grupo de 22 sueros de pacientes normales y después se establecerán los límites a 2 desviaciones estándar por encima de la media para esta cohorte normal, para una confianza estadística del 95 %. El uso de este procedimiento a 2-3 desviaciones estándar es una práctica común (por ejemplo, [Liu, Wang, Li, Xu, Dai, Wang y Zhang (2009) Scand J Immunol 69: 57-63]). Entonces se dejará correr el T²-ELISA sobre 22 sueros de pacientes de CBP (por ejemplo, 22 negativos en AAM y/o 22 positivos en AAM). Los límites específicos del autoantígeno entonces se usarán para puntuar tanto los pacientes normales como los de CBP como autoanticuerpos negativos o positivos. Los cálculos de unidades de autoanticuerpos y los datos de procesamiento se realizarán como en el Ejemplo 3. Los cálculos de la sensibilidad de diagnóstico y la especificidad para cada especie de autoantígeno se realizará entonces como en el Ejemplo 3.

Debido a la similitud de secuencias de las proteínas y al fenómeno de extensión intra e intermolecular del epítipo [Vanderlugt y Miller (2002) Nat Rev Immunol 2: 85-95], la expectativa es que al menos algunos de los homólogos de HK1 y KLHL12 mostrarán un rendimiento de diagnóstico similar al del Ejemplo 3 para positivos en AAM y el Ejemplo 4 para CBP negativa en AAM en el que se usaron los propios HK1 y KLHL12 humanos. También se espera que algunos puedan rendir mejor, bien en sensibilidad de diagnóstico o en especificidad o ambos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Prevalidación basada en ELISA del autoantígeno de CBP hexocinasa 1 (HK1) en muestras de suero positivas y negativas seleccionadas aleatoriamente a partir de los análisis de micromatrices. Los datos representados gráficamente son del ELISA. El "+" y el "-" denotan si un suero dado era positivo o negativo

para autoanticuerpos de HK1 basándose bien en los análisis del ensayo "ELISA" o de micromatriz ("matriz"). Las muestras de suero prefijadas con "N" son de individuos sanos, "CBP" de pacientes de cirrosis biliar primaria y "LES" de pacientes de lupus eritematoso sistémico. El cálculo de unidades de autoanticuerpo a partir del ensayo ELISA se detallan en el Ejemplo 2.

5 **Figura 2: Prevalidación basada en ELISA del autoantígeno de CBP proteína 12 tipo Kelch (KLHL12) en muestras de suero positivas y negativas seleccionadas aleatoriamente a partir de los análisis de micromatrices.** Los datos representados gráficamente son del ELISA. El "+" y el "-" denotan si un suero dado era positivo o negativo para autoanticuerpos de KLHL12 basándose bien en los análisis del ensayo "ELISA" o de micromatriz ("matriz"). Las muestras de suero prefijadas con "N" son de individuos sanos y "CBP" de pacientes de cirrosis biliar primaria. El cálculo de unidades de autoanticuerpo a partir del ensayo ELISA se detallan en el Ejemplo 2.

10 **Figura 3: Validación basada en ELISA del autoantígeno de CBP hexocinasa 1 (HK1) en una nueva cohorte de pacientes de CBP no ensayada antes sobre micromatrices de proteoma.** Los datos representados gráficamente son las unidades de autoanticuerpo transformadas en Log_2 a partir del análisis de ELISA. El cálculo de unidades de autoanticuerpo a partir del ensayo ELISA se detallan en el Ejemplo 2. Las muestras de pacientes se puntuaron como HK1 negativo o positivo basándose en los valores límite (línea roja punteada) que se calcularon tal como se detalla en el Ejemplo 3. La zona del recuadro rojo indica la cohorte de CBP y la región no recuadrada la cohorte normal.

15 **Figura 4: Validación basada en ELISA del autoantígeno de CBP proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12) en una nueva cohorte de pacientes de CBP no ensayada antes sobre micromatrices de proteoma.** Los datos representados gráficamente son las unidades de autoanticuerpo transformadas en Log_2 a partir del análisis de ELISA. El cálculo de unidades de autoanticuerpo a partir del ensayo ELISA se detallan en el Ejemplo 2. Las muestras de pacientes se puntuaron como KLHL12 negativo o positivo basándose en los valores límite (línea roja punteada) que se calcularon tal como se detalla en el Ejemplo 3. La zona del recuadro rojo indica la cohorte de CBP y la región no recuadrada la cohorte normal.

20 **Figura 5: Detección del autoantígeno de CBP hexocinasa 1 (HK1) sobre una nueva cohorte de CBP negativa en anticuerpo antimitocondrial (AAM).** Los datos representados gráficamente son las unidades de autoanticuerpo transformadas en Log_2 a partir del ensayo de ELISA, tal como se calcula en el Ejemplo 2. La línea de puntos rojos indica el umbral de puntuación de diagnóstico, tal como se determina previamente en el Ejemplo 3. HK1 detectó 4 de 17 pacientes de CBP negativos en AAM (sensibilidad del 24 %). Cabe destacar que, un paciente de CBP negativo en AAM (barra verde) se detectó mediante HK1 pero no se detectó mediante ninguno de los ensayos de ELISA para CBP de INOVA Diagnostics aprobados por la FDA.

25 **Figura 6: Detección del autoantígeno de CBP proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12) sobre una nueva cohorte de CBP negativa en anticuerpo antimitocondrial (AAM).** Los datos representados gráficamente son las unidades de autoanticuerpo transformadas en Log_2 a partir del ensayo de ELISA, tal como se calcula en el Ejemplo 2. La línea de puntos rojos indica el umbral de puntuación de diagnóstico, tal como se determina previamente en el Ejemplo 3. KLHL12 detectó 6 de 17 pacientes de CBP negativos en AAM (sensibilidad del 35%). Cabe destacar que, un paciente de CBP negativo en AAM (barra verde) se detectó mediante KLHL12 pero no se detectó mediante ninguno de los ensayos de ELISA para CBP de INOVA Diagnostics aprobados por la FDA.

30 **Figura 7: Diagrama de Venn - nuevos autoantígenos específicos de CBP, HK1 y KLHL12, capturan pacientes de CBP negativos a AAM previamente indetectables.** Cada número representa un paciente.

35 **Figura 8: La detección de hexocinasa 1 (HK1) y proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12), además del ensayo de MIT3 de INOVA Diagnostic, puede revelar un gran número de pacientes de CBP no diagnosticados anteriormente con tinción atípica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Las muestras del suero prefijadas con "Cyto" o "NM" son de pacientes con tinción IFI difusa de membrana citoplasmática o nuclear, respectivamente. Para evitar los efectos de escala, los datos representados en la gráfica para cada antígeno en la se normalizan como un porcentaje del paciente que tiene las máximas unidades de autoanticuerpo para ese antígeno (ese paciente se marca con una flecha azul para cada antígeno). Los presentes inventores establecen el eje Y al límite de MIT3 de INOVA de 25 unidades, que se correspondía con el 17 %. Todas las barras mostradas en el gráfico representan resultados positivos y la ausencia de una barra, un resultado negativo. El "alto positivo" es un suero seleccionado de control positivo para cada uno de los autoantígenos.

40 **Figura 9A: Detección de HK1 mediante ELISA colorimétrico en pacientes de CBP seleccionados - Concordancia con lectura de ELISA de quimioluminiscencia.** Los resultados del ELISA colorimétrico se representan como la señal menos el fondo, siendo el fondo el mismo suero que se deja correr frente a un blanco de expresión (sin antígeno expresado). La puntuación de ELISA quimioluminiscente se indica por debajo del eje X mediante un "+" (positivo) o "-" (negativo). Las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente fueron las que ya se determinaron en el Ejemplo 4 para los mismos sueros. La barra con el contorno verde se corresponde con la misma muestra del Ejemplo 4 (PB-AMN-044) para obtener una puntuación negativa en todos los ensayos de

ELISA de CBP disponibles de INOVA Diagnostics pero positivo para HK1.

Figura 9B: Detección de KLHL12 mediante ELISA colorimétrico en pacientes de CBP seleccionados - Concordancia con lectura de ELISA de quimioluminiscencia. Los resultados del ELISA colorimétrico se representan como la señal menos el fondo, siendo el fondo el mismo suero que se deja correr frente a un blanco de expresión (sin antígeno expresado). La puntuación de ELISA quimioluminiscente se indica por debajo del eje X mediante un "+" (positivo) o "-" (negativo). Las puntuaciones para el ELISA quimioluminiscente fueron las que ya se determinaron en el Ejemplo 4 para los mismos sueros. La barra con el contorno verde se corresponde con la misma muestra del Ejemplo 4 (PB-AMN-263) para obtener una puntuación negativa en todos los ensayos de ELISA de CBP disponibles de INOVA Diagnostics pero positivo para KLHL12.

Figura 10: Análisis colorimétrico por transferencia de puntos del autoantígeno de CBP HK1 sondeado con sueros de pacientes de CBP y normales. El autoantígeno de CBP recientemente descubierto HK1 se colocó en puntos sobre nitrocelulosa, así como el tampón (control negativo) y la IgG humana (control positivo). Se permitió la unión de los sueros diluidos de un paciente de CBP y un paciente normal y se lavó antes de añadir anti-IgG humana marcada con oro coloidal. "hIgG" es un control positivo de IgG humana; "AAg" es el nuevo autoantígeno de CBP HK1; "Ctrl" es el control negativo (tampón de vehículo).

Figura 11: Comparación del T²-ELISA con un ELISA comercial (INOVA Diagnostics) usando el autoantígeno Sp100 y los sueros de CBP. Las muestras de suero prefijadas con "CBP" son de pacientes de cirrosis biliar primaria. La región del recuadro rojo representa los resultados del ELISA de INOVA; La región del recuadro amarillo representa los resultados del T²-ELISA. *Las unidades por encima del control "bajo positivo" (línea roja) se puntúan como diagnósticamente positivas.

Figura 12: T²-ELISA frente al ELISA convencional para la detección de autoanticuerpo de p53 en sueros de cáncer. Los sueros normales se prefijan con una "N" (recuadro en verde) y todos los otros son sueros de CCR. Los datos se normalizan como un porcentaje de los sueros máximos para ese ensayo.

Figura 13: Ensayos de T²-ELISA de doble reportero y de reportero único frente a diversos pares de suero-antígeno. Los datos representados gráficamente son las unidades de autoanticuerpo a partir del análisis de ELISA. El cálculo de unidades de autoanticuerpo a partir del ensayo ELISA se detallan en el Ejemplo 12. El texto azul denota el antígeno. Las muestras de suero prefijadas con "N" son normales (de individuos sanos), "LES" de lupus eritematoso sistémico y "CBP" cirrosis biliar primaria.

Figura 14: Detección de autoanticuerpo en ELISA con el autoantígeno hexocinasa 1 humana (HK1) recubierto directamente con superficie de placa de microtitulación de poliestireno. El autoantígeno de la proteína recombinante expresada previamente purificada se unió directamente a la superficie de la placa ELISA de microtitulación de poliestireno y se usó para analizar el suero del paciente en busca de autoanticuerpos. El resultado esperado, basándose en los datos previos de micromatriz y T²-ELISA (Ejemplos 1 y 2) se enumera por debajo del eje X como "+" (autoanticuerpo positivo) o "-" (autoanticuerpo negativo). El resultado real del ensayo en este Ejemplo se muestra basándose en el límite de puntuación en el gráfico de barras (línea punteada roja), que se calculó como 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas.

Figura 15: Detección de autoanticuerpo en ELISA con el autoantígeno proteína 12 de tipo Kelch humana (KLHL12) recubierto directamente con superficie de placa de microtitulación de poliestireno. El autoantígeno de la proteína recombinante expresada previamente purificada se unió directamente a la superficie de la placa ELISA de microtitulación de poliestireno y se usó para analizar el suero del paciente en busca de autoanticuerpos. El resultado esperado, basándose en los datos previos de micromatriz y T²-ELISA (Ejemplos 1 y 2) se enumera por debajo del eje X como "+" (autoanticuerpo positivo) o "-" (autoanticuerpo negativo). El resultado real del ensayo en este Ejemplo se muestra basándose en el límite de puntuación en el gráfico de barras (línea punteada roja), que se calculó como 2 desviaciones estándar por encima de la media para las 4 muestras negativas esperadas.

Figura 16: Datos de autoanticuerpos de micromatriz de proteoma (protomatriz) normalizados al cuantil para la hexocinasa 1 humana (HK1) para 92 muestras de suero distintas. La intensidad de la señal de fluorescencia de autoanticuerpos, "señal de matriz" (cuantil normalizado en todo el conjunto de micromatrices de 92 miembros por lotes), para cada una de las muestras de suero del paciente se muestra para el nuevo autoantígeno humano HK1. CBP = Cirrosis biliar primaria; Normal o Norm = Individuos sanos; LES = Lupus eritematoso sistémico; SSj = síndrome de Sjögren; CCR = Cáncer colorrectal; HAI = hepatitis autoinmune.

Figura 17: Datos de autoanticuerpos de micromatriz de proteoma (protomatriz) normalizados al cuantil para la proteína 12 de tipo Kelch humana (KLHL12) para 92 muestras de suero distintas. La intensidad de la señal de fluorescencia de autoanticuerpos, "señal de matriz" (cuantil normalizado en todo el conjunto de micromatrices de 92 miembros por lotes), para cada una de las muestras de suero del paciente se muestra para el nuevo autoantígeno humano KLHL12. CBP = Cirrosis biliar primaria; Normal o Norm = Individuos sanos; LES = Lupus eritematoso sistémico; SSj = síndrome de Sjögren; CCR = Cáncer colorrectal; HAI = hepatitis autoinmune.

Acceso NCBI GenBank (ID de ácido nucleico que codifica proteína)	Gen	Encabezamiento de fasta/Descripción	P-valor de estadísticos de M	Sensibilidad de diagnóstico (S) & especificidad (P) en CBP frente a todos los no CBP
BC008730.2	HK1	>gi 33869444 gb BC008730.2 Homo sapiens hexokinase 1, transcript variant 1, mRNA (cDNA clone MGC:1724 IMAGE: 3163058), complete cds	0,00000000012	Mediante el procedimiento de clasificación de éxito: (S) 89 % (P) 84 % Mediante el procedimiento de los estadísticos de M: (S) 85 % (P) 90 %
NM_021633.2	KLHL12	>gi 21361889 ref NM_021633.2 Homo sapiens kelch-like 12 (Drosophila) (KLHL12), mRNA	0,000076	Mediante el procedimiento de clasificación de éxito: (S) 33% (P) 98% Mediante el procedimiento de los estadísticos de M: (S) 40% (P) 97%

Sueros positivos en CBP y negativos en AAM						
ID de los sueros	INOVA				AmberGen	
	MIT3	Gp210	Sp100	CBP de selección de IgG/IgA	HK1	KLHL12
PB-AMN-005	-	-	+	+	+	-
PB-AMN-031	+	-	+	+	-	-
PB-AMN-033	+	-	E	+	-	-
*PB-AMN-044	-	-	-	-	+	-
PB-AMN-077	-	-	+	E	-	+
^Δ PB-AMN-084	-	-	-	-	-	-
PB-AMN-095	-	+	-	+	E	-
PB-AMN-105	-	+	-	-	-	-
PB-AMN-109	-	-	+	+	-	+
PB-AMN-110	+	-	+	+	-	+
PB-AMN-120	+	+	-	+	+	+

(continuación)

Tabla II: Resultados compilados de ELISA para autoantígenos específicos de CBP en sueros de CBP negativos a anticuerpos antimitocondriales (AAM)						
Sueros positivos en CBP y negativos en AAM						
	INOVA				AmberGen	
PB-AMN-217	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-223	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-224	-	-	+	+	-	+
PB-AMN-225	-	-	+	+	-	-
PB-AMN-262	-	-	+	+	+	-
*PB-AMN-263	-	-	-	-	-	+
*	Negativo mediante los 4 ensayos de INOVA pero detectado mediante AmberGen					
△	Negativo mediante los ensayos de INOVA y AmberGen					
E	Presencia o ausencia equívoca de autoanticuerpos incapaces de ser determinados					

Tabla III: Puntuaciones de ELISA para sueros de pacientes de CBP. E = equívoca, es decir, no concluyente (demasiado cerca del límite; solo usado en ensayo de INOVA). Los asteriscos indican muestras negativas para Sp100 pero positivas para Sp140.

ID del suero	Sp100		Sp140
	Puntuación de INOVA	Puntuación de T ² -ELISA	Puntuación de T ² -ELISA
PB-AMP-002	+	+	+
PB-AMN-005	+	+	-
PB-AMP-006	-	-	-
PB-AMP-011	-	-	-
PB-AMP-018	+	+	-
*PB-AMP-020	-	-	+
PB-AMP-021	+	+	+
PB-AMP-024	+	+	-
PB-AMP-029	+	+	-
PB-AMN-031	+	+	-
PB-AMN-033	E	-	-
PB-AMP-035	+	+	-
PB-AMP-036	+	+	-
PB-AMP-039	+	+	+
PB-AMP-046	-	-	-
PB-AMP-047	+	+	+
PB-AMP-048	+	+	-
PB-AMP-059	+	+	-
PB-AMP-063	+	+	-
PB-AMP-066	+	+	-
PB-AMP-068	E	-	-
PB-AMN-077	+	+	+
PB-AMP-080	+	+	-
*PB-AMN-084	-	-	+
PB-AMP-102	+	+	-

(continuación)

Tabla III: Puntuaciones de ELISA para sueros de pacientes de CBP. E = equívoca, es decir, no concluyente (demasiado cerca del límite; solo usado en ensayo de INOVA). Los asteriscos indican muestras negativas para Sp100 pero positivas para Sp140.

ID del suero	Sp100		Sp140
	Puntuación de INOVA	Puntuación de T ² -ELISA	Puntuación de T ² -ELISA
PB-AMN-109	+	+	+
PB-AMN-110	+	+	-
PB-AMP-113	+	+	-
PB-AMP-122	+	+	+
PB-AMN-217	+	+	+
PB-AMP-218	+	+	-
PB-AMN-223	+	+	+
PB-AMN-224	+	+	-
PB-AMN-225	+	+	-
PB-AMN-262	+	+	+

Tabla IV: El ELISA de doble detección es tan eficaz como el ELISA de detección única

A. Reportero único (control) frente a reportero doble (porcentaje de control) T²-ELISA frente al autoantígeno Rap55 y suero de paciente de CBP

Porcentaje de control		
Reportero marcado Sondas añadidas	Detección de AP (autoanticuerpo)	Detección de HRP (Expresión de autoantígeno Rap55)
anti-VSV-HRP	0,02	100,00 (control)
anti-AP humana	100,00 (control)	0,23
anti-VSV-AP, después anti-AP humana	97,38	96,48

B. Reportero único frente a reportero doble T²-ELISA frente al autoantígeno Rap55 y suero del paciente de CBP (señal frente a ruido)

Señal frente a Ruido		
Reportero marcado Sondas añadidas	Detección de AP (autoanticuerpo)	Detección de HRP (Expresión de autoantígeno Rap55)
anti-VSV-HRP	3,98	697,86 (control)
anti-AP humana	20,15 (control)	4,51
anti-VSV-AP, después anti-AP humana	20,22	760,00

Tabla V: Hexocinasa 1 humana (HK1) y proteína 12 tipo Kelch (KLHL12) humana Secuencias en ProtoArray v.4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Ejemplo 1), en el T ² -ELISA (varios Ejemplos) y en el ELISA convencional del Ejemplo 12.	Acceso a proteína o GenBank del NCBI	Encabezamiento de fasta/Descripción	Secuencia
BC008730.2 SEQ NO: 1	>gij33869444 gb BC008730.2 Homo sapiens hexokinase 1, transcript variant 1, mRNA(cDNA clone MGC:1724 IMAGE: 3163058), complete cds		<p>MTAAQLLAYFTELEKDDQVKKIDKYLAMRLSDEILIDIMTRFERKEMKNGLSRDNFPTA TVKMLPTFVRSIPDGEKGFIALDLGGSSFRILRVQVNHKQNVHMESEYDIPENI VHGSGQLFDFHVAECLGDFEMKRRKIKDKLEVFTEFPCQQSKIDEALLIITWREKA SGVEGAPVVKLLNKAIKRGDYDANIVAVVNDIVGTMTCGDDQHCVEVGLIIGTGTA CYMEELRHIDIVEGDEGRMCINTEWGAFGDDGSLIEDIRTEFDREIDRGLNPKQLFEK MVSQMYLGEIVRLIIVKMAKGLLFEGRITPELLTRGKENTSDVSAIEKNKGLHNAKE ILTRLGVPEPDDDCVSVQHVCTIVSFRSANLVAATILGAILNRLRDNKGTPLRRTIVGVD GSLYKTHPQYSRREHKLRLRVPDSDVRFLLSESGSGKAAMVTAVYRLAEQHRQIEE TLAHFLTKDMLLEVKKRMAEMELGLRQKQTHNNAVVKMLP SFVRRTPDGTENGDFIAL DLGGTFRVLLVTKRS GKRRVEMHNKIYALPIEMQGTGEELEFDHIVSCISDFLDYMG IKGPRMELGFTFSPCQQTSLDAGILITWTKGFKATDCVGHVVDLRLDAIKRREFFDL DVAVVNDIVGTMTCAYEPTCEVGLIVGTGSNACIEMEKNVEMVEGDQCMCINME WGAFGDNGCLDDIRTHYDRLVDEYSINAGKQRYERKISGMYLGEIVRNILIDFKKGFLL FRQISETLKRGIETKFLSQIESDRIALIQVRAILQQGLGINSCTCDDSIIVKTVCGVV SRAAQICGAGMAAVVDKIRENREGDLRLNVIVGVDGTLVYKLFHFSTRIMHQIVKLELSPK CNVSEFLLSEDSGSGKAALITAVGVRLRTEASS</p>
NM_021633.2 SEQ NO: 2	>gij21361889 ref NM_021633.2 Homo sapiens kelch-like 12 (Drosophila) (KLHL12), mRNA		<p>MGGIMAPKDIMTNHAKSLINMNSLRKSNLCTVTLRVEQKDFPAHRIVLAACSDYFC AMFTSELSEKGPVYDIQGLTASTIMEILLDFVYETVTHVTVENVQELLPAAQLLQKGV KQACCFELESQLEDFSNCLGIRDFAEHNCVDLMQAAEVFSQKHFPEVVQHEEFILLSQG EVEKLIKCDEIQVDSEEPVFEAVINWVKHAKKEREELPMLLQVVRMELLPFRYITDVI DAEPPFRCSLQCRDLVDEAKKFLRPELRSQMGEPTRARLIGANEVLLVWGFSGQSP IDVVEKYDFKIQEWSFLFSITRKRRYVASVSIHDIRIYVIGGYDGRSLSVECLDYTAD EDGVWYSVAFMNVRRGLAGATILGDMIVVSGGFDGSRRTSMERYDPNIDQWSMLGDMQ TAREGALVVASGVLYCLGGYDGLNILLNSVEKYDPTHTGHWNTVTPMATKRSAGAVLLN DHIYVYVGGFDGTAHLSVFEAYNTRTDSWITVTSMTPTPRCVVGTATVLRGRLYALAGYDGN SLLSSTECYDPIIDSWEVVVSMGTQRCDAGVCLREK</p>

