

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 056**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2017 PCT/GB2017/050272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2017 E 17704812 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3414572**

54 Título: **Biomarcadores de TB**

30 Prioridad:

**09.02.2016 GB 201602305**

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

**10.02.2021**

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND  
INNOVATION (50.0%)  
Polaris House, North Star Avenue  
Swindon SN2 1FL, GB y  
IP2IPO INNOVATIONS LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAMPMANN, BEATE;  
TOGUN, TOYIN y  
HOGGART, CLIVE JULIAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 805 056 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de TB

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a la detección de TB, en particular TB en los niños.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La detección de TB es un problema, particularmente en los niños. El actual tratamiento de referencia implica evaluación bacteriológica. Sin embargo, puede ser difícil obtener muestras de esputo. Incluso cuando se obtienen satisfactoriamente, las muestras de esputo de niños pueden presentar una escasez de bacilos, que dificulta o hace imposible la detección directa en la muestra. En estas circunstancias, se debe llevar a cabo el cultivo con el fin de expandir el bajo número de bacilos en la muestra hasta niveles detectables. Esto es laborioso y costoso y requiere recursos de laboratorio especializados, que son inconvenientes. Lo que es más importante, el cultivo todavía carece de sensibilidad en los niños. Además, el cultivo dura aproximadamente seis semanas y esto introduce un retraso clínicamente significativo en la obtención del diagnóstico, que es un problema grave para los resultados del paciente. Además, es particularmente difícil obtener muestras de esputo de niños, tanto en la práctica como en volumen. El poner a los pacientes, especialmente a los niños, en tratamiento especulativo sin un diagnóstico definitivo es una gran carga económica, así como los riesgos médicos y las complicaciones que conllevaría dicha etapa.

Dhanasekaran et al. 2013 (Genes and Immunity vol. 14 páginas 356-364) describen la identificación de biomarcadores para infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) y enfermedad en niños jóvenes vacunados para BCG en el sur de la India. Se describe una combinación de 11 biomarcadores con solo potencia discriminatoria moderada. Los sobrenadantes de sangre completa sin estimular no identificaron diferencias en la expresión de citocinas (páginas 359-360). Togun et al. 2016 (The European Respiratory Journal vol. 47 n.º 1 páginas 223-232) desvela un método de diagnóstico de TB basado en varias variables y biomarcadores.

El documento de patente WO2014/020343 (Proteinlogic Ltd.) desvela biomarcadores para diagnosticar y/o monitorizar la tuberculosis. Este documento se basa en adultos. La TB en los niños se menciona solo una vez, y la edad de los sujetos no se especifica. El único ejemplo está limitado a los adultos.

Kumar et al. 2013 (Clinical and Vaccine Immunology vol. 20 páginas 704-711) desvela biomarcadores circulantes de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en niños. Se desvela que la TB pediátrica se asoció a niveles elevados de TGF-beta, IL-21 e IL-23 en plasma. Se desvela que no se encontraron diferencias significativas para las citocinas, para la mayoría de los interferones de tipo 17 y tipo 1, o la mayoría de las citocinas asociadas a modulación inmunitaria.

Hur et al. 2015 (Journal of Infection vol. 70 páginas 346-355) desvelan biomarcadores adjuntos para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis y monitorizar los efectos terapéuticos. Se trata VEGF. No se divulga TB en los niños.

Serene et al. 2012 (Biomarkers vol. 17 páginas 1 - 8) desvelan biomarcadores hospedadores de relevancia clínica en la tuberculosis: revisión de estudios de expresión génica y de proteínas. Se mencionaron IL-6, IL-22 y IP-10. No se divulga TB en los niños.

Sutherland et al. 2012 (número de publicación electrónica de PLoS ONE vol 7: e30324) desvelan el diagnóstico altamente preciso de tuberculosis pleural por análisis inmunológico de la efusión pleural. Se mencionan IL-6 e IP-10. El trabajo se centra en adultos. El trabajo se centra en fluido pleural.

El documento de patente WO2015/040377 (Medical Research Council) desvela biomarcadores para tuberculosis. Se mencionan IL-1ra, FGF y VEGF. El trabajo se centra en adultos. El trabajo se centra en esputo.

El actual método de referencia para el diagnóstico es la detección directa del patógeno infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) en un espécimen clínico tal como esputo.

El diferenciar la enfermedad de tuberculosis activa (TB) de otras infecciones de las vías respiratorias (OD) constituye un reto importante en el tratamiento de los niños con sospecha de enfermedad por TB intratorácica.

La presente invención busca vencer problema(s) asociado(s) al estado de la técnica.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Los métodos del estado de la técnica se han basado en el análisis de esputo, o se han basado en la extracción y manipulación (tal como estimulación) de glóbulos blancos. Por el contrario, los presentes inventores han basado su detección en indicadores que se pueden encontrar directamente en muestras tomadas del paciente. En particular, los inventores han basado su detección en una muestra de sangre, y la detección directa de marcadores presentes en esa muestra de sangre. Esto tiene la ventaja de presentarse al desarrollo de un análisis de diagnóstico inmediato.

Esto tiene la ventaja de evitar manipulaciones y estimulaciones que son parte de las técnicas del estado de la técnica. En particular, la invención se basa ventajosamente en el sobrenadante de sangre no estimulada.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un método para el diagnóstico de TB en un sujeto, comprendiendo el método;

- 5 (a) proporcionar una muestra de dicho sujeto, siendo dicha muestra seleccionada del grupo que consiste en: sangre, suero y plasma;
- (b) determinar la concentración en dicha muestra de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF;
- (c) convertir cada concentración de biomarcador determinada en (b) en un valor de decil; y
- 10 (d) convertir cada valor de decil en una presencia o ausencia binaria que compara los valores de decil de (c) con los siguientes valores de corte de cuantil específico:

| Biomarcador | Valor de corte de cuantil específico |
|-------------|--------------------------------------|
| IL-1ra      | 3                                    |
| IL6         | 6                                    |
| IL-7        | 8                                    |
| IL-8        | 9                                    |
| IL-12p70    | 9                                    |
| FGF-básico  | 3                                    |
| IP-10       | 4                                    |
| VEGF        | 9                                    |

- 15 en donde un valor de decil correspondiente a o que supera el valor de corte de cuantil específico se convierte en la presencia binaria del biomarcador, y un valor de decil inferior al valor de corte de cuantil específico se convierte en la ausencia binaria del biomarcador;

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores indica que el sujeto tiene TB.

Adecuadamente, la etapa (c) convertir cada concentración determinada en (b) en un valor de decil comprende las etapas de:

- 20 (ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinada en (b) con una distribución de frecuencia de referencia de concentraciones de dicho biomarcador; y
- (cii) leer el valor de decil de la distribución de frecuencia para la concentración de dicho biomarcador.

Adecuadamente, la etapa (c) convertir cada concentración determinada en (b) en un valor de decil comprende las etapas de:

- 25 (ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinada en (b) con una estimación de densidad de Kernel de concentraciones de dicho biomarcador; y
- (cii) leer el valor de decil de la estimación de densidad de Kernel para la concentración de dicho biomarcador.

- 30 Adecuadamente, la distribución de frecuencia de referencia o estimación de densidad de Kernel se genera midiendo la concentración del biomarcador en varios sujetos, por ejemplo, un mínimo de 100 sujetos, y compilando las mediciones en una estimación de densidad de la distribución de frecuencia/de Kernel. Alternativamente, se pueden usar distribuciones de frecuencia (estimaciones de densidad de Kernel) presentadas en las Figuras 2 a 9 en el presente documento. En esta realización, la etapa (c) convertir cada concentración determinada en (b) en un valor de decil comprende las etapas de:

- 35 (ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinada en (b) con la estimación de distribución de frecuencia de referencia / densidad de Kernel correspondiente de concentraciones de dicho biomarcador seleccionado de las Figuras 2 a 9; y

(cii) leer el valor de decil de la estimación de distribución de frecuencia / densidad de Kernel para la concentración de dicho biomarcador.