(continuación)

<p>T²-ELISA - HK1 y KLHL12 humanas recombinantes expresadas sin células en un lisado de reticulocitos de conejo. Nótese que las secuencias subrayadas son marcadores de epítomos añadidos por vía exógena en N-terminal y en C-terminal así como secuencias que derivan de vector.</p>	<p>>gij51484591 gbjCV026580 .1 CV026580 4566 Full Length cDNA from the Mammalian Gene Collection Homo sapiens cDNA 5' similar to BC008730 (HK1), mRNA sequence</p>	<p>MAIYTDIEMNRLGKMIAAQLLAYFTELDKDDQYKIDKYL YAMRLSDETLIDIMTRFRK EMKNGLSRDNFTATVTKMLP TFRVSPDGEKGFIALDLGGSSFRILRVQVNHKRNQ VHMSEVYDIPENIVHGSQS QLFDFHVAECIDGDEWKRKIKDKKLPVGF TFSFPCQOSKI DEALIIITWKRFAKSGVGEADVVVKKLINKAIKKKGDYDANI VAVVNDIVGTMTFCGYDDQ HCEVGLIIGITNACYMEELRHIDIVGDEGRMCINTEWGAFGDDGSLIEDIRTEFDREI DRGSLNEGKQLFEKMWVSGMYLGEIVLRLIVKMAKEGLLFEGRITPELLIRGKENTSDVS AIEKNKEGLHNAKEILLTRIGVEPDDDCVSVQVCTIVFSRANLVAATLGAALNRLRD NKGTPRLRTTVGDSGLYKTHPQYSRRFHTLRLRVPDSDVRFLLSESGSGKGAAMVTA VAYRLAEQRQIEETLAHFHLTKMLLEVKKRAEMELGKQTHNNAVVKMLP SFVR RTPDGTENGDFLALDLGGTFRVLLVKSRSKRRKIVEMHNKIYALP IELMQGTGELEFD HIVSICISDFLDYMGIKGRMPLGFTFSCQQTSLDAGILITWKGFKATDCVGHVVT LLRDAIKRREFFDLDDVAVVNDIVGTMTTCAYEEP TCEVGLIVGTGSNACYMEEMKNVE MWFGDQGCINMEWGAFGDNGCLDDIRTHYDRIVDEYSLNAGKQRYEKMI SGMYLGEI VRNLLIDFTKKGFLFRGQLSETLKTRGIFETKELSQIESDRLALLQVRAILLQQLGNST CDSIILVKIVCGVSRRAAQCGAGMAAVVDKIRENRLGLDRLNVTGVDGTLTKLHPHF SRIMHQIVKELSPKCNVSEFLSEDSGSGKAALITAVGVRLRTEASSLSRELVDPNSVQA RLQDVGDTIDTRSKLAAALQLYTRASQPELAPEDPELEHHHHH</p>					
<p>Tabla V: Hexocinasa 1 humana (HK1) y proteína 12 tipo Kelch (KLHL12) humana Secuencias en ProtoArray v.4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Ejemplo 1), en el T²-ELISA (varios Ejemplos) y en el ELISA convencional del Ejemplo 12.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="826 300 869 1064">Acceso a proteína o GenBank del NCBI</th> <th data-bbox="826 300 869 1064">Encabezamiento de fasta/Descripción</th> <th data-bbox="826 300 869 1064">Secuencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="869 300 1085 1064"> <p>BC003183.1 SEQ NO: 4</p> </td> <td data-bbox="869 300 1085 1064"> <p>>gij 13112018 gbjBC003183 .11 Homo sapiens kelch-like 12 (Drosophila), mRNA (cDNA MGC:44351MAGE:2958852), complete cds</p> </td> <td data-bbox="869 300 1085 1064"> <p>MYTDIEMNRLGKMGIMAPKD LMTNPHAKS ILLNSMNSLRKSNITLCDVTLRVEQKDFPAH RIVLAAQSDYFCAMFTSELSEKGP YVDIQGLTASTWELILLDFVYETVHVTVENVQEL LPAACLLQKGVKQACCEFFLESQLDPSNCLGIRDFAETHNCVDLMQAAEVF SQKHFPEV VQHEEFLLSQGEVEKLIKCDIEIQVDESEFVFEAVINWVKHAKKEREFSLPNLLQVVRM PLLTPRYITDVIDAEFFIRCSLQCRDLVDEAKKEHLRPELRSQMQPRTARLIGANEVL LVVGGGSGQSPIDVVEKYPDKIQEWSFLPSITRKRRYVASVSLHRIYVI GYDGRSR LSSVECLDYTADEDGVWYVAPMNVRRGLAGATLGDMIYVSGGFDGSRHTSMERYDP NIDQWSMLGDMQTAREGALVVASGVIYCLGGYDGLNLLNSVEKYDHPHTGHWTNVTFMA TKRSGGVALLNDRHIYVGGFDGTAHLSVVEAXNIRIDSWTIVTSMITPRCYGATVLR GRLYAYTAGYDGNLSLSSIECYDPIIDSWEVVVTSMTGTCRCDAGVCVLRKQPELAPEDPE</p> </td> </tr> </tbody> </table>	Acceso a proteína o GenBank del NCBI	Encabezamiento de fasta/Descripción	Secuencia	<p>BC003183.1 SEQ NO: 4</p>	<p>>gij 13112018 gbjBC003183 .11 Homo sapiens kelch-like 12 (Drosophila), mRNA (cDNA MGC:44351MAGE:2958852), complete cds</p>	<p>MYTDIEMNRLGKMGIMAPKD LMTNPHAKS ILLNSMNSLRKSNITLCDVTLRVEQKDFPAH RIVLAAQSDYFCAMFTSELSEKGP YVDIQGLTASTWELILLDFVYETVHVTVENVQEL LPAACLLQKGVKQACCEFFLESQLDPSNCLGIRDFAETHNCVDLMQAAEVF SQKHFPEV VQHEEFLLSQGEVEKLIKCDIEIQVDESEFVFEAVINWVKHAKKEREFSLPNLLQVVRM PLLTPRYITDVIDAEFFIRCSLQCRDLVDEAKKEHLRPELRSQMQPRTARLIGANEVL LVVGGGSGQSPIDVVEKYPDKIQEWSFLPSITRKRRYVASVSLHRIYVI GYDGRSR LSSVECLDYTADEDGVWYVAPMNVRRGLAGATLGDMIYVSGGFDGSRHTSMERYDP NIDQWSMLGDMQTAREGALVVASGVIYCLGGYDGLNLLNSVEKYDHPHTGHWTNVTFMA TKRSGGVALLNDRHIYVGGFDGTAHLSVVEAXNIRIDSWTIVTSMITPRCYGATVLR GRLYAYTAGYDGNLSLSSIECYDPIIDSWEVVVTSMTGTCRCDAGVCVLRKQPELAPEDPE</p>
Acceso a proteína o GenBank del NCBI	Encabezamiento de fasta/Descripción	Secuencia					
<p>BC003183.1 SEQ NO: 4</p>	<p>>gij 13112018 gbjBC003183 .11 Homo sapiens kelch-like 12 (Drosophila), mRNA (cDNA MGC:44351MAGE:2958852), complete cds</p>	<p>MYTDIEMNRLGKMGIMAPKD LMTNPHAKS ILLNSMNSLRKSNITLCDVTLRVEQKDFPAH RIVLAAQSDYFCAMFTSELSEKGP YVDIQGLTASTWELILLDFVYETVHVTVENVQEL LPAACLLQKGVKQACCEFFLESQLDPSNCLGIRDFAETHNCVDLMQAAEVF SQKHFPEV VQHEEFLLSQGEVEKLIKCDIEIQVDESEFVFEAVINWVKHAKKEREFSLPNLLQVVRM PLLTPRYITDVIDAEFFIRCSLQCRDLVDEAKKEHLRPELRSQMQPRTARLIGANEVL LVVGGGSGQSPIDVVEKYPDKIQEWSFLPSITRKRRYVASVSLHRIYVI GYDGRSR LSSVECLDYTADEDGVWYVAPMNVRRGLAGATLGDMIYVSGGFDGSRHTSMERYDP NIDQWSMLGDMQTAREGALVVASGVIYCLGGYDGLNLLNSVEKYDHPHTGHWTNVTFMA TKRSGGVALLNDRHIYVGGFDGTAHLSVVEAXNIRIDSWTIVTSMITPRCYGATVLR GRLYAYTAGYDGNLSLSSIECYDPIIDSWEVVVTSMTGTCRCDAGVCVLRKQPELAPEDPE</p>					

(continuación)

<p>ELISA convencional - HK1 y KLHL12 humanas recombinantes (Abnova, Taipei City, 114, Taiwan) expresadas sin células en un sistema basado en germen de trigo. Nótese que HK1 y KLHL12 contienen un marcador de fusión GST en N-terminal (secuencia no mostrada) comúnmente conocido por los expertos en la materia.</p>	<p>AAH08730 SEQ NO: 5</p>	<p>>gi 14250554 gb AAH08730 .1 Hexokinase 1 [Homo sapiens]</p>	<p>MTAAQLLAAVYFTELKDDQVKKIDKYLAMRLSDETLIDIMTRFKEMKNGLSRDNPTA TVKMLPTFVRSFPDGSERKQDFALDLGGSSFRILRVQVWHEKKNQNVHMESEVYDTPENI VHSGSQLEDFHVAECLGDFMEKRLKDKKLPVGFTEFPCQSKIDEAIIITWRKFKA SGVEGADVLLKALKKRGDYDANIVAVVNDIVGTMICGDDQHCVEYGLIIGTINA CYMEEELRHLDVEGDEGRMCINTEWAFGDDGSLIEDIRIEFDREIDRGSINPCGKQLEK MVSQMLGELVRLIILVWAKPGLLFEGRIIPELILTRKFNISDVAIEKNKEGLHNAKE ILTRLGVEPSSDDDCVSVQHVCTIVSFRSANIWAATLGAIIINLRDRNKGTPRLRTVGVV GSLYKTHFQYRRFHKLRLRVPSDVRFLLESQSGKGAAMVAVYRLAEQHRQIEE TLAHLTKDMLLEVKKRMAEMELGKQFHNNAVVKMLPFSVRRTPDGTENGDFLAL DLGTFNRYLLVYKRSGRKRVEMHNTYAFPIEMOGTGEELFDHIVSCISDFLDYMG IKGPRMELGFTFSPFCQQTSLDAGLIIITWKGFRATDCVGHVYVLLRDAIKRREFFDL DVAVVNDIVGTMITCAVEEPTCEVGLIVGTGSNACYMEEMKNEVVEGQGCQMCINME WGAFGDNGLDDIRTHYDRLVDEYSLNAGQRYEKMIQSMYLGEIVRNILIDFTKKGFL FRGQISETLKTRGIFETKPLSQLESDRILALQVRAIILQQLGLNSTCDDSLIVKTVGGVV SRAAQLCGAGMAAVVDKIRENRGLDRUNIVGVVDTGLYKLIHFFSRIMHQIVKELSPK CNVYFLLSEDSGSGKAALITAVGVRLRTEASS</p>
<p>NP_067646.1 SEQ NO: 6</p>	<p>NP_06764 6.11 kelch-like 12 [Homo sapiens]</p>	<p>>gi 11056006 ref NP_06764 6.11 kelch-like 12 [Homo sapiens]</p>	<p>MGGIMAFKDIMINTIHAKEILLNSMNSLRKSNLDCDVTLRVEQKDFFAHRIVLAAACSDYFC AMFTSELSEKGRPYVDIQGLTASTWEIILDFVYVTEVHVTVENVOELLPAACILQLKGV KQACCFELESQLDPSNCLIGIRDFAEHNCVDLMQAAEVFSQKHPPEVQHEFEFLLSQG EVEKLIKDEIQVDEEVEFVAVINWVKHAKREESLNLQYVAMPLLTFRYITDVI DAEPEIRCSLQCRDLVDEAKKPHLRPELRQOMGERTRARLIGANEVLLVVGFGSQSP IDVVEKYDKIQEWSFLPSITRKRRYVASVSLHDSRIYVIGYDGRSLSVVECLDYTAD EDGVVYSVAPMNVRRGLAGATTLGDMIIYVGGFDGSRRTSMERYDFNIDQWSEMGDMQ TAREGALVVASGVICYLGGYDGLMILNSVEKYDFHTGHWNTVTPMATKRSAGAVALLN DHIYVVGDFDGTALHSVVEAYNIRTDSTVTSWTPTRCVVGATVLRGLIYATAGYDGN SLLSSECYDPIIDSWEVVTSMGTQRCDAGVCVLREK</p>

Tabla VI: Ejemplos de secuencias homólogas para HK1 y KLHL12		
Acceso a Proteína del NCBI (Nombre del gen)	Encabezamiento de fasta/Descripción	Secuencia
<p>HEXOCINASA 1 y Homólogos</p> <p>NP_277031.1 (HK1) SEQ NO: 7</p>	<p>>gj 15991827 ref NP_277031.1 hexokinase 1 isoform HK1-R (transcript variant 2) [Homo sapiens]</p>	<p>MDGEHSLSLPGRGAFAWEIGIDKYLAMRLSDEFLIDIMTRFKEMKNGLSRDNFPTATVK MLPTFVRSIPDGSSEKGFALDLDGSSSFRILRVQVNHKKNQVHMESEVYDITENIVHGS SQFLDVAECILGDFMEKRIKDKKLEPVGFTFSPFCQQSKIDEAILITWKRFAKASGVEGAD VWLLNKAIAKKKDYDANIVAVVNDVTGMTTCYDQDQCEVGLIIGTINACYMEELRHI DLVEGEGMCINTEWGAFGDDGSEDEDIRTEFDEIDRGLNPGKQLFEKMSGMYLGEIY RLIIVKAKEGLLEFGRITPELLTRGKFNDSVAIEKNKEGLHNAKEILIRLGVFESDDDD CVSVQHVCTIVSFRSANLVAALGAAILNRLRDNKGTPLRLITVGVDSGLYKTHEQYSRRTF KTLRLVSDSDVRFLLSESGSGKGAAMVAVYLAEQHRQLEETLAHFHLTKDMLLEVKK RRAEMELGLRQTHNNAVVKMLPSFVRRTPDGTENGDFLADLDGGTFRVLLVVKIRSGKK RTVEMHNKIYALPEIMQGTGEELFDHIVSCISDFLDYMGKGRMPLGFTFSPFCQQTSL DAGLLITWTKGFKATDCVGDVVTLLRDAIKRREFFLDVAVVAVNDVTGMTTCAYEFPIC EVGLIVGTGSNACYMEEMKNEVWEGDQGMKINMEWGAFGDNGCLDDIRTHYDRLVDEYS LNAGKQRYEKMSGMYLGEIVRNILLDFTKKGFLEFRGQISETLKTRGIFETKLSQLESDR LALLQVRAILLQQLGNSLTCDDSLVKTVCVGSRRAAQLCGAGMAAVDKIRENRGLDRLN VTVGVDSGLYKLEHFPFRIMHQITVKELSPKCNVSVFLLEDGSGKGAALITAVGVRLRTEAS S</p>
<p>NP_000180.2 (HK2) SEQ NO: 8</p>	<p>>gj 15553127 ref NP_000180.2 hexokinase 2 [Homo sapiens]</p>	<p>MIASHLLAAYFTELNHDQVKVDQYLYHMRLSDETLLEISKRFRKEMEKGALGATTFPTAAV KMLPTFVRSIPDGSSEKGFALDLDGSSSFRILRVQVNHKKNQVHMESEVYDITENIVHGS GTQLFDHIAECLANFMDKLIKDKKLEPVGFTFSPFCQQSKIDEAILITWKRFAKASGVEGR DVVALIRKAIQRGDFDIDIVAVVNDVTGMTTCYDQDQCEVGLIIGTINACYMEEMRHI IDWVEGDEGRMCINTEWGAFGDDGSEDEDIRTEFDEIDRGLNPGKQLFEKMSGMYLGEIY VRLIIVKAKEGLLEFGRITPELLTRGKFNDSVAIEKNKEGLHNAKEILIRLGVFESDDDD DCVAIHRICQIVSTRASLCAAFLAAVLRQIKENKGEERLRSITIGVDGVSYYKKHHPFAKRL HKTVRRLVPGDVRFLRSEDGSGKGAAMVAVYLAEQHRQLEETLAHFHLTKDMLLEVKK RRKVENMERGLSKE THASAPVKMLPTVVCATPDGTEKGFALDLDGGTFRVLLVVRVNGK WGGVEMHNKIYALPEIMQGTGEELFDHIVQCIADFLEYMGKVSPLPGLFTFSPFCQQNS LDESILLKWTGFKASGCEGEDVVTLLKEALHREFFDLDVAVVNDVTGMTTCGFEDEPH CEVGLIVGTGSNACYMEEMKNEVWEGEGRMCVNMMEWGAFGDNGCLDDIRTEFVAVDEL SLNPGKQRYEKMSGMYLGEIVRNILLDFTKRGLLFRGRIERLKTRGIFETKLSQLES CLALLQVRAILLQHLGLES TCDDSLIVKEVCTVARRAAQLCGAGMAAVDRIENRGLDAL KVTVGVDSGLYKLEHFPFRIMHQITVKDLAPKCDVSVFLQSEDSGKGAALITAVACRIEAG QR</p>

(continuación)

Tabla VI: Ejemplos de secuencias homólogas para HK1 y KLHL12		
Acceso a Proteína del NCBI (Nombre del gen)	Encabezamiento de fasta/Descripción	Secuencia
HEXOCINASA 1 y Homólogos		
NP_002106.2 (HK3) SEQ NO: 9	>gil_194097330 ref NP_002106.2 hexokinase 3 [Homo sapiens]	MDSIGSGLRQGEETLSCSEELGPFSDSSEIVLQECLOQFQKVTIRAQQLQIQASLLGSGMEQA LRQASPEAPAVRMLPTVYVGSIPHTEQGDFVLELGAIGASLRVLMVLTGIEGHRVPEPS QEFVIFQVMILGAGQQLDFAAHCLSEFLDAQFVNKQGLQGFSEFPFCHQIGDRSLTIS WTKFRCSGVEGQDWDVQIRRQGANIDVAVVNDITVGTMMGCEPVGVRPCEVGLVVD TGTCNACMEEARHVAVLDEDRGRVCSVVEWGSFSDGALGPVLTTFDHTLDHESLNF GAQR FEKMI GGLYELVRLVIAHLARCGVLFEGGTFALLSQGSLLELHEVAEMDFSTGAARVH AIIQDLGSPGASDELVOHVCAAVCTRAAQLCAALAAVLSLQHSREQQTLQAVATGG RVCERHRCVSLQGTVMLLAPECDVSLIPVSDGGGRGVAMVTAVARLAARHLLEETLA PFLNHQLAAVQAQMRKAKGLRGEASLRMLPTFVRAIPDGRGDFLALDLGGTFR VLLVVRTIGVQITSEIYSIPETVAGSGQQLFDHIVDCIVDFQKQKQGLSQSLFLGFTSE FCRQLGLDQGLILNWTGFKASDCEDQVVSLLREAITRQAVELNVAIVNDITVGTMMSC GVEDPCEI GLI VGTGTNAC YMEELRNVA GPFDSGRMCINMEWAFGDDGSLAMLS TRFD ASVDQAS INFQKQRFKMI SGMYLGEI VRHII LHLTSLGVIFRQQLQRIQTRIFKTKFL SELESDSLALRQVRAILEDLGLPLTSDALMVLVQVQVSRAAQLCGAGVAAVVEKIREN RGEELAVSVGVDGTLKYLHPRFSSLVAATVRELAPRCVVVTFLLQSEDDSGKGAALVTAVAC RLAQLTRV
NP_277042.1 (HK4) SEQ NO: 10	>gil_15967159 ref NP_277042.1 glucokinase isoform 2 [Homo sapiens]	MAMDVTRSOAQTALILVEQILAEFLQLOEEDLKKVMRQKMDRGLRLTHEEASVKMLPT YVSTEGSEVGFDSLDDLGCTNFRVLMVKVGEGBQWSVKTKHQMYSIPEDAMITGAEM LFEDYISECISDFLDKHQMKHKLPELGFTFSEFVRHEDIDKGIILLNMTKFKASGAEGNNV GILLDAIKRRGDFEMDVAMVNDIVATMISCYEDHCEVGMIVGTGCNACYMDEMQLVEL VEGDEGRMCVNTWGAFCGDSGELDEFLE YDRLVDESSANPQQQLYEKLLGGKYMGLVRL VLLRLVDENLLFHGEASEQLRIGAFETRFVSVQSDTGDRCQIYNIILSTIGLRPSTIDCD IVRRACE SVSTRAAHMC SAGLAGVINRMRESSEDMRIIVGVDSGVYKLIHPSPKERPHAS VRLTFSECIIFTESEEGSGRGAALVSAVACKKACMLGQ
NP_079406.3 (HKDC1) SEQ NO: 11	>gil_156151420 ref NP_079406.3 hexokinase domain containing 1 [Homo sapiens]	MEAVHLMAYFSLKEDQIKKVDRF LYHMRLSDDTLLDMMRFRARMEKGLAKDINF TAAV KMLPTFVRAIPDGSNGEFLSLLDGGSEFVLUKVVAEGRKRVQMSQYFPTENE IIRGN GTELFYVADCLADFMKTKLKHKLPLGLLTFSPFRQTKLEEGVLLSWTKFKARGVQDI DVVSRLLTKAMRRHKMDVDIILALVNDITVGTMMTCAYDDFYCEVGLIIGTGNACYMEDMSN IDLVEGDEGRMCINTEWAFGDDGALEDIRTEFDRELDLGSNFGKQLFEKMTSGLYLCEL DCTAVGHVCTIVSFRSANLCAALAAIILRLRENKVERLRTTVGMDGTLKIHQPYPKRL HKVVKLVPSCDVRFLLSESGTGAAMVAVASRVAQQRKQIDRVIALDFQLTREQLVDVQ AKMRALEYGLKRRKSHGLATVRLMFTYVCGLPDGTGKRFALDLGGTFRVLLVVKIRSGR RSVVMYKIFAIPLIEMQGTGEELEFDHIVQCLADEFLDYMLKGLASLPLGHTFSPFCRQMSI DKGTLIGWTKGFATDCEGEDVMDLREAIKRNREFLDIVAVNDITVGTMMTCGYEDPNC EIGLIAGTGSNMCYMEDMNTWVGGGKMCINTEWGGFDNGCIDDIRTRYTEVDEGS LNEGKQRYERKMSGMYLGEI VRQIILDLIKQGLLFRGQISERLNRTRGIFETKLSQIESDR LALLQVRRILQQGLDSTCEDSIWVKEVCGAVSRRAAQLCGAGLAAIVEKRRDQGLEHLR ITVGVGDTLYKYLHPRFSSLVAATVRELAPRCVDTFMLSEDDSGKGAALITAVAKRLQQAQK EN

(continuación)

<p>KELCH-LIKE 12 and Homologs</p>	<p>NP_067646.1 (KLHL12) SEQ NO: 12</p>	<p>>gj 111056006 ref NP_067646.1 kelch-like 12 [Homo sapiens]</p>	<p>MGGIMAFKDLIMINITHAKSILLNSMNSLRKSNKINLDCVTLRVEQKDFPAHRIVLAAACSDYFCAM FTSELSEKREYVDIOGLIATASIMEILLDDVYVYETVHVIVENVQELLPAAACLLQLKGVKQAC CEELESQDFSNCLGRDFAEHTHNCVDDMQAAAEVFSQKHFPEVQHEEFLLSQGEVEKLLI KCDIEIQVDESEEPVFAVINWVHAKREESFNLIQVYRME LLTPRYITDVAEPPIRC SLOCRDLVDEAKKFLRPELRSQMGQFTRARLIGANVILLVVGFGSQOSP IDVVEKYDPK IQEWSFLPSITRKRKYVASVSLHDIRYIVIGGVDGRSRLSSVECLDYITADEDEWWSVAFPM VRRGLAGATTLGDMIVYSGSFGDSRRHTSMERYDENIDQMSLGMQTAAREGAGLVAASGV IYCLGGVDGLNLLNSVEKYPHGHWTNTPMAYKRSAGAVALLNDHI VVVGDFGIAHLS SVEAYNIRIDSWTITVSMITTPRCYVCAVIRGRLYAAGYDGNLSLLSIECYDFIIDSREVE VTSNGTQRCDAGYCVLREK</p>
<p>NP_055273.2 (KLHL20) SEQ NO: 13</p>	<p>>gj 40807500 ref NP_055273.2 kelch-like 20 [Homo sapiens]</p>	<p>MEGKPERRCTNIRPGETGMDVTSRCLGDPENKLPFGVQFARMPYISDKHPRQTLTEVINLL RKHRELCDVVVYVYGAKKIYAHRVILLACSPYFRAMFTGELAESRQTEVYVIRIDIDERAMELL IDFAYSQITVEEGNVQITLIPAAQLLQAEIQEACEF LKROLDFSNCLGRFAFADTHSCR ELLRIADKFTQHNFOEVMSEEFMLP ANQLDIISSDELNVRSQEVFNAMAWKYSIQ ERRPQLPQVLQVRLPFLSPEKFLVGTGSDPLIKSDECRDLVDEAKNYLLLPQRP LMQG PRTPRKPIRCGEVLFVAGWCSDAISVERYPDTNEWRWVASMSKRRRCGVSVLDDLL LYAVGGHDSYLSNVERYPDKTNOWSDVAFSTCKISVGVAVLGGFLYAVGGQDVSCL NIVERYDPKENKTRVASMSTRRLGVAVAVLGGFLYAVGGSDGTSPLNITVERYPQENRWH TIAPMGIRKHLGCAYIQDMIYAVGGRDDITELSSAERYNPRINQWSEVWMTSRRSQVGL AVVNGQLMAYGGDFDGTIY LKITEVDFDPDANTWRLYGGMNYRRLGGGVGVIKMTGESHIV</p>	
<p>NP_059111.2 (KLHL3) SEQ NO: 14</p>	<p>>gj 166235129 ref NP_059111.2 kelch-like 3 [Homo sapiens]</p>	<p>MEGESVKLSSQTLIQAGDDEKNQRTIIVNPAHMGKAFKVMNELRSKQLICDVMIVAEDEVEI EAHRVVLACSPYFCAMFTGDMSEKAKKIEIKDYDQTL SKLIDYIYTAETVEEENVOV LLFAALLQLMDYRQCCDFLQSLHPTNCLGIRAFADVHICIDLLQQAANAYAEQHEPEVM LGEFFLSLDQVCSLISD KLTIVSEKVEEAVI SWINYEKETELEHMAKIMERHVRPLLI PRVLYQVTEEEALIKNNNTCKDFLIEAMKYHLIPLDQRLIKNPRTKPRTPVSLPKYMTIV VGGQAFKAIRSEVCEYDFEEDRWQIAELP SRRCRAGVFMAGHYAVGGVNGSLRVRIVDV YDGVKQWTSIASMQERRSTLGAAVLNDLLYAVGGFDGTSGLASVEAYSYKTNEWFFVAPM NTRRSVVGWVGGKLYAVGGYDASRQCLSTVEQYNEATNEWIVYVADMSTRSAGVGL SQLYATGGHGDGFLVRKSEVVDGPTNTWKQVADMNCRNAGVCAVNGLLIYVGGDDGSC NLASVEYNEFVTDKWTLLPFTNMSIGRSYAGVAVIHKS L</p>	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AmberGen, Inc.
 Lim, Mark J.
 Ostendorff, Heather P.
 5 Rothschild, Kenneth J.
 Bloch, Donald B.

<120> Un procedimiento para diagnosticar cirrosis biliar primaria (CBP) usando nuevos autoantígenos
 <130> INOVA-1076610

<140> 13/500.411
 10 <141> 08/06/2012

<150> PCT/US10/51475
 <151> 05/10/2010

<150> 61/248.768
 <151> 05/10/2009

15 <160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 917
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ile Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr Glu Leu Lys Asp
1                               5                               10                               15

Asp Gln Val Lys Lys Ile Asp Lys Tyr Leu Tyr Ala Met Arg Leu Ser
                20                25                30

Asp Glu Thr Leu Ile Asp Ile Met Thr Arg Phe Arg Lys Glu Met Lys
                35                40                45

Asn Gly Leu Ser Arg Asp Phe Asn Pro Thr Ala Thr Val Lys Met Leu
50                55                60

Pro Thr Phe Val Arg Ser Ile Pro Asp Gly Ser Glu Lys Gly Asp Phe
65                70                75                80

Ile Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ser Ser Phe Arg Ile Leu Arg Val Gln
85                90

Val Asn His Glu Lys Asn Gln Asn Val His Met Glu Ser Glu Val Tyr
100                105                110