Determinar adecuadamente la concentración de cada biomarcador comprende:

- 5 (bi) detección poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unir específicamente el biomarcador; y
- (bii) cuantificación de dicha unión.

Determinar adecuadamente la concentración de cada biomarcador comprende la detección del ARNm para el biomarcador, en donde la detección del ARNm comprende:

- 10 (bi) poner en contacto la muestra con sonda(s) de ácidos nucleicos o cebador(es) específico(s) para el biomarcador; y
- (bii) cuantificación de dicha(s) sonda(s) o cebador(es).

Adecuadamente, dicha sonda o cebador es una secuencia de ácidos nucleicos que no existe de forma natural. Adecuadamente, dicha sonda o cebador es una molécula artificial o sintética. Adecuadamente, dicha sonda o cebador se aísla y/o purifica. Adecuadamente, dicha sonda o cebador comprende ácido nucleico monocatenario. Adecuadamente, dicha sonda o cebador comprende un resto marcado unido a la misma. Adecuadamente, dicha marca se une covalentemente. Adecuadamente, dicha marca puede ser una marca fluorescente o radiactiva o un Qdot, nanocristal o nanopartícula, lo más adecuadamente una marca fluorescente.

- 15 Adecuadamente, dicha sonda o cebador comprende un resto marcado unido a la misma. Adecuadamente, dicha marca se une covalentemente. Adecuadamente, dicha marca puede ser una marca fluorescente o radiactiva o un Qdot, nanocristal o nanopartícula, lo más adecuadamente una marca fluorescente.

Adecuadamente, dicha muestra es una muestra de suero o plasma.

Adecuadamente, dicho suero o plasma está esencialmente libre de células.

- 20 Adecuadamente, el sujeto tiene 16 años o menos, preferentemente 15 años o menos.

Adecuadamente, el sujeto tiene 2 años o más, preferentemente 5 años o más. Adecuadamente, el sujeto tiene 5 a 15 años.

En una realización, dicho método comprende adecuadamente además determinar la concentración en dicha muestra del biomarcador VEGF estimulado por EC (valor de corte de cuantil específico 2).

- 25 Se desvela un kit que comprende reactivo(s) para la detección específica de cada uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF.

Además, se desvela un kit que comprende reactivos para la detección específica de ARNm que codifica cada uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF.

- 30 Adecuadamente, dichos reactivos comprenden cada uno un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un scFv, un Fv, un rIgG y un diacuerpo.

Se desvela un dispositivo que comprende una matriz de materiales que juntos son capaces de unirse específicamente a cada uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF, siendo cada material dentro de la matriz capaz de unirse específicamente a uno de dichos biomarcadores.

- 35 Además, se desvela un dispositivo que comprende una matriz de materiales que juntos son capaces de detectar ARNm específico para cada uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF, siendo cada material dentro de la matriz capaz de detectar específicamente uno de dichos ARNm.

Adecuadamente, dicho dispositivo es un dispositivo de flujo lateral.

- 40 Se desvela un método de tratamiento de un sujeto que comprende llevar a cabo el método como se ha descrito anteriormente, en donde si se determina que el sujeto tiene TB, se administra un régimen de 2HRZE/4HR (2 meses HRZE seguido por 4 meses HR en donde H = isoniazida, R = rifampicina, Z = pirazinamida, E = etambutol) a dicho sujeto.

- 45 En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de HRZE en donde H = isoniazida, R = rifampicina, Z = pirazinamida, E = etambutol para el tratamiento de TB en un sujeto, en donde el método como se ha descrito anteriormente se lleva a cabo para dicho sujeto, en donde si se determina que el sujeto tiene TB, entonces HRZE se administra a dicho sujeto durante dos meses y luego se administra HR a dicho sujeto durante cuatro meses. Adecuadamente, se selecciona un régimen de tratamiento de dosificación de dicho sujeto al menos tres veces por semana durante los primeros dos meses, preferentemente se selecciona un régimen de tratamiento de dosificación de dicho sujeto diariamente durante los primeros dos meses.