Asp Thr Pro Glu Asn Ile Val His Gly Ser Gly Ser Gln Leu Phe Asp
115                120                125
  
```

ES 2 681 839 T3

His Val Ala Glu Cys Leu Gly Asp Phe Met Glu Lys Arg Lys Ile Lys
 130 135 140

Asp Lys Lys Leu Pro Val Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Asp Glu Ala Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Arg Phe Lys
 165 170 175

Ala Ser Gly Val Glu Gly Ala Asp Val Val Lys Leu Leu Asn Lys Ala
 180 185 190

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

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Gly Tyr Asp Asp Gln His Cys
 210 215 220

Glu Val Gly Leu Ile Ile Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu
 225 230 235 240

Glu Leu Arg His Ile Asp Leu Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys
 245 250 255

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

Ile Arg Thr Glu Phe Asp Arg Glu Ile Asp Arg Gly Ser Leu Asn Pro
 275 280 285

Gly Lys Gln Leu Phe Glu Lys Met Val Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu
 290 295 300

Leu Val Arg Leu Ile Leu Val Lys Met Ala Lys Glu Gly Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Glu Gly Arg Ile Thr Pro Glu Leu Leu Thr Arg Gly Lys Phe Asn Thr
 325 330 335

Ser Asp Val Ser Ala Ile Glu Lys Asn Lys Glu Gly Leu His Asn Ala
 340 345 350

Lys Glu Ile Leu Thr Arg Leu Gly Val Glu Pro Ser Asp Asp Asp Cys
 355 360 365

Val Ser Val Gln His Val Cys Thr Ile Val Ser Phe Arg Ser Ala Asn

ES 2 681 839 T3

Ala Thr Asp Cys Val Gly His Asp Val Val Thr Leu Leu Arg Asp Ala
625 630 635 640

Ile Lys Arg Arg Glu Glu Phe Asp Leu Asp Val Val Ala Val Val Asn
645 650 655

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Ala Tyr Glu Glu Pro Thr Cys
660 665 670

Glu Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu
675 680 685

Glu Met Lys Asn Val Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Gly Gln Met Cys
690 695 700

Ile Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp
705 710 715 720

Ile Arg Thr His Tyr Asp Arg Leu Val Asp Glu Tyr Ser Leu Asn Ala
725 730 735

Gly Lys Gln Arg Tyr Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu
740 745 750

Ile Val Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gly Phe Leu Phe
755 760 765

Arg Gly Gln Ile Ser Glu Thr Leu Lys Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr
770 775 780

Lys Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Arg Leu Ala Leu Leu Gln Val
785 790 795 800

Arg Ala Ile Leu Gln Gln Leu Gly Leu Asn Ser Thr Cys Asp Asp Ser
805 810 815

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

Leu Cys Gly Ala Gly Met Ala Ala Val Val Asp Lys Ile Arg Glu Asn
835 840 845

Arg Gly Leu Asp Arg Leu Asn Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu
850 855 860

Tyr Lys Leu His Pro His Phe Ser Arg Ile Met His Gln Thr Val Lys
865 870 875 880

ES 2 681 839 T3

Glu Leu Ser Pro Lys Cys Asn Val Ser Phe Leu Leu Ser Glu Asp Gly
 885 890 895

Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Arg Leu Arg
 900 905 910

Thr Glu Ala Ser Ser
 915

<210> 2
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Gly Gly Ile Met Ala Pro Lys Asp Ile Met Thr Asn Thr His Ala
 1 5 10 15

Lys Ser Ile Leu Asn Ser Met Asn Ser Leu Arg Lys Ser Asn Thr Leu
 20 25 30

Cys Asp Val Thr Leu Arg Val Glu Gln Lys Asp Phe Pro Ala His Arg
 35 40 45

Ile Val Leu Ala Ala Cys Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Met Phe Thr Ser
 50 55 60

Glu Leu Ser Glu Lys Gly Lys Pro Tyr Val Asp Ile Gln Gly Leu Thr
 65 70 75 80

Ala Ser Thr Met Glu Ile Leu Leu Asp Phe Val Tyr Thr Glu Thr Val
 85 90 95

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

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

Gln Leu Asp Pro Ser Asn Cys Leu Gly Ile Arg Asp Phe Ala Glu Thr
 130 135 140

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

His Phe Pro Glu Val Val Gln His Glu Glu Phe Ile Leu Leu Ser Gln
 165 170 175

ES 2 681 839 T3

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

Glu Glu Pro Val Phe Glu Ala Val Ile Asn Trp Val Lys His Ala Lys
195 200 205

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

Pro Leu Leu Thr Pro Arg Tyr Ile Thr Asp Val Ile Asp Ala Glu Pro
225 230 235 240

Phe Ile Arg Cys Ser Leu Gln Cys Arg Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys
245 250 255

Lys Phe His Leu Arg Pro Glu Leu Arg Ser Gln Met Gln Gly Pro Arg
260 265 270

Thr Arg Ala Arg Leu Gly Ala Asn Glu Val Leu Leu Val Val Gly Gly
275 280 285

Phe Gly Ser Gln Gln Ser Pro Ile Asp Val Val Glu Lys Tyr Asp Pro
290 295 300

Lys Thr Gln Glu Trp Ser Phe Leu Pro Ser Ile Thr Arg Lys Arg Arg
305 310 315 320

Tyr Val Ala Ser Val Ser Leu His Asp Arg Ile Tyr Val Ile Gly Gly
325 330 335

Tyr Asp Gly Arg Ser Arg Leu Ser Ser Val Glu Cys Leu Asp Tyr Thr
340 345 350

Ala Asp Glu Asp Gly Val Trp Tyr Ser Val Ala Pro Met Asn Val Arg
355 360 365

Arg Gly Leu Ala Gly Ala Thr Thr Leu Gly Asp Met Ile Tyr Val Ser
370 375 380

Gly Gly Phe Asp Gly Ser Arg Arg His Thr Ser Met Glu Arg Tyr Asp
385 390 395 400

Pro Asn Ile Asp Gln Trp Ser Met Leu Gly Asp Met Gln Thr Ala Arg
405 410 415

Glu Gly Ala Gly Leu Val Val Ala Ser Gly Val Ile Tyr Cys Leu Gly
420 425 430

ES 2 681 839 T3

Gly Tyr Asp Gly Leu Asn Ile Leu Asn Ser Val Glu Lys Tyr Asp Pro
 435 440 445

His Thr Gly His Trp Thr Asn Val Thr Pro Met Ala Thr Lys Arg Ser
 450 455 460

Gly Ala Gly Val Ala Leu Leu Asn Asp His Ile Tyr Val Val Gly Gly
 465 470 475 480

Phe Asp Gly Thr Ala His Leu Ser Ser Val Glu Ala Tyr Asn Ile Arg
 485 490 495

Thr Asp Ser Trp Thr Thr Val Thr Ser Met Thr Thr Pro Arg Cys Tyr
 500 505 510

Val Gly Ala Thr Val Leu Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ile Ala Gly Tyr
 515 520 525

Asp Gly Asn Ser Leu Leu Ser Ser Ile Glu Cys Tyr Asp Pro Ile Ile
 530 535 540

Asp Ser Trp Glu Val Val Thr Ser Met Gly Thr Gln Arg Cys Asp Ala
 545 550 555 560

Gly Val Cys Val Leu Arg Glu Lys
 565

<210> 3
 <211> 988
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> Los restos en estas posiciones son marcadores de epítomos añadidos por vía exógena en N-terminal y en C-terminal así como secuencias que derivan de vector.

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (932)..(988)
 <223> Los restos en estas posiciones son marcadores de epítomos añadidos por vía exógena en N-terminal y en C-terminal así como secuencias que derivan de vector.

15

<400> 3

Met Ala Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys Met Ile
 1 5 10 15

Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr Glu Leu Lys Asp Asp Gln

ES 2 681 839 T3

Thr Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asp Gly Ser Leu Glu Asp Ile Arg
 275 280 285

Thr Glu Phe Asp Arg Glu Ile Asp Arg Gly Ser Leu Asn Pro Gly Lys
 290 295 300

Gln Leu Phe Glu Lys Met Val Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Leu Val
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Leu Val Lys Met Ala Lys Glu Gly Leu Leu Phe Glu Gly
 325 330 335

Arg Ile Thr Pro Glu Leu Leu Thr Arg Gly Lys Phe Asn Thr Ser Asp
 340 345 350

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

Ile Leu Thr Arg Leu Gly Val Glu Pro Ser Asp Asp Asp Cys Val Ser
 370 375 380

Val Gln His Val Cys Thr Ile Val Ser Phe Arg Ser Ala Asn Leu Val
 385 390 395 400

Ala Ala Thr Leu Gly Ala Ile Leu Asn Arg Leu Arg Asp Asn Lys Gly
 405 410 415

Thr Pro Arg Leu Arg Thr Thr Val Gly Val Asp Gly Ser Leu Tyr Lys
 420 425 430

Thr His Pro Gln Tyr Ser Arg Arg Phe His Lys Thr Leu Arg Arg Leu
 435 440 445

Val Pro Asp Ser Asp Val Arg Phe Leu Leu Ser Glu Ser Gly Ser Gly
 450 455 460

Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu Gln
 465 470 475 480

His Arg Gln Ile Glu Glu Thr Leu Ala His Phe His Leu Thr Lys Asp
 485 490 495

Met Leu Leu Glu Val Lys Lys Arg Met Arg Ala Glu Met Glu Leu Gly
 500 505 510

Leu Arg Lys Gln Thr His Asn Asn Ala Val Val Lys Met Leu Pro Ser
 515 520 525

ES 2 681 839 T3

Phe Val Arg Arg Thr Pro Asp Gly Thr Glu Asn Gly Asp Phe Leu Ala
530 535 540

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Lys Ile Arg
545 550 555 560

Ser Gly Lys Lys Arg Thr Val Glu Met His Asn Lys Ile Tyr Ala Ile
565 570 575

Pro Ile Glu Ile Met Gln Gly Thr Gly Glu Glu Leu Phe Asp His Ile
580 585 590

Val Ser Cys Ile Ser Asp Phe Leu Asp Tyr Met Gly Ile Lys Gly Pro
595 600 605

Arg Met Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln Thr Ser
610 615 620

Leu Asp Ala Gly Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ala Thr
625 630 635 640

Asp Cys Val Gly His Asp Val Val Thr Leu Leu Arg Asp Ala Ile Lys
645 650 655

Arg Arg Glu Glu Phe Asp Leu Asp Val Val Ala Val Val Asn Asp Thr
660 665 670

Val Gly Thr Met Met Thr Cys Ala Tyr Glu Glu Pro Thr Cys Glu Val
675 680 685

Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Met
690 695 700

Lys Asn Val Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Gly Gln Met Cys Ile Asn
705 710 715 720

Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp Ile Arg
725 730 735

Thr His Tyr Asp Arg Leu Val Asp Glu Tyr Ser Leu Asn Ala Gly Lys
740 745 750

Gln Arg Tyr Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Ile Val
755 760 765

Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gly Phe Leu Phe Arg Gly
770 775 780

ES 2 681 839 T3

Gln Ile Ser Glu Thr Leu Lys Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr Lys Phe
785 790 795 800

Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Arg Leu Ala Leu Leu Gln Val Arg Ala
805 810 815

Ile Leu Gln Gln Leu Gly Leu Asn Ser Thr Cys Asp Asp Ser Ile Leu
820 825 830

Val Lys Thr Val Cys Gly Val Val Ser Arg Arg Ala Ala Gln Leu Cys
835 840 845

Gly Ala Gly Met Ala Ala Val Val Asp Lys Ile Arg Glu Asn Arg Gly
850 855 860

Leu Asp Arg Leu Asn Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr Lys
865 870 875 880

Leu His Pro His Phe Ser Arg Ile Met His Gln Thr Val Lys Glu Leu
885 890 895

Ser Pro Lys Cys Asn Val Ser Phe Leu Leu Ser Glu Asp Gly Ser Gly
900 905 910

Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Arg Leu Arg Thr Glu
915 920 925

Ala Ser Ser Leu Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala
930 935 940

Arg Leu Gln Asp Val Asp Gly Thr Ile Asp Thr Arg Ser Lys Leu Ala
945 950 955 960

Ala Ala Gln Leu Tyr Thr Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu
965 970 975

Asp Pro Glu Asp Leu Glu His His His His His His
980 985

<210> 4
<211> 591
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys Met Gly Gly Ile
1 5 10 15

ES 2 681 839 T3

Met Ala Pro Lys Asp Ile Met Thr Asn Thr His Ala Lys Ser Ile Leu
 20 25 30

Asn Ser Met Asn Ser Leu Arg Lys Ser Asn Thr Leu Cys Asp Val Thr
 35 40 45

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

Ala Cys Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Met Phe Thr Ser Glu Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Lys Gly Lys Pro Tyr Val Asp Ile Gln Gly Leu Thr Ala Ser Thr Met
 85 90 95

Glu Ile Leu Leu Asp Phe Val Tyr Thr Glu Thr Val His Val Thr Val
 100 105 110

Glu Asn Val Gln Glu Leu Leu Pro Ala Ala Cys Leu Leu Gln Leu Lys
 115 120 125

Gly Val Lys Gln Ala Cys Cys Glu Phe Leu Glu Ser Gln Leu Asp Pro
 130 135 140

Ser Asn Cys Leu Gly Ile Arg Asp Phe Ala Glu Thr His Asn Cys Val
 145 150 155 160

Asp Leu Met Gln Ala Ala Glu Val Phe Ser Gln Lys His Phe Pro Glu
 165 170 175

Val Val Gln His Glu Glu Phe Ile Leu Leu Ser Gln Gly Glu Val Glu
 180 185 190

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

Phe Glu Ala Val Ile Asn Trp Val Lys His Ala Lys Lys Glu Arg Glu
 210 215 220

Glu Ser Leu Pro Asn Leu Leu Gln Tyr Val Arg Met Pro Leu Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Arg Tyr Ile Thr Asp Val Ile Asp Ala Glu Pro Phe Ile Arg Cys
 245 250 255

Ser Leu Gln Cys Arg Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Lys Phe His Leu

ES 2 681 839 T3

Thr Thr Val Thr Ser Met Thr Thr Pro Arg Cys Tyr Val Gly Ala Thr
515 520 525

Val Leu Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ile Ala Gly Tyr Asp Gly Asn Ser
530 535 540

Leu Leu Ser Ser Ile Glu Cys Tyr Asp Pro Ile Ile Asp Ser Trp Glu
545 550 555 560

Val Val Thr Ser Met Gly Thr Gln Arg Cys Asp Ala Gly Val Cys Val
565 570 575

Leu Arg Glu Lys Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
580 585 590

<210> 5
<211> 917
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

Met Ile Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr Glu Leu Lys Asp
1 5 10 15

Asp Gln Val Lys Lys Ile Asp Lys Tyr Leu Tyr Ala Met Arg Leu Ser
20 25 30

Asp Glu Thr Leu Ile Asp Ile Met Thr Arg Phe Arg Lys Glu Met Lys
35 40 45

Asn Gly Leu Ser Arg Asp Phe Asn Pro Thr Ala Thr Val Lys Met Leu
50 55 60

Pro Thr Phe Val Arg Ser Ile Pro Asp Gly Ser Glu Lys Gly Asp Phe
65 70 75 80

Ile Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ser Ser Phe Arg Ile Leu Arg Val Gln
85 90 95

Val Asn His Glu Lys Asn Gln Asn Val His Met Glu Ser Glu Val Tyr
100 105 110

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

His Val Ala Glu Cys Leu Gly Asp Phe Met Glu Lys Arg Lys Ile Lys
130 135 140

ES 2 681 839 T3

Asp Lys Lys Leu Pro Val Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Asp Glu Ala Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Arg Phe Lys
 165 170 175

Ala Ser Gly Val Glu Gly Ala Asp Val Val Lys Leu Leu Asn Lys Ala
 180 185 190

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

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Gly Tyr Asp Asp Gln His Cys
 210 215 220

Glu Val Gly Leu Ile Ile Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu
 225 230 235 240

Glu Leu Arg His Ile Asp Leu Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys
 245 250 255

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

Ile Arg Thr Glu Phe Asp Arg Glu Ile Asp Arg Gly Ser Leu Asn Pro
 275 280 285

Gly Lys Gln Leu Phe Glu Lys Met Val Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu
 290 295 300

Leu Val Arg Leu Ile Leu Val Lys Met Ala Lys Glu Gly Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Glu Gly Arg Ile Thr Pro Glu Leu Leu Thr Arg Gly Lys Phe Asn Thr
 325 330 335

Ser Asp Val Ser Ala Ile Glu Lys Asn Lys Glu Gly Leu His Asn Ala
 340 345 350

Lys Glu Ile Leu Thr Arg Leu Gly Val Glu Pro Ser Asp Asp Asp Cys
 355 360 365

Val Ser Val Gln His Val Cys Thr Ile Val Ser Phe Arg Ser Ala Asn
 370 375 380

Leu Val Ala Ala Thr Leu Gly Ala Ile Leu Asn Arg Leu Arg Asp Asn
 385 390 395 400

ES 2 681 839 T3

Lys Gly Thr Pro Arg Leu Arg Thr Thr Val Gly Val Asp Gly Ser Leu
 405 410 415

Tyr Lys Thr His Pro Gln Tyr Ser Arg Arg Phe His Lys Thr Leu Arg
 420 425 430

Arg Leu Val Pro Asp Ser Asp Val Arg Phe Leu Leu Ser Glu Ser Gly
 435 440 445

Ser Gly Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Tyr Arg Leu Ala
 450 455 460

Glu Gln His Arg Gln Ile Glu Glu Thr Leu Ala His Phe His Leu Thr
 465 470 475 480

Lys Asp Met Leu Leu Glu Val Lys Lys Arg Met Arg Ala Glu Met Glu
 485 490 495

Leu Gly Leu Arg Lys Gln Thr His Asn Asn Ala Val Val Lys Met Leu
 500 505 510

Pro Ser Phe Val Arg Arg Thr Pro Asp Gly Thr Glu Asn Gly Asp Phe
 515 520 525

Leu Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Lys
 530 535 540

Ile Arg Ser Gly Lys Lys Arg Thr Val Glu Met His Asn Lys Ile Tyr
 545 550 555 560

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

His Ile Val Ser Cys Ile Ser Asp Phe Leu Asp Tyr Met Gly Ile Lys
 580 585 590

Gly Pro Arg Met Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln
 595 600 605

Thr Ser Leu Asp Ala Gly Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Gly Phe Lys
 610 615 620

Ala Thr Asp Cys Val Gly His Asp Val Val Thr Leu Leu Arg Asp Ala
 625 630 635 640

Ile Lys Arg Arg Glu Glu Phe Asp Leu Asp Val Val Ala Val Val Asn
 645 650 655

ES 2 681 839 T3

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Ala Tyr Glu Glu Pro Thr Cys
 660 665 670

Glu Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu
 675 680 685

Glu Met Lys Asn Val Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Gly Gln Met Cys
 690 695 700

Ile Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp
 705 710 715 720

Ile Arg Thr His Tyr Asp Arg Leu Val Asp Glu Tyr Ser Leu Asn Ala
 725 730 735

Gly Lys Gln Arg Tyr Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu
 740 745 750

Ile Val Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gly Phe Leu Phe
 755 760 765

Arg Gly Gln Ile Ser Glu Thr Leu Lys Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr
 770 775 780

Lys Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Arg Leu Ala Leu Leu Gln Val
 785 790 795 800

Arg Ala Ile Leu Gln Gln Leu Gly Leu Asn Ser Thr Cys Asp Asp Ser
 805 810 815

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

Leu Cys Gly Ala Gly Met Ala Ala Val Val Asp Lys Ile Arg Glu Asn
 835 840 845

Arg Gly Leu Asp Arg Leu Asn Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu
 850 855 860

Tyr Lys Leu His Pro His Phe Ser Arg Ile Met His Gln Thr Val Lys
 865 870 875 880

Glu Leu Ser Pro Lys Cys Asn Val Ser Phe Leu Leu Ser Glu Asp Gly
 885 890 895

Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Arg Leu Arg

ES 2 681 839 T3

900

905

910

Thr Glu Ala Ser Ser
915

<210> 6
<211> 568
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

5

Met Gly Gly Ile Met Ala Pro Lys Asp Ile Met Thr Asn Thr His Ala
1 5 10 15

Lys Ser Ile Leu Asn Ser Met Asn Ser Leu Arg Lys Ser Asn Thr Leu
20 25 30

Cys Asp Val Thr Leu Arg Val Glu Gln Lys Asp Phe Pro Ala His Arg
35 40 45

Ile Val Leu Ala Ala Cys Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Met Phe Thr Ser
50 55 60

Glu Leu Ser Glu Lys Gly Lys Pro Tyr Val Asp Ile Gln Gly Leu Thr
65 70 75 80

Ala Ser Thr Met Glu Ile Leu Leu Asp Phe Val Tyr Thr Glu Thr Val
85 90 95

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

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

Gln Leu Asp Pro Ser Asn Cys Leu Gly Ile Arg Asp Phe Ala Glu Thr
130 135 140

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

His Phe Pro Glu Val Val Gln His Glu Glu Phe Ile Leu Leu Ser Gln
165 170 175

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

Glu Glu Pro Val Phe Glu Ala Val Ile Asn Trp Val Lys His Ala Lys

ES 2 681 839 T3

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

ES 2 681 839 T3

His Thr Gly His Trp Thr Asn Val Thr Pro Met Ala Thr Lys Arg Ser
 450 455 460

Gly Ala Gly Val Ala Leu Leu Asn Asp His Ile Tyr Val Val Gly Gly
 465 470 475 480

Phe Asp Gly Thr Ala His Leu Ser Ser Val Glu Ala Tyr Asn Ile Arg
 485 490 495

Thr Asp Ser Trp Thr Thr Val Thr Ser Met Thr Thr Pro Arg Cys Tyr
 500 505 510

Val Gly Ala Thr Val Leu Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ile Ala Gly Tyr
 515 520 525

Asp Gly Asn Ser Leu Leu Ser Ser Ile Glu Cys Tyr Asp Pro Ile Ile
 530 535 540

Asp Ser Trp Glu Val Val Thr Ser Met Gly Thr Gln Arg Cys Asp Ala
 545 550 555 560

Gly Val Cys Val Leu Arg Glu Lys
 565

<210> 7
 <211> 916
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

Met Asp Cys Glu His Ser Leu Ser Leu Pro Cys Arg Gly Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Trp Glu Ile Gly Ile Asp Lys Tyr Leu Tyr Ala Met Arg Leu Ser Asp
 20 25 30

Glu Thr Leu Ile Asp Ile Met Thr Arg Phe Arg Lys Glu Met Lys Asn
 35 40 45

Gly Leu Ser Arg Asp Phe Asn Pro Thr Ala Thr Val Lys Met Leu Pro
 50 55 60

Thr Phe Val Arg Ser Ile Pro Asp Gly Ser Glu Lys Gly Asp Phe Ile
 65 70 75 80

Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ser Ser Phe Arg Ile Leu Arg Val Gln Val
 85 90 95

ES 2 681 839 T3

Asn His Glu Lys Asn Gln Asn Val His Met Glu Ser Glu Val Tyr Asp
 100 105 110

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

Val Ala Glu Cys Leu Gly Asp Phe Met Glu Lys Arg Lys Ile Lys Asp
 130 135 140

Lys Lys Leu Pro Val Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln Ser
 145 150 155 160

Lys Ile Asp Glu Ala Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Arg Phe Lys Ala
 165 170 175

Ser Gly Val Glu Gly Ala Asp Val Val Lys Leu Leu Asn Lys Ala Ile
 180 185 190

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

Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Gly Tyr Asp Asp Gln His Cys Glu
 210 215 220

Val Gly Leu Ile Ile Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu
 225 230 235 240

Leu Arg His Ile Asp Leu Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys Ile
 245 250 255

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

Arg Thr Glu Phe Asp Arg Glu Ile Asp Arg Gly Ser Leu Asn Pro Gly
 275 280 285

Lys Gln Leu Phe Glu Lys Met Val Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Leu
 290 295 300

Val Arg Leu Ile Leu Val Lys Met Ala Lys Glu Gly Leu Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Gly Arg Ile Thr Pro Glu Leu Leu Thr Arg Gly Lys Phe Asn Thr Ser
 325 330 335

Asp Val Ser Ala Ile Glu Lys Asn Lys Glu Gly Leu His Asn Ala Lys
 340 345 350

ES 2 681 839 T3

Glu Ile Leu Thr Arg Leu Gly Val Glu Pro Ser Asp Asp Asp Cys Val
 355 360 365

Ser Val Gln His Val Cys Thr Ile Val Ser Phe Arg Ser Ala Asn Leu
 370 375 380

Val Ala Ala Thr Leu Gly Ala Ile Leu Asn Arg Leu Arg Asp Asn Lys
 385 390 395 400

Gly Thr Pro Arg Leu Arg Thr Thr Val Gly Val Asp Gly Ser Leu Tyr
 405 410 415

Lys Thr His Pro Gln Tyr Ser Arg Arg Phe His Lys Thr Leu Arg Arg
 420 425 430

Leu Val Pro Asp Ser Asp Val Arg Phe Leu Leu Ser Glu Ser Gly Ser
 435 440 445

Gly Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
 450 455 460

Gln His Arg Gln Ile Glu Glu Thr Leu Ala His Phe His Leu Thr Lys
 465 470 475

Asp Met Leu Leu Glu Val Lys Lys Arg Met Arg Ala Glu Met Glu Leu
 485 490 495

Gly Leu Arg Lys Gln Thr His Asn Asn Ala Val Val Lys Met Leu Pro
 500 505 510

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

Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Lys Ile
 530 535 540

Arg Ser Gly Lys Lys Arg Thr Val Glu Met His Asn Lys Ile Tyr Ala
 545 550 555 560

Ile Pro Ile Glu Ile Met Gln Gly Thr Gly Glu Glu Leu Phe Asp His
 565 570 575

Ile Val Ser Cys Ile Ser Asp Phe Leu Asp Tyr Met Gly Ile Lys Gly
 580 585 590

Pro Arg Met Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln Thr
 595 600 605

ES 2 681 839 T3

Ser Leu Asp Ala Gly Ile Leu Ile Thr Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ala
610 615 620

Thr Asp Cys Val Gly His Asp Val Val Thr Leu Leu Arg Asp Ala Ile
625 630 635 640

Lys Arg Arg Glu Glu Phe Asp Leu Asp Val Val Ala Val Val Asn Asp
645 650 655

Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Ala Tyr Glu Glu Pro Thr Cys Glu
660 665 670

Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu
675 680 685

Met Lys Asn Val Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Gly Gln Met Cys Ile
690 695 700

Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp Ile
705 710 715 720

Arg Thr His Tyr Asp Arg Leu Val Asp Glu Tyr Ser Leu Asn Ala Gly
725 730 735

Lys Gln Arg Tyr Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Ile
740 745 750

Val Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gly Phe Leu Phe Arg
755 760 765

Gly Gln Ile Ser Glu Thr Leu Lys Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr Lys
770 775 780

Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Arg Leu Ala Leu Leu Gln Val Arg
785 790 795 800

Ala Ile Leu Gln Gln Leu Gly Leu Asn Ser Thr Cys Asp Asp Ser Ile
805 810 815

Leu Val Lys Thr Val Cys Gly Val Val Ser Arg Arg Ala Ala Gln Leu
820 825 830

Cys Gly Ala Gly Met Ala Ala Val Val Asp Lys Ile Arg Glu Asn Arg
835 840 845

Gly Leu Asp Arg Leu Asn Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr

ES 2 681 839 T3

850

855

860

Lys Leu His Pro His Phe Ser Arg Ile Met His Gln Thr Val Lys Glu
865 870 875 880

Leu Ser Pro Lys Cys Asn Val Ser Phe Leu Leu Ser Glu Asp Gly Ser
885 890 895

Gly Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Gly Val Arg Leu Arg Thr
900 905 910

Glu Ala Ser Ser
915

<210> 8
<211> 917
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Ile Ala Ser His Leu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Glu Leu Asn His
1 5 10 15

Asp Gln Val Gln Lys Val Asp Gln Tyr Leu Tyr His Met Arg Leu Ser
20 25 30

Asp Glu Thr Leu Leu Glu Ile Ser Lys Arg Phe Arg Lys Glu Met Glu
35 40 45

Lys Gly Leu Gly Ala Thr Thr His Pro Thr Ala Ala Val Lys Met Leu
50 55 60

Pro Thr Phe Val Arg Ser Thr Pro Asp Gly Thr Glu His Gly Glu Phe
65 70 75 80

Leu Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Trp Val Lys
85 90 95

Val Thr Asp Asn Gly Leu Gln Lys Val Glu Met Glu Asn Gln Ile Tyr
100 105 110

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

His Ile Ala Glu Cys Leu Ala Asn Phe Met Asp Lys Leu Gln Ile Lys
130 135 140

Asp Lys Lys Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys His Gln

ES 2 681 839 T3

Lys Gly Glu Glu Arg Leu Arg Ser Thr Ile Gly Val Asp Gly Ser Val
405 410 415

Tyr Lys Lys His Pro His Phe Ala Lys Arg Leu His Lys Thr Val Arg
420 425 430

Arg Leu Val Pro Gly Cys Asp Val Arg Phe Leu Arg Ser Glu Asp Gly
435 440 445

Ser Gly Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Tyr Arg Leu Ala
450 455 460

Asp Gln His Arg Ala Arg Gln Lys Thr Leu Glu His Leu Gln Leu Ser
465 470 475 480

His Asp Gln Leu Leu Glu Val Lys Arg Arg Met Lys Val Glu Met Glu
485 490 495

Arg Gly Leu Ser Lys Glu Thr His Ala Ser Ala Pro Val Lys Met Leu
500 505 510

Pro Thr Tyr Val Cys Ala Thr Pro Asp Gly Thr Glu Lys Gly Asp Phe
515 520 525

Leu Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Arg
530 535 540

Val Arg Asn Gly Lys Trp Gly Gly Val Glu Met His Asn Lys Ile Tyr
545 550 555 560

Ala Ile Pro Gln Glu Val Met His Gly Thr Gly Asp Glu Leu Phe Asp
565 570 575

His Ile Val Gln Cys Ile Ala Asp Phe Leu Glu Tyr Met Gly Met Lys
580 585 590

Gly Val Ser Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Gln Gln
595 600 605

Asn Ser Leu Asp Glu Ser Ile Leu Leu Lys Trp Thr Lys Gly Phe Lys
610 615 620

Ala Ser Gly Cys Glu Gly Glu Asp Val Val Thr Leu Leu Lys Glu Ala
625 630 635 640

Ile His Arg Arg Glu Glu Phe Asp Leu Asp Val Val Ala Val Val Asn
645 650 655

ES 2 681 839 T3

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Gly Phe Glu Asp Pro His Cys
 660 665 670

Glu Val Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Ser Asn Ala Cys Tyr Met Glu
 675 680 685

Glu Met Arg Asn Val Glu Leu Val Glu Gly Glu Glu Gly Arg Met Cys
 690 695 700

Val Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asn Gly Cys Leu Asp Asp
 705 710 715 720

Phe Arg Thr Glu Phe Asp Val Ala Val Asp Glu Leu Ser Leu Asn Pro
 725 730 735

Gly Lys Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu
 740 745 750

Ile Val Arg Asn Ile Leu Ile Asp Phe Thr Lys Arg Gly Leu Leu Phe
 755 760 765

Arg Gly Arg Ile Ser Glu Arg Leu Lys Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr
 770 775 780

Lys Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Cys Leu Ala Leu Leu Gln Val
 785 790 795 800

Arg Ala Ile Leu Gln His Leu Gly Leu Glu Ser Thr Cys Asp Asp Ser
 805 810 815

Ile Ile Val Lys Glu Val Cys Thr Val Val Ala Arg Arg Ala Ala Gln
 820 825 830

Leu Cys Gly Ala Gly Met Ala Ala Val Val Asp Arg Ile Arg Glu Asn
 835 840 845

Arg Gly Leu Asp Ala Leu Lys Val Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu
 850 855 860

Tyr Lys Leu His Pro His Phe Ala Lys Val Met His Glu Thr Val Lys
 865 870 875 880

Asp Leu Ala Pro Lys Cys Asp Val Ser Phe Leu Gln Ser Glu Asp Gly
 885 890 895

Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Ala Cys Arg Ile Arg
 900 905 910

ES 2 681 839 T3

Glu Ala Gly Gln Arg
915

<210> 9
<211> 923
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 9

Met Asp Ser Ile Gly Ser Ser Gly Leu Arg Gln Gly Glu Glu Thr Leu
1 5 10 15

Ser Cys Ser Glu Glu Gly Leu Pro Gly Pro Ser Asp Ser Ser Glu Leu
20 25 30

Val Gln Glu Cys Leu Gln Gln Phe Lys Val Thr Arg Ala Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Ile Gln Ala Ser Leu Leu Gly Ser Met Glu Gln Ala Leu Arg Gly
50 55 60

Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ala Val Arg Met Leu Pro Thr Tyr Val Gly
65 70 75 80

Ser Thr Pro His Gly Thr Glu Gln Gly Asp Phe Val Val Leu Glu Leu
85 90 95

Gly Ala Thr Gly Ala Ser Leu Arg Val Leu Trp Val Thr Leu Thr Gly
100 105 110

Ile Glu Gly His Arg Val Glu Pro Arg Ser Gln Glu Phe Val Ile Pro
115 120 125

Gln Glu Val Met Leu Gly Ala Gly Gln Gln Leu Phe Asp Phe Ala Ala
130 135 140

His Cys Leu Ser Glu Phe Leu Asp Ala Gln Pro Val Asn Lys Gln Gly
145 150 155 160

Leu Gln Leu Gly Phe Ser Phe Ser Phe Pro Cys His Gln Thr Gly Leu
165 170 175

Asp Arg Ser Thr Leu Ile Ser Trp Thr Lys Gly Phe Arg Cys Ser Gly
180 185 190

Val Glu Gly Gln Asp Val Val Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ile Arg Arg
195 200 205

ES 2 681 839 T3

Gln Gly Ala Tyr Asn Ile Asp Val Val Ala Val Val Asn Asp Thr Val
 210 215 220

Gly Thr Met Met Gly Cys Glu Pro Gly Val Arg Pro Cys Glu Val Gly
 225 230 235 240

Leu Val Val Asp Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Ala Arg
 245 250 255

His Val Ala Val Leu Asp Glu Asp Arg Gly Arg Val Cys Val Ser Val
 260 265 270

Glu Trp Gly Ser Phe Ser Asp Asp Gly Ala Leu Gly Pro Val Leu Thr
 275 280 285

Thr Phe Asp His Thr Leu Asp His Glu Ser Leu Asn Pro Gly Ala Gln
 290 295 300

Arg Phe Glu Lys Met Ile Gly Gly Leu Tyr Leu Gly Glu Leu Val Arg
 305 310 315 320

Leu Val Leu Ala His Leu Ala Arg Cys Gly Val Leu Phe Gly Gly Cys
 325 330 335

Thr Ser Pro Ala Leu Leu Ser Gln Gly Ser Ile Leu Leu Glu His Val
 340 345 350

Ala Glu Met Glu Asp Pro Ser Thr Gly Ala Ala Arg Val His Ala Ile
 355 360 365

Leu Gln Asp Leu Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ser Asp Val Glu Leu Val
 370 375 380

Gln His Val Cys Ala Ala Val Cys Thr Arg Ala Ala Gln Leu Cys Ala
 385 390 395 400

Ala Ala Leu Ala Ala Val Leu Ser Cys Leu Gln His Ser Arg Glu Gln
 405 410 415

Gln Thr Leu Gln Val Ala Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Cys Glu Arg
 420 425 430

His Pro Arg Phe Cys Ser Val Leu Gln Gly Thr Val Met Leu Leu Ala
 435 440 445

Pro Glu Cys Asp Val Ser Leu Ile Pro Ser Val Asp Gly Gly Gly Arg

ES 2 681 839 T3

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

ES 2 681 839 T3

Asp Ser Gly Arg Met Cys Ile Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp
 705 710 715 720

 Asp Gly Ser Leu Ala Met Leu Ser Thr Arg Phe Asp Ala Ser Val Asp
 725 730 735

 Gln Ala Ser Ile Asn Pro Gly Lys Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Ser
 740 745 750

 Gly Met Tyr Leu Gly Glu Ile Val Arg His Ile Leu Leu His Leu Thr
 755 760 765

 Ser Leu Gly Val Leu Phe Arg Gly Gln Gln Ile Gln Arg Leu Gln Thr
 770 775 780

 Arg Asp Ile Phe Lys Thr Lys Phe Leu Ser Glu Ile Glu Ser Asp Ser
 785 790 795 800

 Leu Ala Leu Arg Gln Val Arg Ala Ile Leu Glu Asp Leu Gly Leu Pro
 805 810 815

 Leu Thr Ser Asp Asp Ala Leu Met Val Leu Glu Val Cys Gln Ala Val
 820 825 830

 Ser Gln Arg Ala Ala Gln Leu Cys Gly Ala Gly Val Ala Ala Val Val
 835 840 845

 Glu Lys Ile Arg Glu Asn Arg Gly Leu Glu Glu Leu Ala Val Ser Val
 850 855 860

 Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr Lys Leu His Pro Arg Phe Ser Ser Leu
 865 870 875 880

 Val Ala Ala Thr Val Arg Glu Leu Ala Pro Arg Cys Val Val Thr Phe
 885 890 895

 Leu Gln Ser Glu Asp Gly Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Val Thr Ala
 900 905 910

 Val Ala Cys Arg Leu Ala Gln Leu Thr Arg Val
 915 920

<210> 10
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10

ES 2 681 839 T3

Met Ala Met Asp Val Thr Arg Ser Gln Ala Gln Thr Ala Leu Thr Leu
1 5 10 15

Val Glu Gln Ile Leu Ala Glu Phe Gln Leu Gln Glu Glu Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Val Met Arg Arg Met Gln Lys Glu Met Asp Arg Gly Leu Arg Leu
35 40 45

Glu Thr His Glu Glu Ala Ser Val Lys Met Leu Pro Thr Tyr Val Arg
50 55 60

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

Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Met Leu Val Lys Val Gly Glu Gly Glu
85 90 95

Glu Gly Gln Trp Ser Val Lys Thr Lys His Gln Met Tyr Ser Ile Pro
100 105 110

Glu Asp Ala Met Thr Gly Thr Ala Glu Met Leu Phe Asp Tyr Ile Ser
115 120 125

Glu Cys Ile Ser Asp Phe Leu Asp Lys His Gln Met Lys His Lys Lys
130 135 140

Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Val Arg His Glu Asp Ile
145 150 155 160

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

Ala Glu Gly Asn Asn Val Val Gly Leu Leu Arg Asp Ala Ile Lys Arg
180 185 190

Arg Gly Asp Phe Glu Met Asp Val Val Ala Met Val Asn Asp Thr Val
195 200 205

Ala Thr Met Ile Ser Cys Tyr Tyr Glu Asp His Gln Cys Glu Val Gly
210 215 220

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

Asn Val Glu Leu Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys Val Asn Thr
245 250 255

ES 2 681 839 T3

Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Ser Gly Glu Leu Asp Glu Phe Leu Leu
 260 265 270

Glu Tyr Asp Arg Leu Val Asp Glu Ser Ser Ala Asn Pro Gly Gln Gln
 275 280 285

Leu Tyr Glu Lys Leu Ile Gly Gly Lys Tyr Met Gly Glu Leu Val Arg
 290 295 300

Leu Val Leu Leu Arg Leu Val Asp Glu Asn Leu Leu Phe His Gly Glu
 305 310 315 320

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

Ser Gln Val Glu Ser Asp Thr Gly Asp Arg Lys Gln Ile Tyr Asn Ile
 340 345 350

Leu Ser Thr Leu Gly Leu Arg Pro Ser Thr Thr Asp Cys Asp Ile Val
 355 360 365

Arg Arg Ala Cys Glu Ser Val Ser Thr Arg Ala Ala His Met Cys Ser
 370 375 380

Ala Gly Leu Ala Gly Val Ile Asn Arg Met Arg Glu Ser Arg Ser Glu
 385 390 395 400

Asp Val Met Arg Ile Thr Val Gly Val Asp Gly Ser Val Tyr Lys Leu
 405 410 415

His Pro Ser Phe Lys Glu Arg Phe His Ala Ser Val Arg Arg Leu Thr
 420 425 430

Pro Ser Cys Glu Ile Thr Phe Ile Glu Ser Glu Glu Gly Ser Gly Arg
 435 440 445

Gly Ala Ala Leu Val Ser Ala Val Ala Cys Lys Lys Ala Cys Met Leu
 450 455 460

Gly Gln
 465

<210> 11
 <211> 917
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

ES 2 681 839 T3

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

Asp Gln Ile Lys Lys Val Asp Arg Phe Leu Tyr His Met Arg Leu Ser
20 25 30

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

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

Pro Thr Phe Val Arg Ala Ile Pro Asp Gly Ser Glu Asn Gly Glu Phe
65 70 75 80

Leu Ser Leu Asp Leu Gly Gly Ser Lys Phe Arg Val Leu Lys Val Gln
85 90 95

Val Ala Glu Glu Gly Lys Arg His Val Gln Met Glu Ser Gln Phe Tyr
100 105 110

Pro Thr Pro Asn Glu Ile Ile Arg Gly Asn Gly Thr Glu Leu Phe Glu
115 120 125

Tyr Val Ala Asp Cys Leu Ala Asp Phe Met Lys Thr Lys Asp Leu Lys
130 135 140

His Lys Lys Leu Pro Leu Gly Leu Thr Phe Ser Phe Pro Cys Arg Gln
145 150 155 160

Thr Lys Leu Glu Glu Gly Val Leu Leu Ser Trp Thr Lys Lys Phe Lys
165 170 175

Ala Arg Gly Val Gln Asp Thr Asp Val Val Ser Arg Leu Thr Lys Ala
180 185 190

Met Arg Arg His Lys Asp Met Asp Val Asp Ile Leu Ala Leu Val Asn
195 200 205

Asp Thr Val Gly Thr Met Met Thr Cys Ala Tyr Asp Asp Pro Tyr Cys
210 215 220

Glu Val Gly Val Ile Ile Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu
225 230 235 240

Asp Met Ser Asn Ile Asp Leu Val Glu Gly Asp Glu Gly Arg Met Cys
245 250 255

ES 2 681 839 T3

Ile Asn Thr Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp Asp Gly Ala Leu Glu Asp
 260 265 270

Ile Arg Thr Glu Phe Asp Arg Glu Leu Asp Leu Gly Ser Leu Asn Pro
 275 280 285

Gly Lys Gln Leu Phe Glu Lys Met Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Glu
 290 295 300

Leu Val Arg Leu Ile Leu Leu Lys Met Ala Lys Ala Gly Leu Leu Phe
 305 310 315 320

Gly Gly Glu Lys Ser Ser Ala Leu His Thr Lys Gly Lys Ile Glu Thr
 325 330 335

Arg His Val Ala Ala Met Glu Lys Tyr Lys Glu Gly Leu Ala Asn Thr
 340 345 350

Arg Glu Ile Leu Val Asp Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Ala Asp Cys
 355 360 365

Ile Ala Val Gln His Val Cys Thr Ile Val Ser Phe Arg Ser Ala Asn
 370 375 380

Leu Cys Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ile Leu Thr Arg Leu Arg Glu Asn
 385 390 395 400

Lys Lys Val Glu Arg Leu Arg Thr Thr Val Gly Met Asp Gly Thr Leu
 405 410 415

Tyr Lys Ile His Pro Gln Tyr Pro Lys Arg Leu His Lys Val Val Arg
 420 425 430

Lys Leu Val Pro Ser Cys Asp Val Arg Phe Leu Leu Ser Glu Ser Gly
 435 440 445

Ser Thr Lys Gly Ala Ala Met Val Thr Ala Val Ala Ser Arg Val Gln
 450 455 460

Ala Gln Arg Lys Gln Ile Asp Arg Val Leu Ala Leu Phe Gln Leu Thr
 465 470 475 480

Arg Glu Gln Leu Val Asp Val Gln Ala Lys Met Arg Ala Glu Leu Glu
 485 490 495

Tyr Gly Leu Lys Lys Lys Ser His Gly Leu Ala Thr Val Arg Met Leu

ES 2 681 839 T3

Val Arg Gln Ile Leu Ile Asp Leu Thr Lys Gln Gly Leu Leu Phe Arg
 755 760 765

Gly Gln Ile Ser Glu Arg Leu Arg Thr Arg Gly Ile Phe Glu Thr Lys
 770 775 780

Phe Leu Ser Gln Ile Glu Ser Asp Arg Leu Ala Leu Leu Gln Val Arg
 785 790 795 800

Arg Ile Leu Gln Gln Leu Gly Leu Asp Ser Thr Cys Glu Asp Ser Ile
 805 810 815

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

Cys Gly Ala Gly Leu Ala Ala Ile Val Glu Lys Arg Arg Glu Asp Gln
 835 840 845

Gly Leu Glu His Leu Arg Ile Thr Val Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr
 850 855 860

Lys Leu His Pro His Phe Ser Arg Ile Leu Gln Glu Thr Val Lys Glu
 865 870 875 880

Leu Ala Pro Arg Cys Asp Val Thr Phe Met Leu Ser Glu Asp Gly Ser
 885 890 895

Gly Lys Gly Ala Ala Leu Ile Thr Ala Val Ala Lys Arg Leu Gln Gln
 900 905 910

Ala Gln Lys Glu Asn
 915

<210> 12
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

Met Gly Gly Ile Met Ala Pro Lys Asp Ile Met Thr Asn Thr His Ala
 1 5 10 15

Lys Ser Ile Leu Asn Ser Met Asn Ser Leu Arg Lys Ser Asn Thr Leu
 20 25 30

Cys Asp Val Thr Leu Arg Val Glu Gln Lys Asp Phe Pro Ala His Arg
 35 40 45

ES 2 681 839 T3

Ile Val Leu Ala Ala Cys Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Met Phe Thr Ser
50 55 60

Glu Leu Ser Glu Lys Gly Lys Pro Tyr Val Asp Ile Gln Gly Leu Thr
65 70 75 80

Ala Ser Thr Met Glu Ile Leu Leu Asp Phe Val Tyr Thr Glu Thr Val
85 90 95

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

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

Gln Leu Asp Pro Ser Asn Cys Leu Gly Ile Arg Asp Phe Ala Glu Thr
130 135 140

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

His Phe Pro Glu Val Val Gln His Glu Glu Phe Ile Leu Leu Ser Gln
165 170 175

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

Glu Glu Pro Val Phe Glu Ala Val Ile Asn Trp Val Lys His Ala Lys
195 200 205

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

Pro Leu Leu Thr Pro Arg Tyr Ile Thr Asp Val Ile Asp Ala Glu Pro
225 230 235 240

Phe Ile Arg Cys Ser Leu Gln Cys Arg Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys
245 250 255

Lys Phe His Leu Arg Pro Glu Leu Arg Ser Gln Met Gln Gly Pro Arg
260 265 270

Thr Arg Ala Arg Leu Gly Ala Asn Glu Val Leu Leu Val Val Gly Gly
275 280 285

Phe Gly Ser Gln Gln Ser Pro Ile Asp Val Val Glu Lys Tyr Asp Pro
290 295 300

ES 2 681 839 T3

Lys Thr Gln Glu Trp Ser Phe Leu Pro Ser Ile Thr Arg Lys Arg Arg
 305 310 315 320

Tyr Val Ala Ser Val Ser Leu His Asp Arg Ile Tyr Val Ile Gly Gly
 325 330 335

Tyr Asp Gly Arg Ser Arg Leu Ser Ser Val Glu Cys Leu Asp Tyr Thr
 340 345 350

Ala Asp Glu Asp Gly Val Trp Tyr Ser Val Ala Pro Met Asn Val Arg
 355 360 365

Arg Gly Leu Ala Gly Ala Thr Thr Leu Gly Asp Met Ile Tyr Val Ser
 370 375 380

Gly Gly Phe Asp Gly Ser Arg Arg His Thr Ser Met Glu Arg Tyr Asp
 385 390 395 400

Pro Asn Ile Asp Gln Trp Ser Met Leu Gly Asp Met Gln Thr Ala Arg
 405 410 415

Glu Gly Ala Gly Leu Val Val Ala Ser Gly Val Ile Tyr Cys Leu Gly
 420 425 430

Gly Tyr Asp Gly Leu Asn Ile Leu Asn Ser Val Glu Lys Tyr Asp Pro
 435 440 445

His Thr Gly His Trp Thr Asn Val Thr Pro Met Ala Thr Lys Arg Ser
 450 455 460

Gly Ala Gly Val Ala Leu Leu Asn Asp His Ile Tyr Val Val Gly Gly
 465 470 475 480

Phe Asp Gly Thr Ala His Leu Ser Ser Val Glu Ala Tyr Asn Ile Arg
 485 490 495

Thr Asp Ser Trp Thr Thr Val Thr Ser Met Thr Thr Pro Arg Cys Tyr
 500 505 510

Val Gly Ala Thr Val Leu Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ile Ala Gly Tyr
 515 520 525

Asp Gly Asn Ser Leu Leu Ser Ser Ile Glu Cys Tyr Asp Pro Ile Ile
 530 535 540

Asp Ser Trp Glu Val Val Thr Ser Met Gly Thr Gln Arg Cys Asp Ala
 545 550 555 560

ES 2 681 839 T3

Gly Val Cys Val Leu Arg Glu Lys
565

<210> 13
<211> 609
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 13

Met Glu Gly Lys Pro Met Arg Arg Cys Thr Asn Ile Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Gly Met Asp Val Thr Ser Arg Cys Thr Leu Gly Asp Pro Asn Lys
20 25 30

Leu Pro Glu Gly Val Pro Gln Pro Ala Arg Met Pro Tyr Ile Ser Asp
35 40 45

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

Arg Glu Leu Cys Asp Val Val Leu Val Val Gly Ala Lys Lys Ile Tyr
65 70 75 80

Ala His Arg Val Ile Leu Ser Ala Cys Ser Pro Tyr Phe Arg Ala Met
85 90 95

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

Asp Ile Asp Glu Arg Ala Met Glu Leu Leu Ile Asp Phe Ala Tyr Thr
115 120 125

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

Ala Cys Leu Leu Gln Leu Ala Glu Ile Gln Glu Ala Cys Cys Glu Phe
145 150 155 160

Leu Lys Arg Gln Leu Asp Pro Ser Asn Cys Leu Gly Ile Arg Ala Phe
165 170 175

Ala Asp Thr His Ser Cys Arg Glu Leu Leu Arg Ile Ala Asp Lys Phe
180 185 190

Thr Gln His Asn Phe Gln Glu Val Met Glu Ser Glu Glu Phe Met Leu
195 200 205

ES 2 681 839 T3

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

ES 2 681 839 T3

450 455 460

Val Gly Gly Ser Asp Gly Thr Ser Pro Leu Asn Thr Val Glu Arg Tyr
465 470 475 480

Asn Pro Gln Glu Asn Arg Trp His Thr Ile Ala Pro Met Gly Thr Arg
485 490 495

Arg Lys His Leu Gly Cys Ala Val Tyr Gln Asp Met Ile Tyr Ala Val
500 505 510

Gly Gly Arg Asp Asp Thr Thr Glu Leu Ser Ser Ala Glu Arg Tyr Asn
515 520 525

Pro Arg Thr Asn Gln Trp Ser Pro Val Val Ala Met Thr Ser Arg Arg
530 535 540

Ser Gly Val Gly Leu Ala Val Val Asn Gly Gln Leu Met Ala Val Gly
545 550 555 560

Gly Phe Asp Gly Thr Thr Tyr Leu Lys Thr Ile Glu Val Phe Asp Pro
565 570 575

Asp Ala Asn Thr Trp Arg Leu Tyr Gly Gly Met Asn Tyr Arg Arg Leu
580 585 590

Gly Gly Gly Val Gly Val Ile Lys Met Thr His Cys Glu Ser His Ile
595 600 605

Trp

<210> 14
<211> 587
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 14

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

Gly Asp Asp Glu Lys Asn Gln Arg Thr Ile Thr Val Asn Pro Ala His
20 25 30

Met Gly Lys Ala Phe Lys Val Met Asn Glu Leu Arg Ser Lys Gln Leu
35 40 45

Leu Cys Asp Val Met Ile Val Ala Glu Asp Val Glu Ile Glu Ala His

ES 2 681 839 T3

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

ES 2 681 839 T3

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

Asp Phe Glu Glu Asp Arg Trp Asp Gln Ile Ala Glu Leu Pro Ser Arg
 325 330 335

Arg Cys Arg Ala Gly Val Val Phe Met Ala Gly His Val Tyr Ala Val
 340 345 350

Gly Gly Phe Asn Gly Ser Leu Arg Val Arg Thr Val Asp Val Tyr Asp
 355 360 365

Gly Val Lys Asp Gln Trp Thr Ser Ile Ala Ser Met Gln Glu Arg Arg
 370 375 380

Ser Thr Leu Gly Ala Ala Val Leu Asn Asp Leu Leu Tyr Ala Val Gly
 385 390 395 400

Gly Phe Asp Gly Ser Thr Gly Leu Ala Ser Val Glu Ala Tyr Ser Tyr
 405 410 415

Lys Thr Asn Glu Trp Phe Phe Val Ala Pro Met Asn Thr Arg Arg Ser
 420 425 430

Ser Val Gly Val Gly Val Val Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Val Gly Gly
 435 440 445

Tyr Asp Gly Ala Ser Arg Gln Cys Leu Ser Thr Val Glu Gln Tyr Asn
 450 455 460

Pro Ala Thr Asn Glu Trp Ile Tyr Val Ala Asp Met Ser Thr Arg Arg
 465 470 475 480

Ser Gly Ala Gly Val Gly Val Leu Ser Gly Gln Leu Tyr Ala Thr Gly
 485 490 495

Gly His Asp Gly Pro Leu Val Arg Lys Ser Val Glu Val Tyr Asp Pro
 500 505 510

Gly Thr Asn Thr Trp Lys Gln Val Ala Asp Met Asn Met Cys Arg Arg
 515 520 525

Asn Ala Gly Val Cys Ala Val Asn Gly Leu Leu Tyr Val Val Gly Gly
 530 535 540

Asp Asp Gly Ser Cys Asn Leu Ala Ser Val Glu Tyr Tyr Asn Pro Val
 545 550 555 560

ES 2 681 839 T3

Thr Asp Lys Trp Thr Leu Leu Pro Thr Asn Met Ser Thr Gly Arg Ser
 565 570 575

Tyr Ala Gly Val Ala Val Ile His Lys Ser Leu
 580 585

<210> 15
 <211> 642
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

Met Gln Pro Arg Ser Glu Arg Pro Ala Gly Arg Thr Gln Ser Pro Glu
 1 5 10 15

His Gly Ser Pro Gly Pro Gly Pro Glu Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 20 25 30

Gln Pro Pro Ala Pro Glu Ala Glu Arg Thr Arg Pro Arg Gln Ala Arg
 35 40 45

Pro Ala Ala Pro Met Glu Gly Ala Val Gln Leu Leu Ser Arg Glu Gly
 50 55 60

His Ser Val Ala His Asn Ser Lys Arg His Tyr His Asp Ala Phe Val
 65 70 75 80

Ala Met Ser Arg Met Arg Gln Arg Gly Leu Leu Cys Asp Ile Val Leu
 85 90 95

His Val Ala Ala Lys Glu Ile Arg Ala His Lys Val Val Leu Ala Ser
 100 105 110

Cys Ser Pro Tyr Phe His Ala Met Phe Thr Asn Glu Met Ser Glu Ser
 115 120 125

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

Gln Leu Val Gln Phe Ala Tyr Thr Ala Glu Ile Val Val Gly Glu Gly
 145 150 155 160

Asn Val Gln Thr Leu Leu Pro Ala Ala Ser Leu Leu Gln Leu Asn Gly
 165 170 175

Val Arg Asp Ala Cys Cys Lys Phe Leu Leu Ser Gln Leu Asp Pro Ser
 180 185 190

ES 2 681 839 T3

Asn Cys Leu Gly Ile Arg Gly Phe Ala Asp Ala His Ser Cys Ser Asp
 195 200 205

Leu Leu Lys Ala Ala His Arg Tyr Val Leu Gln His Phe Val Asp Val
 210 215 220

Ala Lys Thr Glu Glu Phe Met Leu Leu Pro Leu Lys Gln Val Leu Glu
 225 230 235 240

Leu Val Ser Ser Asp Ser Leu Asn Val Pro Ser Glu Glu Glu Val Tyr
 245 250 255

Arg Ala Val Leu Ser Trp Val Lys His Asp Val Asp Ala Arg Arg Gln
 260 265 270

His Val Pro Arg Leu Met Lys Cys Val Arg Leu Pro Leu Leu Ser Arg
 275 280 285

Asp Phe Leu Leu Gly His Val Asp Ala Glu Ser Leu Val Arg His His
 290 295 300

Pro Asp Cys Lys Asp Leu Leu Ile Glu Ala Leu Lys Phe His Leu Leu
 305 310 315 320

Pro Glu Gln Arg Gly Val Leu Gly Thr Ser Arg Thr Arg Pro Arg Arg
 325 330 335

Cys Glu Gly Ala Gly Pro Val Leu Phe Ala Val Gly Gly Gly Ser Leu
 340 345 350

Phe Ala Ile His Gly Asp Cys Glu Ala Tyr Asp Thr Arg Thr Asp Arg
 355 360 365

Trp His Val Val Ala Ser Met Ser Thr Arg Arg Ala Arg Val Gly Val
 370 375 380

Ala Ala Val Gly Asn Arg Leu Tyr Ala Val Gly Gly Tyr Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ser Asp Leu Ala Thr Val Glu Ser Tyr Asp Pro Val Thr Asn Thr Trp
 405 410 415

Gln Pro Glu Val Ser Met Gly Thr Arg Arg Ser Cys Leu Gly Val Ala
 420 425 430

Ala Leu His Gly Leu Leu Tyr Ser Ala Gly Gly Tyr Asp Gly Ala Ser
 435 440 445

ES 2 681 839 T3

Cys Leu Asn Ser Ala Glu Arg Tyr Asp Pro Leu Thr Gly Thr Trp Thr
 450 455 460

Ser Val Ala Ala Met Ser Thr Arg Arg Arg Tyr Val Arg Val Ala Thr
 465 470 475 480

Leu Asp Gly Asn Leu Tyr Ala Val Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Ser His
 485 490 495

Leu Ala Thr Val Glu Lys Tyr Glu Pro Gln Val Asn Val Trp Ser Pro
 500 505 510

Val Ala Ser Met Leu Ser Arg Arg Ser Ser Ala Gly Val Ala Val Leu
 515 520 525

Glu Gly Ala Leu Tyr Val Ala Gly Gly Asn Asp Gly Thr Ser Cys Leu
 530 535 540

Asn Ser Val Glu Arg Tyr Ser Pro Lys Ala Gly Ala Trp Glu Ser Val
 545 550 555 560

Ala Pro Met Asn Ile Arg Arg Ser Thr His Asp Leu Val Ala Met Asp
 565 570 575

Gly Trp Leu Tyr Ala Val Gly Gly Asn Asp Gly Ser Ser Ser Leu Asn
 580 585 590

Ser Ile Glu Lys Tyr Asn Pro Arg Thr Asn Lys Trp Val Ala Ala Ser
 595 600 605

Cys Met Phe Thr Arg Arg Ser Ser Val Gly Val Ala Val Leu Glu Leu
 610 615 620

Leu Asn Phe Pro Pro Pro Ser Ser Pro Thr Leu Ser Val Ser Ser Thr
 625 630 635 640

Ser Leu

<210> 16
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 16

Met Val Trp Leu Glu Ala Arg Pro Gln Ile Leu Phe Val Cys Thr Lys
 1 5 10 15

ES 2 681 839 T3

Gln Gly His Gln Lys Pro Leu Asp Ser Lys Asp Asp Asn Thr Glu Lys
 20 25 30

His Cys Pro Val Thr Val Asn Pro Trp His Met Lys Lys Ala Phe Lys
 35 40 45

Val Met Asn Glu Leu Arg Ser Gln Asn Leu Leu Cys Asp Val Thr Ile
 50 55 60

Val Ala Glu Asp Met Glu Ile Ser Ala His Arg Val Val Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Cys Ser Pro Tyr Phe His Ala Met Phe Thr Gly Glu Met Ser Glu Ser
 85 90 95

Arg Ala Lys Arg Val Arg Ile Lys Glu Val Asp Gly Trp Thr Leu Arg
 100 105 110

Met Leu Ile Asp Tyr Val Tyr Thr Ala Glu Ile Gln Val Thr Glu Glu
 115 120 125

Asn Val Gln Val Leu Leu Pro Ala Ala Gly Leu Leu Gln Leu Gln Asp
 130 135 140

Val Lys Lys Thr Cys Cys Glu Phe Leu Glu Ser Gln Leu His Pro Val
 145 150 155 160

Asn Cys Leu Gly Ile Arg Ala Phe Ala Asp Met His Ala Cys Thr Asp
 165 170 175

Leu Leu Asn Lys Ala Asn Thr Tyr Ala Glu Gln His Phe Ala Asp Val
 180 185 190

Val Leu Ser Glu Glu Phe Leu Asn Leu Gly Ile Glu Gln Val Cys Ser
 195 200 205

Leu Ile Ser Ser Asp Lys Leu Thr Ile Ser Ser Glu Glu Lys Val Phe
 210 215 220

Glu Ala Val Ile Ala Trp Val Asn His Asp Lys Asp Val Arg Gln Glu
 225 230 235 240

Phe Met Ala Arg Leu Met Glu His Val Arg Leu Pro Leu Leu Pro Arg
 245 250 255

Glu Tyr Leu Val Gln Arg Val Glu Glu Glu Ala Leu Val Lys Asn Ser

ES 2 681 839 T3

Val Arg Lys Ser Val Glu Val Tyr Asp Pro Thr Thr Asn Ala Trp Arg
515 520 525

Gln Val Ala Asp Met Asn Met Cys Arg Arg Asn Ala Gly Val Cys Ala
530 535 540

Val Asn Gly Leu Leu Tyr Val Val Gly Gly Asp Asp Gly Ser Cys Asn
545 550 555 560

Leu Ala Ser Val Glu Tyr Tyr Asn Pro Thr Thr Asp Lys Trp Thr Val
565 570 575

Val Ser Ser Cys Met Ser Thr Gly Arg Ser Tyr Ala Gly Val Thr Val
580 585 590

Ile Asp Lys Pro Leu
595

<210> 17
<211> 593
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 17

Met Glu Thr Pro Pro Leu Pro Pro Ala Cys Thr Lys Gln Gly His Gln
1 5 10 15

Lys Pro Leu Asp Ser Lys Asp Asp Asn Thr Glu Lys His Cys Pro Val
20 25 30

Thr Val Asn Pro Trp His Met Lys Lys Ala Phe Lys Val Met Asn Glu
35 40 45

Leu Arg Ser Gln Asn Leu Leu Cys Asp Val Thr Ile Val Ala Glu Asp
50 55 60

Met Glu Ile Ser Ala His Arg Val Val Leu Ala Ala Cys Ser Pro Tyr
65 70 75 80

Phe His Ala Met Phe Thr Gly Glu Met Ser Glu Ser Arg Ala Lys Arg
85 90 95

Val Arg Ile Lys Glu Val Asp Gly Trp Thr Leu Arg Met Leu Ile Asp
100 105 110

Tyr Val Tyr Thr Ala Glu Ile Gln Val Thr Glu Glu Asn Val Gln Val
115 120 125

ES 2 681 839 T3

Leu Leu Pro Ala Ala Gly Leu Leu Gln Leu Gln Asp Val Lys Lys Thr
 130 135 140

Cys Cys Glu Phe Leu Glu Ser Gln Leu His Pro Val Asn Cys Leu Gly
 145 150 155 160

Ile Arg Ala Phe Ala Asp Met His Ala Cys Thr Asp Leu Leu Asn Lys
 165 170 175

Ala Asn Thr Tyr Ala Glu Gln His Phe Ala Asp Val Val Leu Ser Glu
 180 185 190

Glu Phe Leu Asn Leu Gly Ile Glu Gln Val Cys Ser Leu Ile Ser Ser
 195 200 205

Asp Lys Leu Thr Ile Ser Ser Glu Glu Lys Val Phe Glu Ala Val Ile
 210 215 220

Ala Trp Val Asn His Asp Lys Asp Val Arg Gln Glu Phe Met Ala Arg
 225 230 235 240

Leu Met Glu His Val Arg Leu Pro Leu Leu Pro Arg Glu Tyr Leu Val
 245 250 255

Gln Arg Val Glu Glu Glu Ala Leu Val Lys Asn Ser Ser Ala Cys Lys
 260 265 270

Asp Tyr Leu Ile Glu Ala Met Lys Tyr His Leu Leu Pro Thr Glu Gln
 275 280 285

Arg Ile Leu Met Lys Ser Val Arg Thr Arg Leu Arg Thr Pro Met Asn
 290 295 300

Leu Pro Lys Leu Met Val Val Val Gly Gly Gln Ala Pro Lys Ala Ile
 305 310 315 320

Arg Ser Val Glu Cys Tyr Asp Phe Lys Glu Glu Arg Trp His Gln Val
 325 330 335

Ala Glu Leu Pro Ser Arg Arg Cys Arg Ala Gly Met Val Tyr Met Ala
 340 345 350

Gly Leu Val Phe Ala Val Gly Gly Phe Asn Gly Ser Leu Arg Val Arg
 355 360 365

Thr Val Asp Ser Tyr Asp Pro Val Lys Asp Gln Trp Thr Ser Val Ala
 370 375 380

ES 2 681 839 T3

Asn Met Arg Asp Arg Arg Ser Thr Leu Gly Ala Ala Val Leu Asn Gly
385 390 395 400

Leu Leu Tyr Ala Val Gly Gly Phe Asp Gly Ser Thr Gly Leu Ser Ser
405 410 415

Val Glu Ala Tyr Asn Ile Lys Ser Asn Glu Trp Phe His Val Ala Pro
420 425 430

Met Asn Thr Arg Arg Ser Ser Val Gly Val Gly Val Val Gly Gly Leu
435 440 445

Leu Tyr Ala Val Gly Gly Tyr Asp Gly Ala Ser Arg Gln Cys Leu Ser
450 455 460

Thr Val Glu Cys Tyr Asn Ala Thr Thr Asn Glu Trp Thr Tyr Ile Ala
465 470 475 480

Glu Met Ser Thr Arg Arg Ser Gly Ala Gly Val Gly Val Leu Asn Asn
485 490 495

Leu Leu Tyr Ala Val Gly Gly His Asp Gly Pro Leu Val Arg Lys Ser
500 505 510

Val Glu Val Tyr Asp Pro Thr Thr Asn Ala Trp Arg Gln Val Ala Asp
515 520 525

Met Asn Met Cys Arg Arg Asn Ala Gly Val Cys Ala Val Asn Gly Leu
530 535 540

Leu Tyr Val Val Gly Gly Asp Asp Gly Ser Cys Asn Leu Ala Ser Val
545 550 555 560

Glu Tyr Tyr Asn Pro Thr Thr Asp Lys Trp Thr Val Val Ser Ser Cys
565 570 575

Met Ser Thr Gly Arg Ser Tyr Ala Gly Val Thr Val Ile Asp Lys Pro
580 585 590

Leu

- <210> 18
- <211> 574
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 18

ES 2 681 839 T3

Met Val Glu Asp Gly Ala Glu Glu Leu Glu Asp Leu Val His Phe Ser
1 5 10 15

Val Ser Glu Leu Pro Ser Arg Gly Tyr Gly Val Met Glu Glu Ile Arg
20 25 30

Arg Gln Gly Lys Leu Cys Asp Val Thr Leu Lys Ile Gly Asp His Lys
35 40 45

Phe Ser Ala His Arg Ile Val Leu Ala Ala Ser Ile Pro Tyr Phe His
50 55 60

Ala Met Phe Thr Asn Asp Met Met Glu Cys Lys Gln Asp Glu Ile Val
65 70 75 80

Met Gln Gly Met Asp Pro Ser Ala Leu Glu Ala Leu Ile Asn Phe Ala
85 90 95

Tyr Asn Gly Asn Leu Ala Ile Asp Gln Gln Asn Val Gln Ser Leu Leu
100 105 110

Met Gly Ala Ser Phe Leu Gln Leu Gln Ser Ile Lys Asp Ala Cys Cys
115 120 125

Thr Phe Leu Arg Glu Arg Leu His Pro Lys Asn Cys Leu Gly Val Arg
130 135 140

Gln Phe Ala Glu Thr Met Met Cys Ala Val Leu Tyr Asp Ala Ala Asn
145 150 155 160

Ser Phe Ile His Gln His Phe Val Glu Val Ser Met Ser Glu Glu Phe
165 170 175

Leu Ala Leu Pro Leu Glu Asp Val Leu Glu Leu Val Ser Arg Asp Glu
180 185 190

Leu Asn Val Lys Ser Glu Glu Gln Val Phe Glu Ala Ala Leu Ala Trp
195 200 205

Val Arg Tyr Asp Arg Glu Gln Arg Gly Pro Tyr Leu Pro Glu Leu Leu
210 215 220

Ser Asn Ile Arg Leu Pro Leu Cys Arg Pro Gln Phe Leu Ser Asp Arg
225 230 235 240

Val Gln Gln Asp Asp Leu Val Arg Cys Cys His Lys Cys Arg Asp Leu
245 250 255

ES 2 681 839 T3

Val Asp Glu Ala Lys Asp Tyr His Leu Met Pro Glu Arg Arg Pro His
 260 265 270

Leu Pro Ala Phe Arg Thr Arg Pro Arg Cys Cys Thr Ser Ile Ala Gly
 275 280 285

Leu Ile Tyr Ala Val Gly Gly Leu Asn Ser Ala Gly Asp Ser Leu Asn
 290 295 300

Val Val Glu Val Phe Asp Pro Ile Ala Asn Cys Trp Glu Arg Cys Arg
 305 310 315 320

Pro Met Thr Thr Ala Arg Ser Arg Val Gly Val Ala Val Val Asn Gly
 325 330 335

Leu Leu Tyr Ala Ile Gly Gly Tyr Asp Gly Gln Leu Arg Leu Ser Thr
 340 345 350

Val Glu Ala Tyr Asn Pro Glu Thr Asp Thr Trp Thr Arg Val Gly Ser
 355 360 365

Met Asn Ser Lys Arg Ser Ala Met Gly Thr Val Val Leu Asp Gly Gln
 370 375 380

Ile Tyr Val Cys Gly Gly Tyr Asp Gly Asn Ser Ser Leu Ser Ser Val
 385 390 395 400

Glu Thr Tyr Ser Pro Glu Thr Asp Lys Trp Thr Val Val Thr Ser Met
 405 410 415

Ser Ser Asn Arg Ser Ala Ala Gly Val Thr Val Phe Glu Gly Arg Ile
 420 425 430

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

His Tyr Asn His His Thr Ala Thr Trp His Pro Ala Ala Gly Met Leu
 450 455 460

Asn Lys Arg Cys Arg His Gly Ala Ala Ser Leu Gly Ser Lys Met Phe
 465 470 475 480

Val Cys Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Phe Leu Ser Ile Ala Glu Met
 485 490 495

Tyr Ser Ser Val Ala Asp Gln Trp Cys Leu Ile Val Pro Met His Thr

ES 2 681 839 T3

500

505

510

Arg Arg Ser Arg Val Ser Leu Val Ala Ser Cys Gly Arg Leu Tyr Ala
515 520 525

Val Gly Gly Tyr Asp Gly Gln Ser Asn Leu Ser Ser Val Glu Met Tyr
530 535 540

Asp Pro Glu Thr Asp Cys Trp Thr Phe Met Ala Pro Met Ala Cys His
545 550 555 560

Glu Gly Gly Val Gly Val Gly Cys Ile Pro Leu Leu Thr Ile
565 570

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 19

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

10 <210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

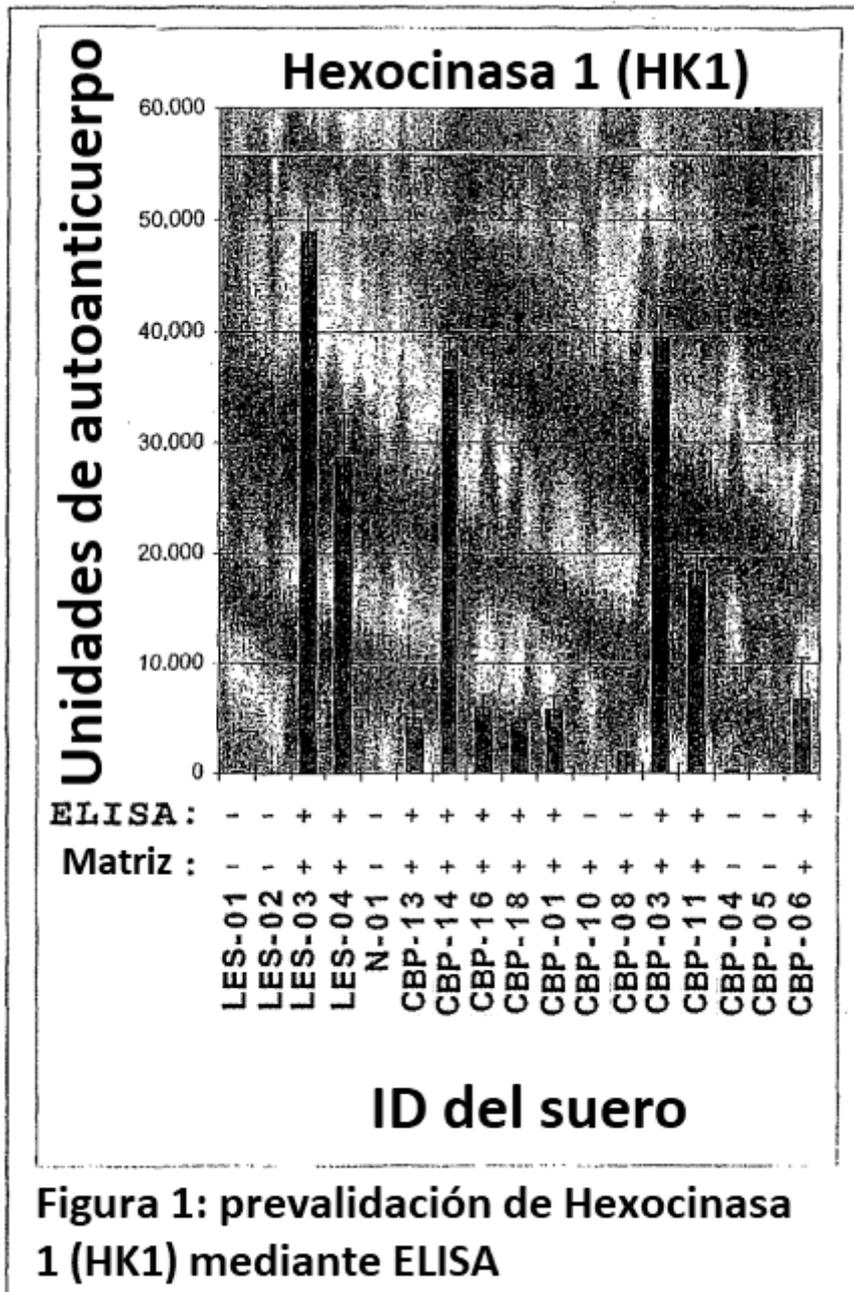
<220>
15 <223> Sintética

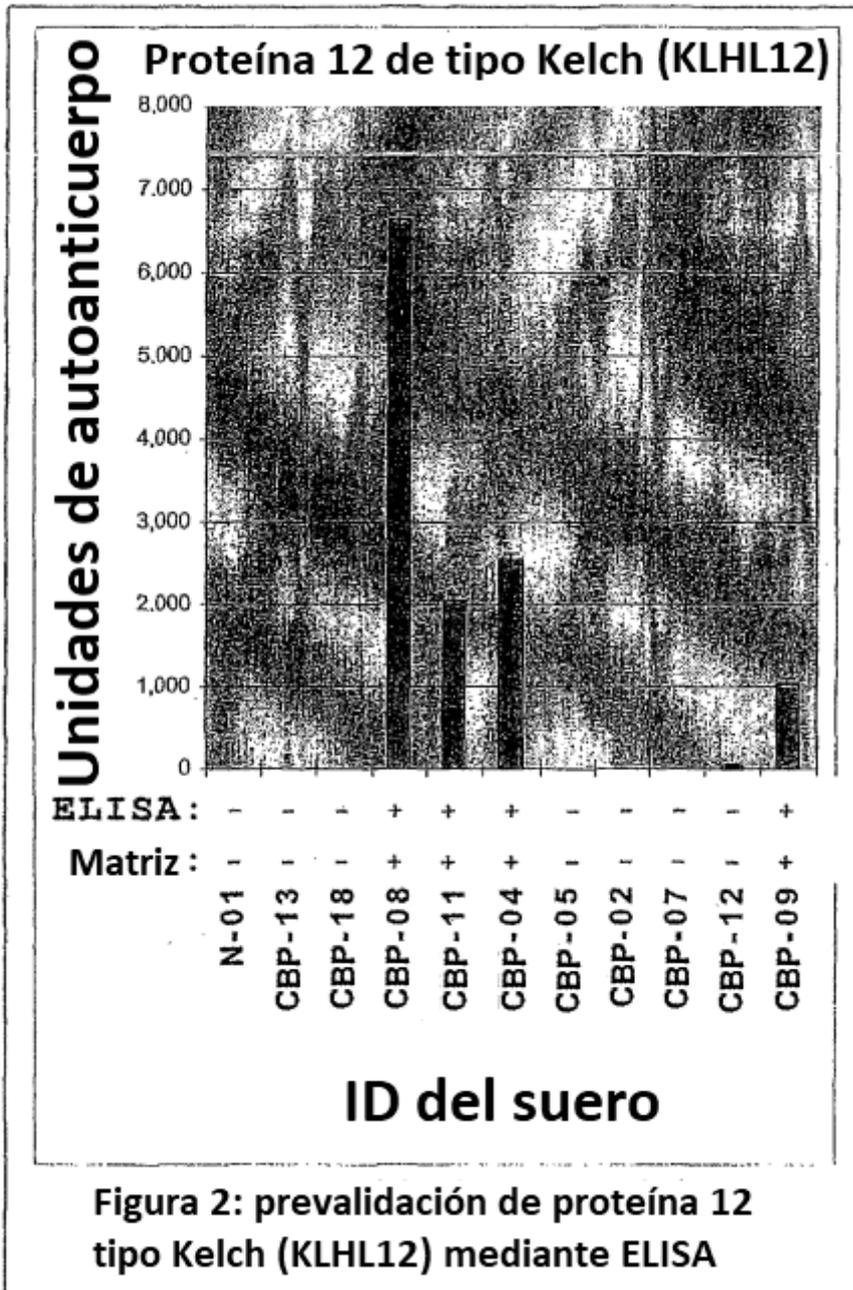
<400> 20

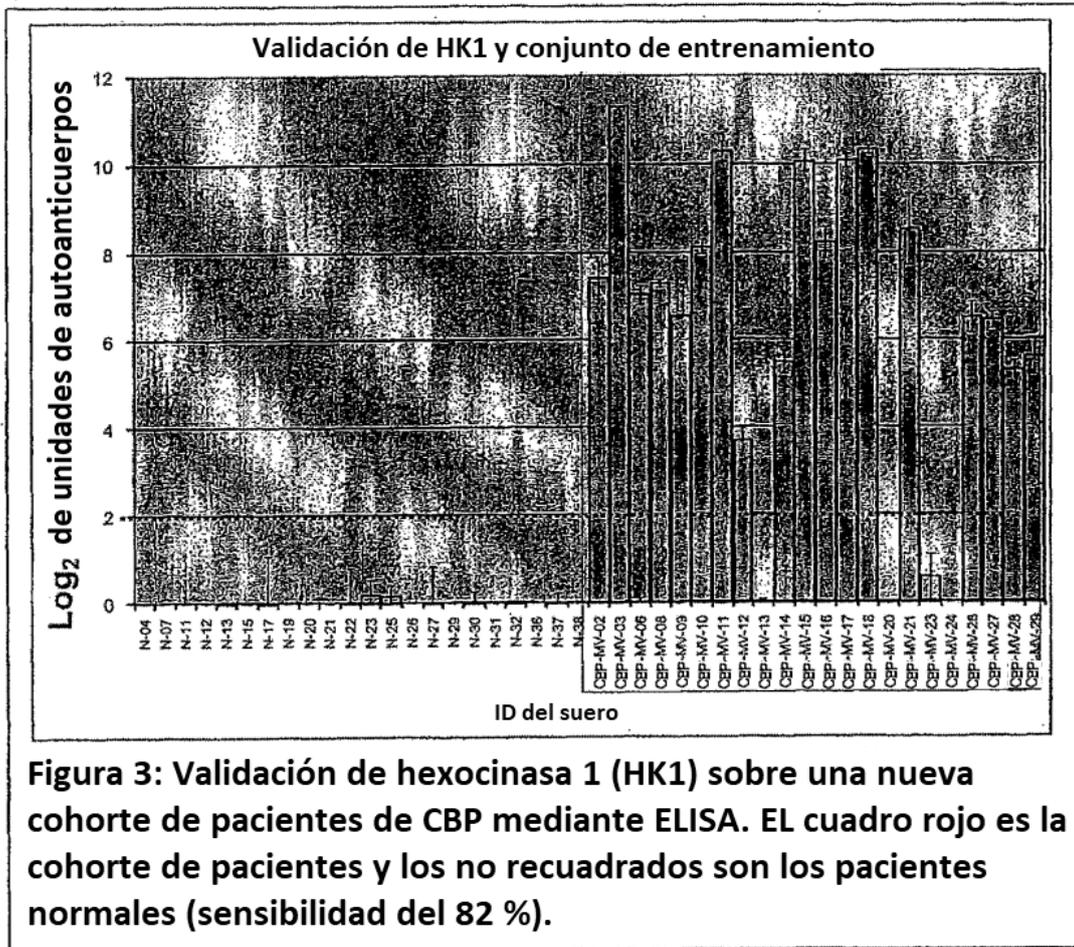
Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
1 5 10

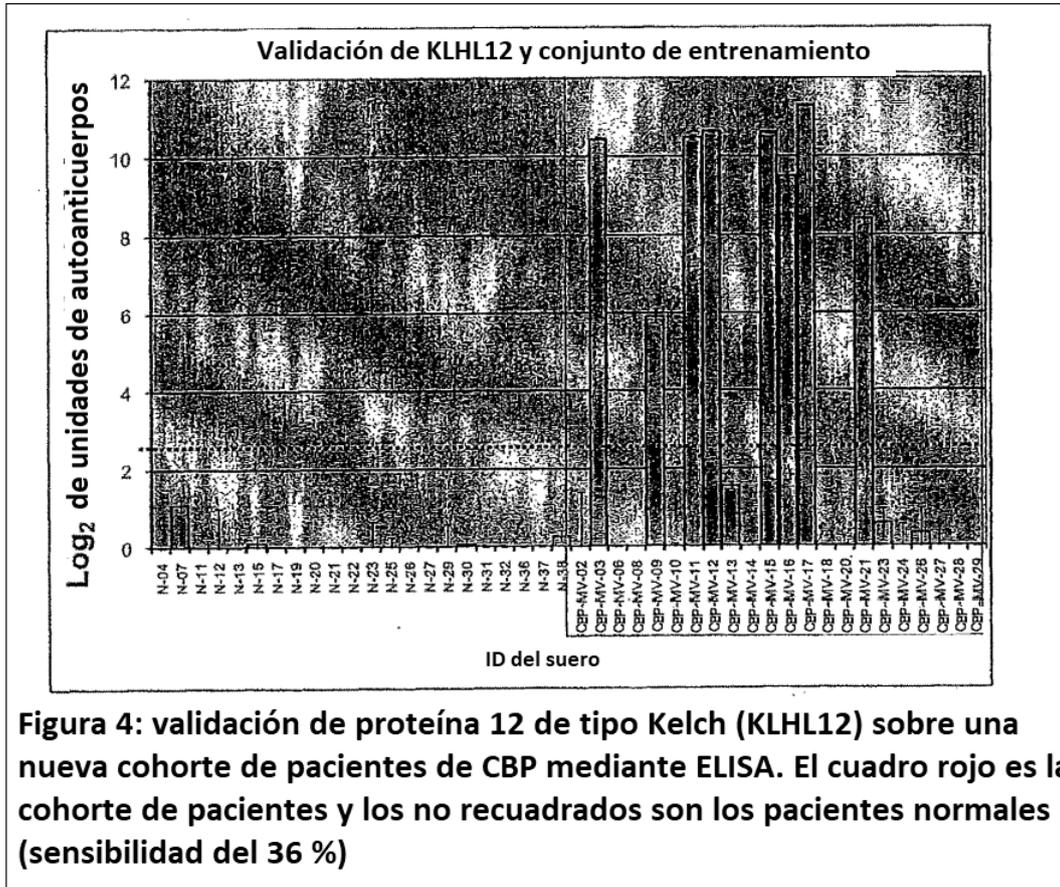
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico de cirrosis biliar primaria (CBP) en un individuo que comprende:
 - a. poner en contacto una muestra de ensayo del individuo con uno o más antígenos diana, comprendiendo cada uno un epítipo 12 de tipo kelch o un homólogo de 12 de tipo kelch de la Tabla VI; y
 - b. detectar la unión del uno o más antígenos diana a uno o más anticuerpos en la muestra de ensayo, en el que la presencia del uno o más anticuerpos unidos al uno o más antígenos diana es indicativa de cirrosis biliar primaria (CBP).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente comparar el nivel de dichos anticuerpos con un nivel umbral; en el que un nivel aumentado de los anticuerpos en dicha muestra en comparación con el nivel umbral es indicativo de CBP.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que los uno o más antígenos diana se inmovilizan en un soporte sólido.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de ensayo es células, tejidos, fluidos corporales, sangre, plasma o suero.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con dos o más de los antígenos diana.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con tres o más de los antígenos diana.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con cuatro o más de los antígenos diana.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de ensayo se pone en contacto con cinco o más de los antígenos diana.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho antígeno diana comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS. 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho antígeno diana comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 12.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho antígeno diana comprende un antígeno recombinante.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho antígeno diana comprende adicionalmente una secuencia de marcador.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicha secuencia de marcador se localiza en C-terminal o en N-terminal, o tanto en C-terminal como en N-terminal de dicho antígeno diana.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha etapa de detección comprende adicionalmente un anticuerpo anti-inmunoglobulina (IG) marcado y en el que el antígeno diana, el anticuerpo y el anticuerpo anti-IG forman un complejo.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende realizar un ensayo seleccionado del grupo que consiste en: un inmunoensayo en fase sólida, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), un procedimiento inmunocromatográfico, un ensayo de transferencia de puntos, un ensayo de quimioluminiscencia, y un ensayo colorimétrico.









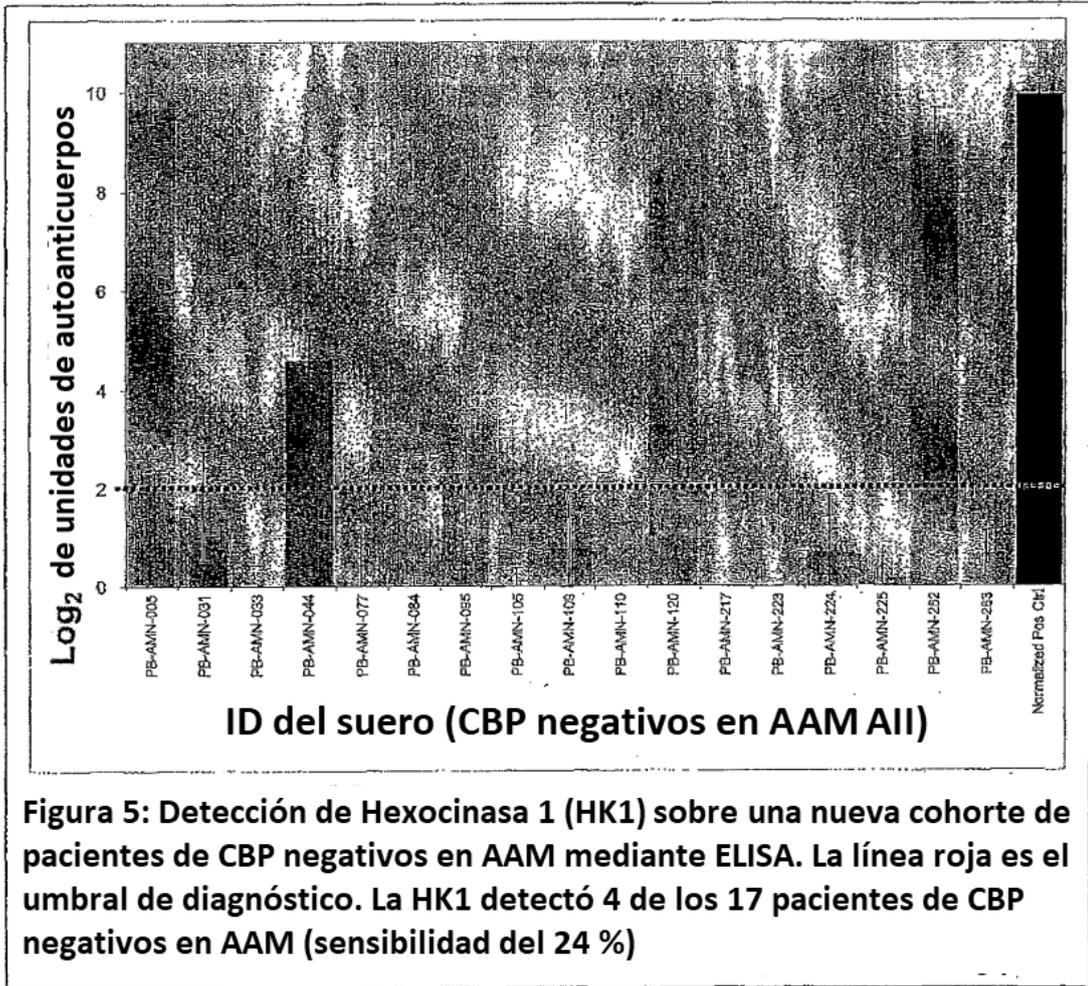


Figura 5: Detección de Hexocinasa 1 (HK1) sobre una nueva cohorte de pacientes de CBP negativos en AAM mediante ELISA. La línea roja es el umbral de diagnóstico. La HK1 detectó 4 de los 17 pacientes de CBP negativos en AAM (sensibilidad del 24 %)

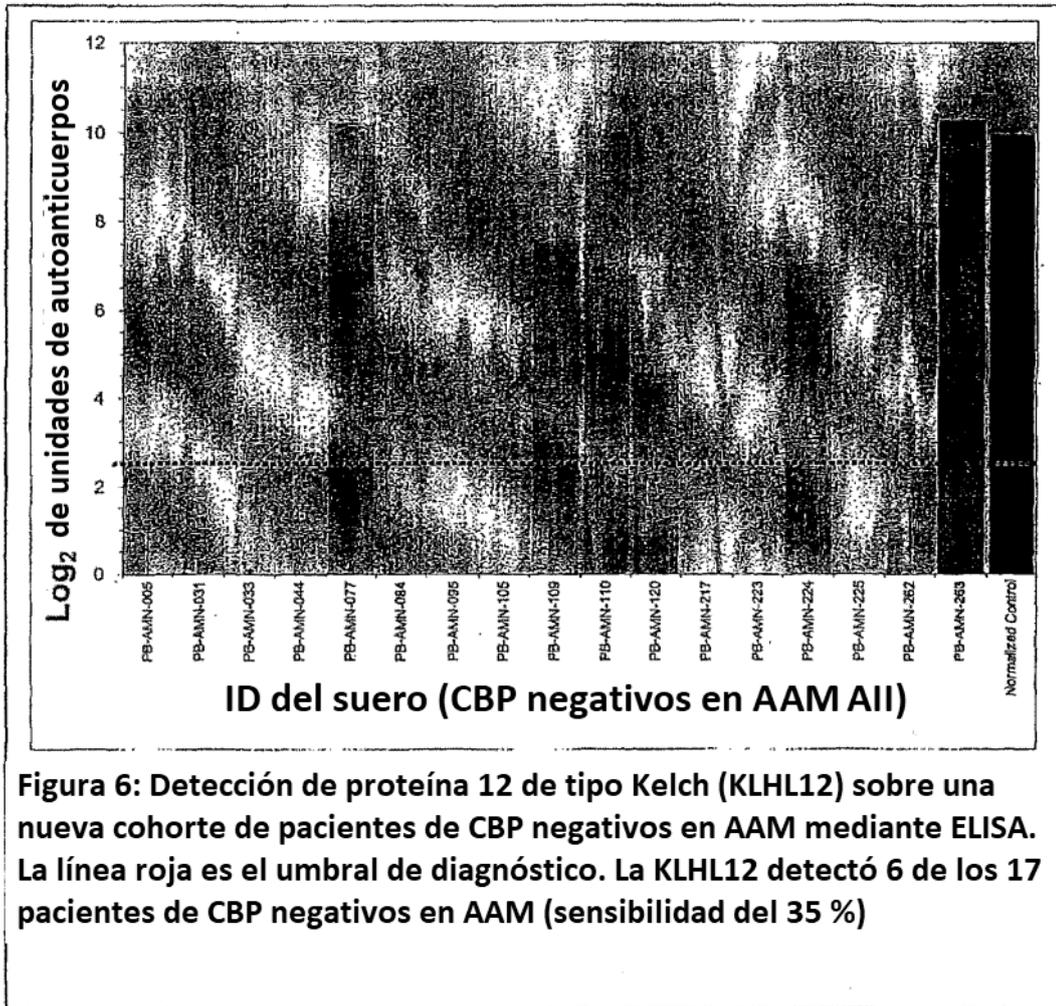
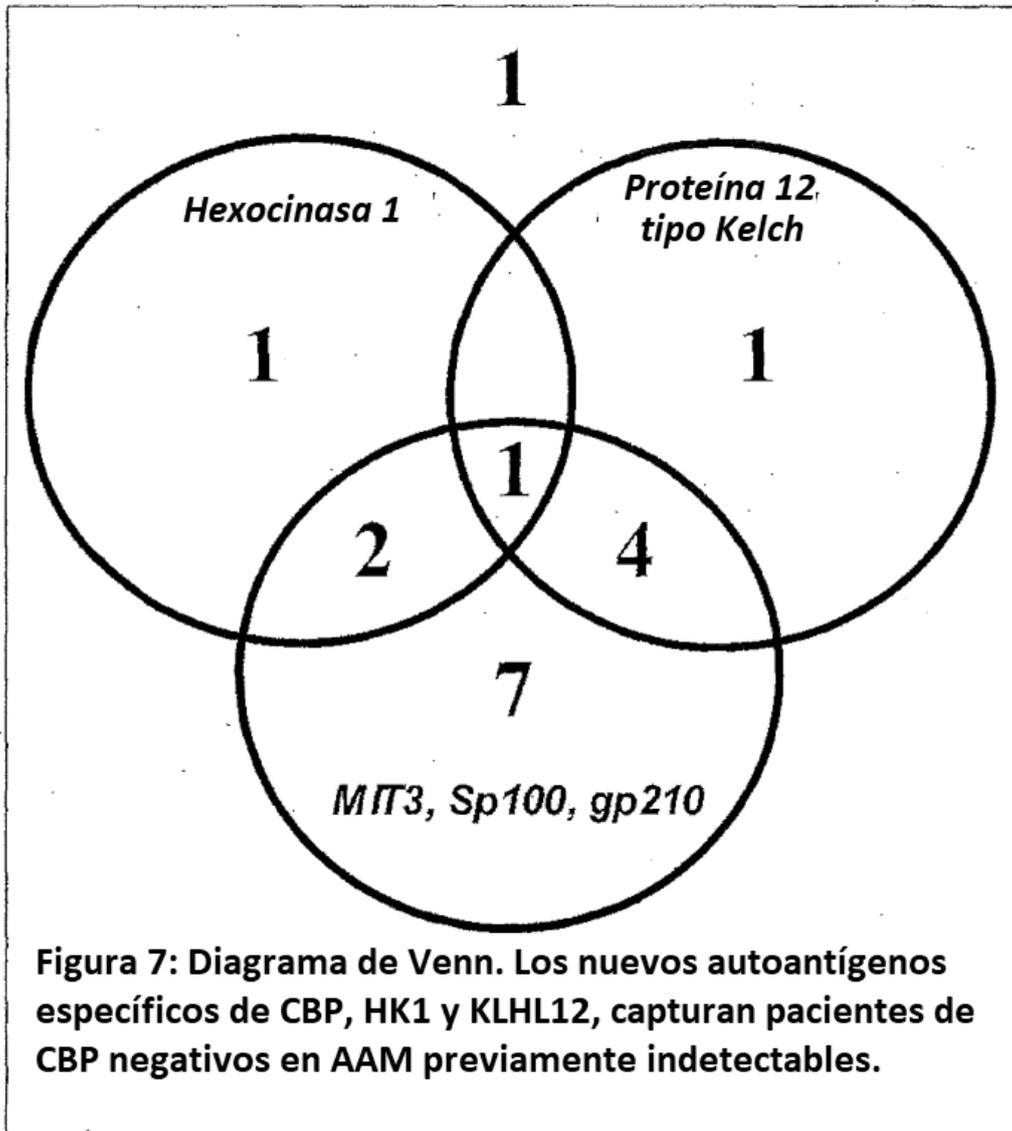


Figura 6: Detección de proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12) sobre una nueva cohorte de pacientes de CBP negativos en AAM mediante ELISA. La línea roja es el umbral de diagnóstico. La KLHL12 detectó 6 de los 17 pacientes de CBP negativos en AAM (sensibilidad del 35 %)



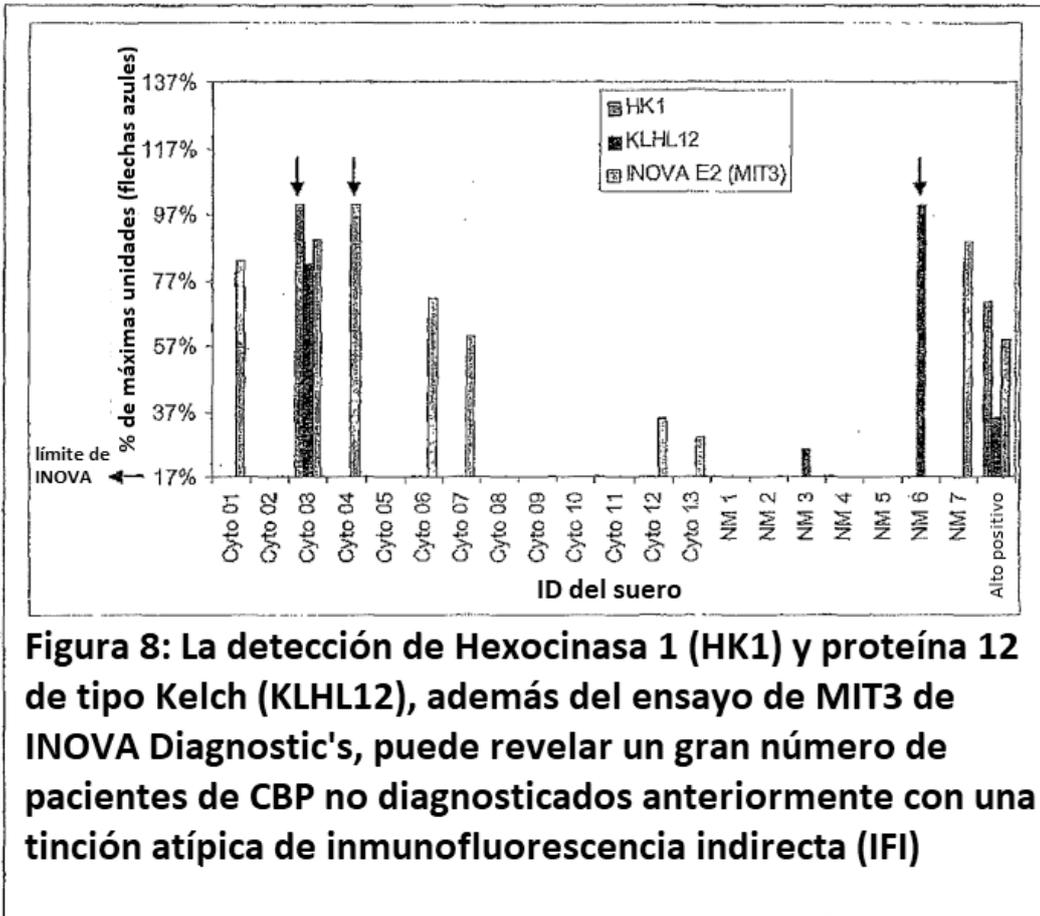
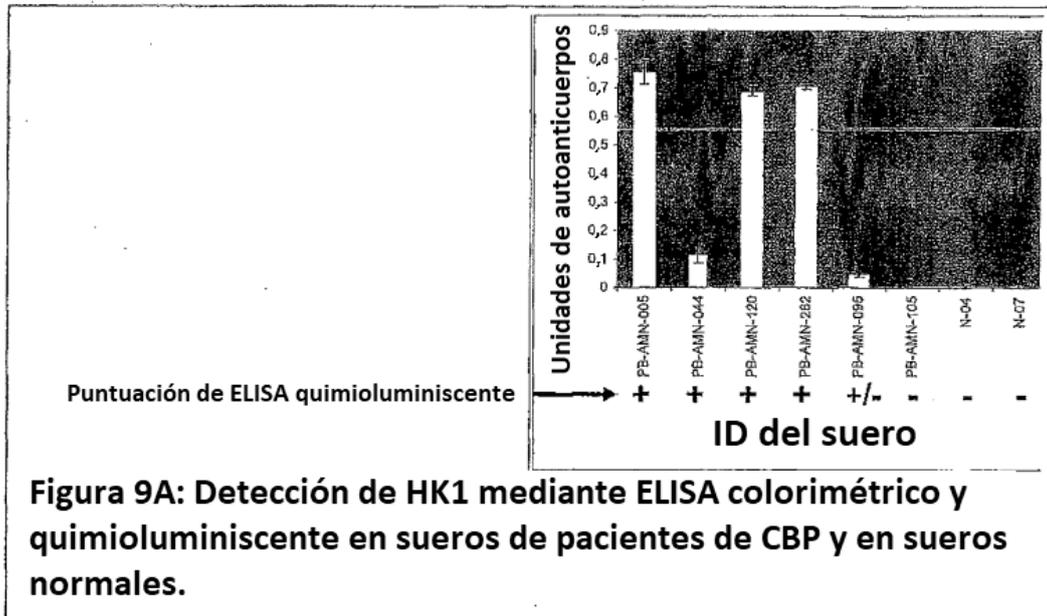
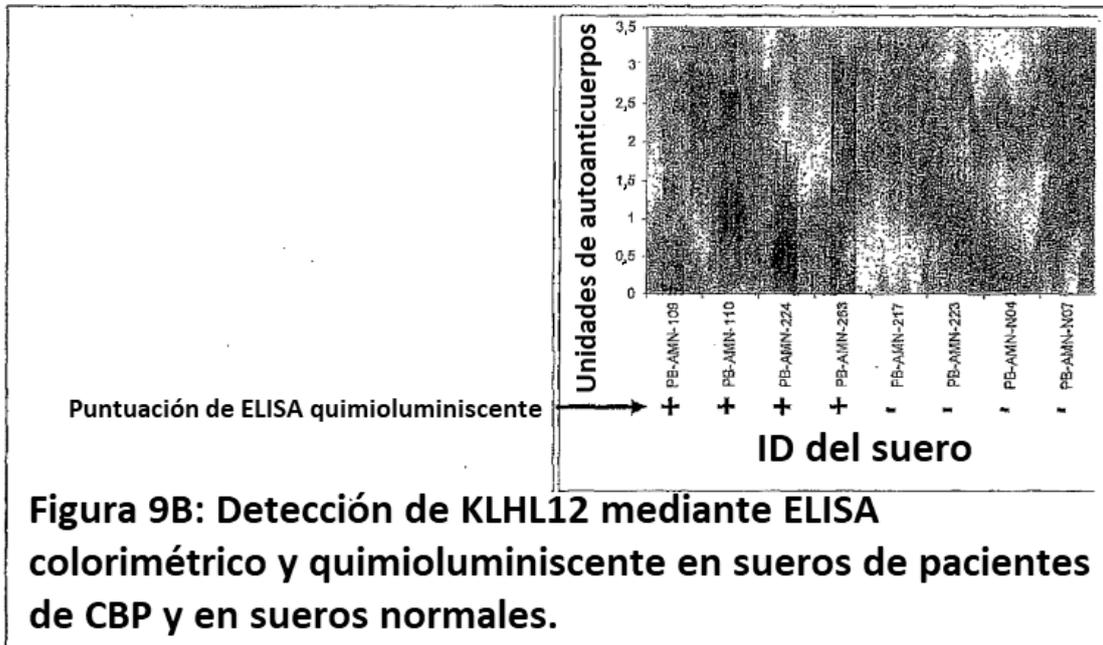


Figura 8: La detección de Hexocinasa 1 (HK1) y proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12), además del ensayo de MIT3 de INOVA Diagnostic's, puede revelar un gran número de pacientes de CBP no diagnosticados anteriormente con una tinción atípica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)





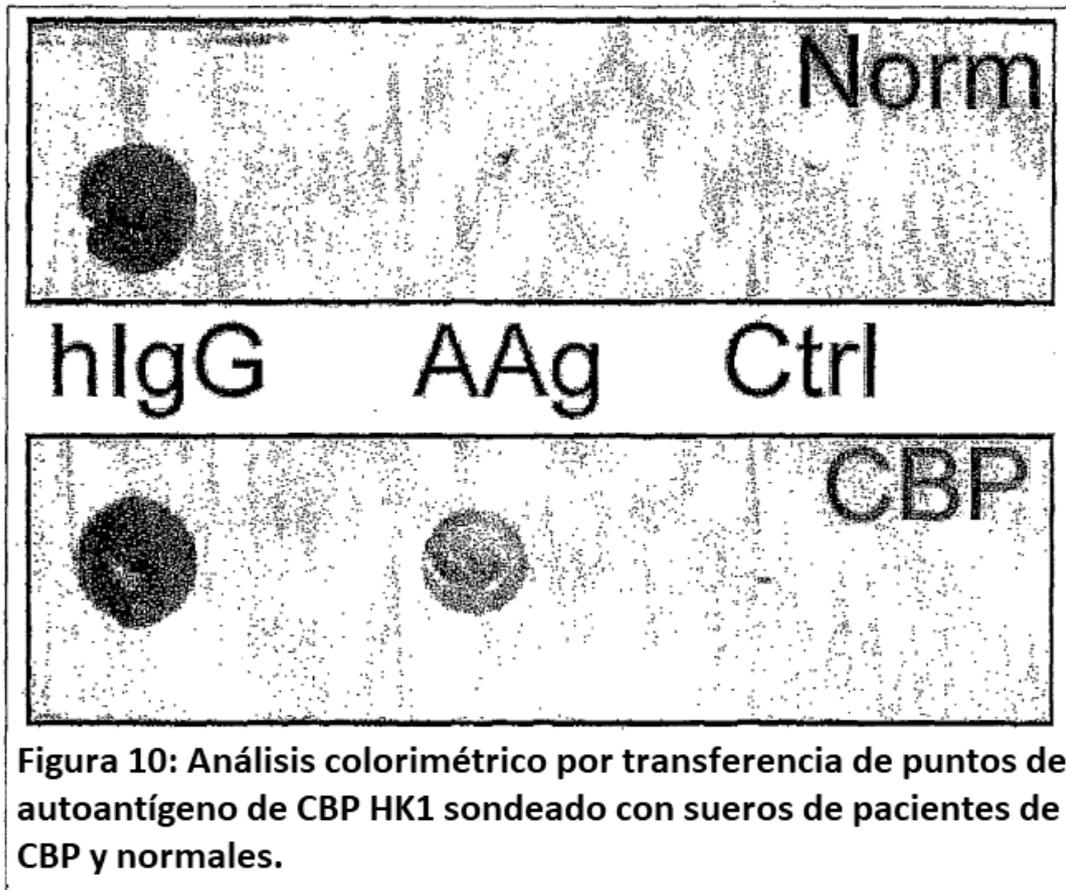


Figura 10: Análisis colorimétrico por transferencia de puntos de autoantígeno de CBP HK1 sondeado con sueros de pacientes de CBP y normales.

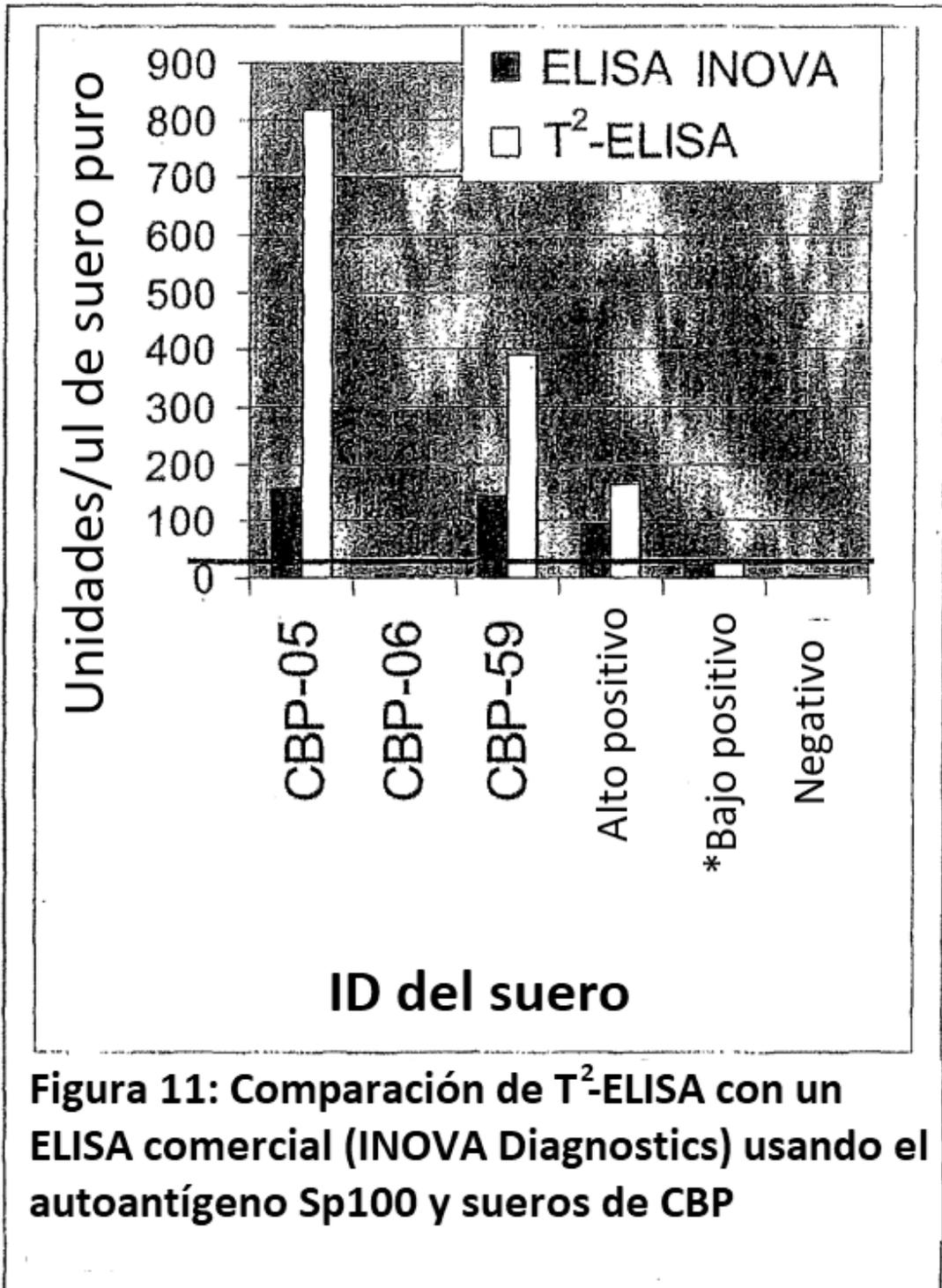


Figura 11: Comparación de T²-ELISA con un ELISA comercial (INOVA Diagnostics) usando el autoantígeno Sp100 y sueros de CBP

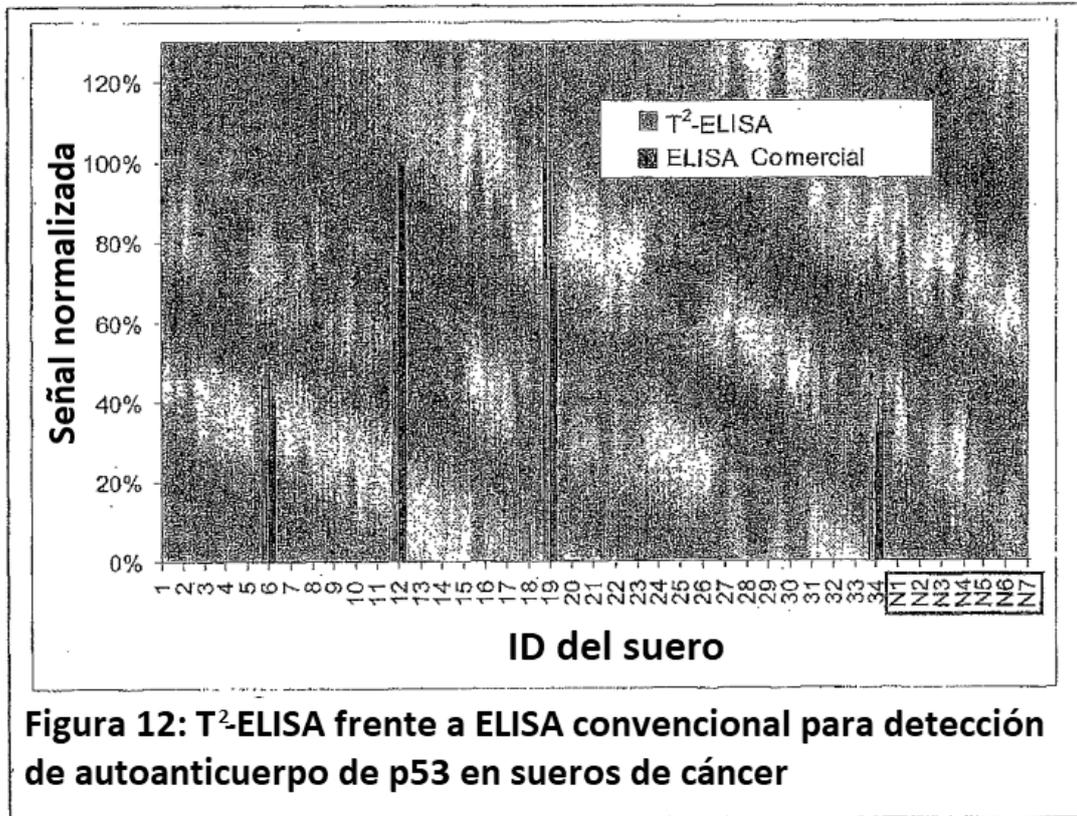
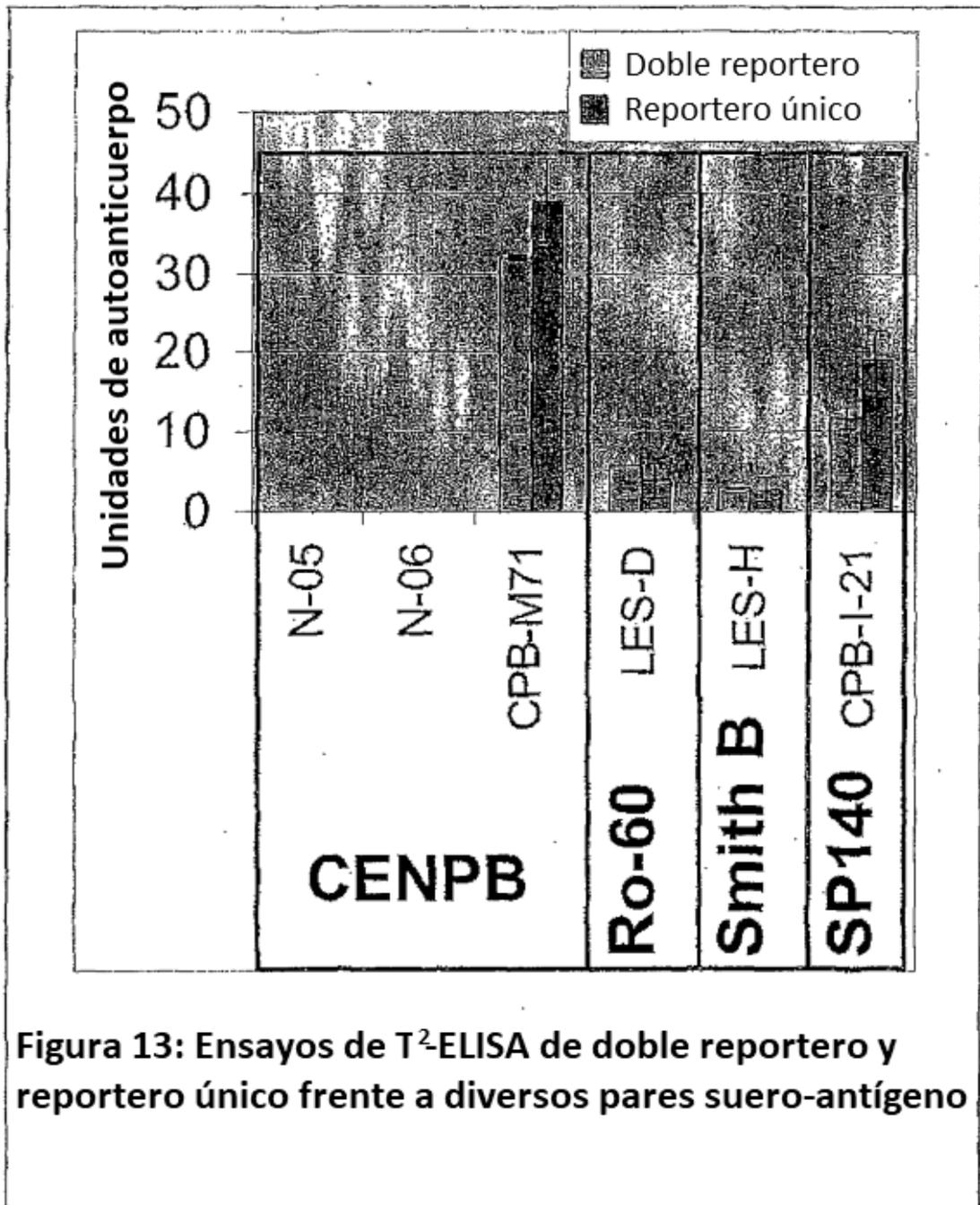
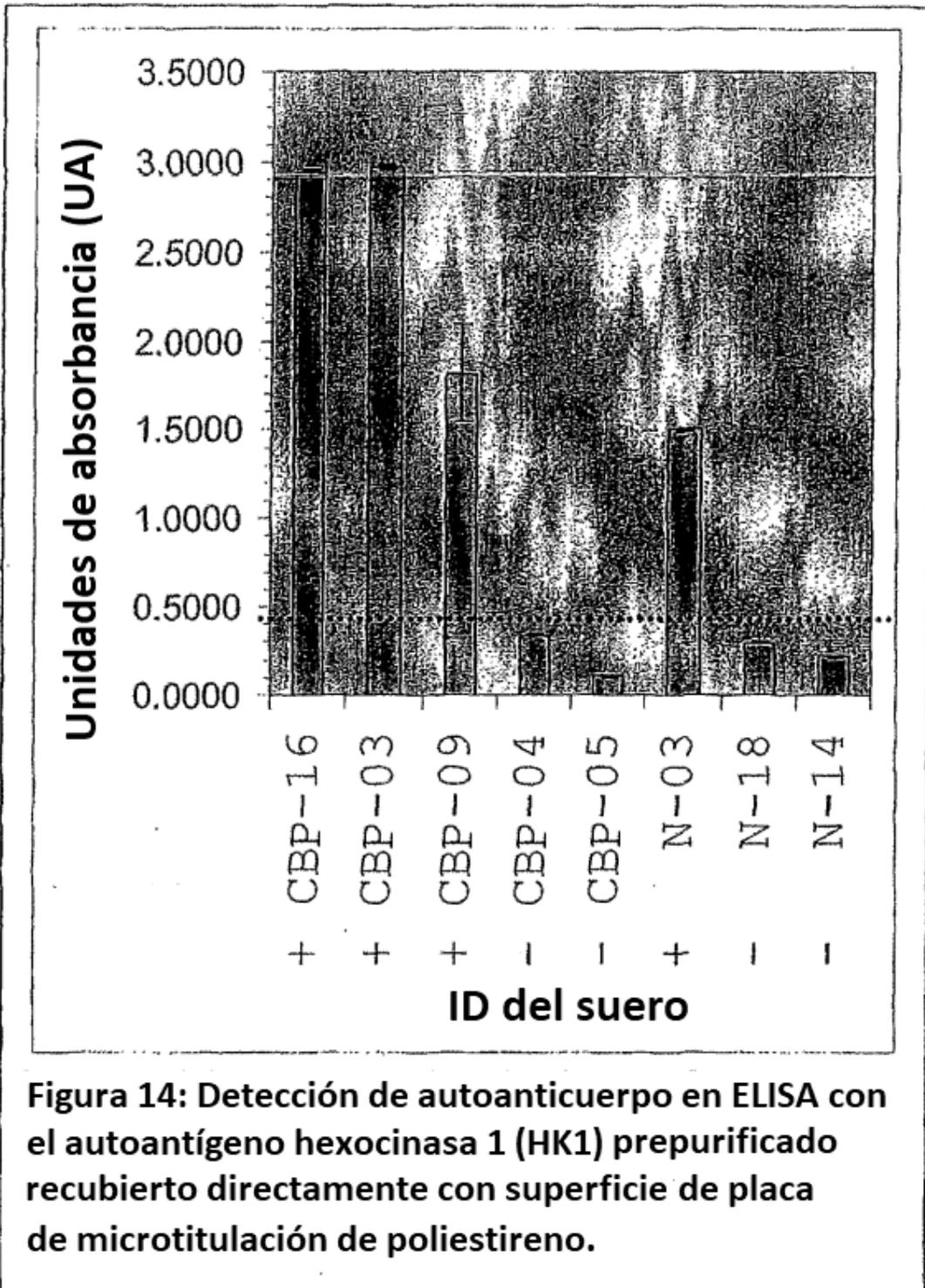


Figura 12: T²-ELISA frente a ELISA convencional para detección de autoanticuerpo de p53 en sueros de cáncer





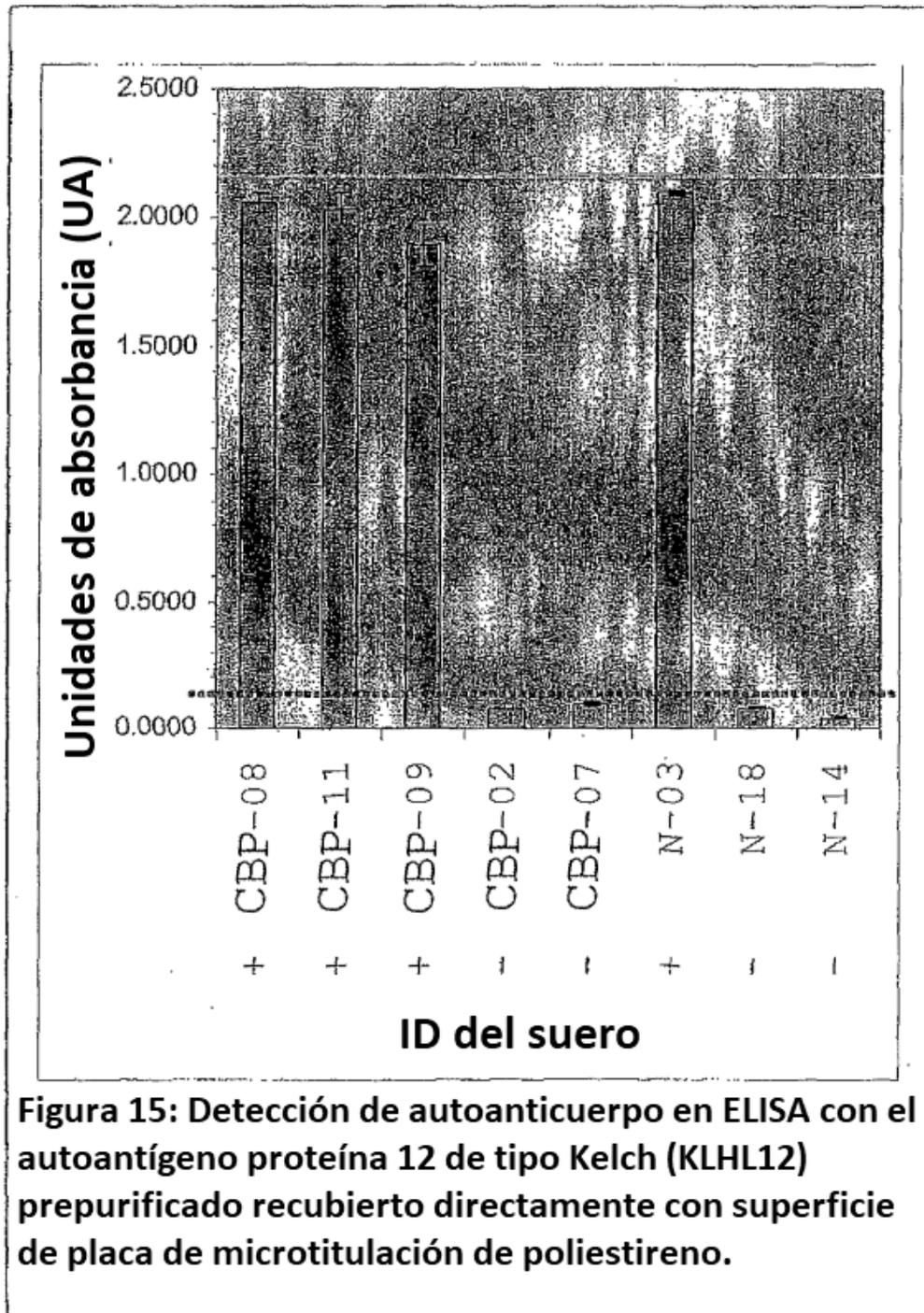


Figura 15: Detección de autoanticuerpo en ELISA con el autoantígeno proteína 12 de tipo Kelch (KLHL12) prepurificado recubierto directamente con superficie de placa de microtitulación de poliestireno.