En un aspecto, la divulgación se refiere a comprimidos de H 75 mg + R 150 mg + Z 400 mg + E 275 mg para el tratamiento de TB en un sujeto, en donde el método como se ha descrito anteriormente se lleva a cabo para dicho sujeto, en donde si se determina que el sujeto tiene TB, entonces se administra HRZE a dicho sujeto durante dos meses, seguido por 3 comprimidos de H 75 mg + 1,5 comprimidos de R 150 mg durante cuatro meses.

- 5 En un aspecto, la invención se refiere a un proceso de selección de un régimen de tratamiento, comprendiendo dicho proceso llevar a cabo el método que se ha descrito anteriormente, en donde si se determina que el sujeto tiene TB, entonces se selecciona un régimen de tratamiento de 2HRZE/4HR (2 meses HRZE seguido por 4 meses HR en donde H = isoniazida, R = rifampicina, Z = pirazinamida, E = etambutol).

- 10 En un aspecto, la invención se refiere al uso de una combinación de materiales, cada uno de los cuales reconoce, se une específicamente a o tiene afinidad por uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF, en donde dicha combinación incluye al menos dicho material para cada uno de dichos biomarcadores, para ayudar en el diagnóstico de TB en un sujeto. Adecuadamente, dicho material comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 15 En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de ayudar en el diagnóstico de TB en un sujeto, de una combinación de materiales que reconoce cada una, se une específicamente a o tiene afinidad por ARNm de uno o más de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF. Adecuadamente, dicho material comprende un cebador o sonda de ácido nucleico.

En un aspecto, la invención se refiere a un aparato que comprende lógica configurada para llevar a cabo el método que se ha descrito anteriormente.

- 20 En un aspecto, la invención se refiere a un producto de programa informático operable, cuando se ejecuta en un ordenador, para realizar las etapas de método que se han descrito anteriormente.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores enseñan la identificación de novedosos biomarcadores hospedadores para TB en los niños. Los inventores suponen que se podría identificar un distintivo biológico único para enfermedad de TB en niños.

- 25 'TB' significa tuberculosis; es una enfermedad provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (algunas veces denominada MTB).

Ha sido un reto en el campo de la TB proporcionar una prueba de diagnóstico simple. La prueba necesita ser fiable. La prueba necesita ser precisa. La prueba debe implicar idealmente el mínimo de instrumental/equipo, especialmente puesto que la TB es frecuentemente un problema en países en desarrollo donde las instalaciones de laboratorio pueden ser pocas y/o pueden estar geográficamente remotas de los pacientes que se prueban.

- 30

#### MUESTRA

La muestra puede ser de un sujeto. El sujeto es adecuadamente un mamífero, lo más adecuadamente un humano.

Adecuadamente, los métodos no implican la recogida real de la muestra. Adecuadamente, la muestra es una muestra *in vitro*.

- 35 Los métodos de la invención se realizan adecuadamente en una muestra aislada del sujeto que se investiga. Así, adecuadamente, los métodos son métodos que se pueden realizar en un contexto de laboratorio sin la necesidad de que esté presente el sujeto. Adecuadamente, los métodos se llevan a cabo *in vitro*, es decir, los métodos son adecuadamente métodos *in vitro*. Adecuadamente, los métodos son métodos extracorpóreos.

- 40 Adecuadamente, la invención se puede aplicar al análisis de ácidos nucleicos. Adecuadamente, el ácido nucleico se prepara a partir de la muestra recogida del sujeto de interés, por ejemplo, por extracción de ácido nucleico de glóbulos blancos en la muestra. Adecuadamente, la muestra comprende ácido nucleico. Adecuadamente, la muestra consiste en ácido nucleico. Adecuadamente, el ácido nucleico comprende, o es, ARNm o ADNc, adecuadamente ARNm.

- 45 Lo más adecuadamente, la invención se puede aplicar al análisis de biomarcadores de proteína. Lo más adecuadamente, se analizan las proteínas en la muestra.

Adecuadamente, la muestra es una muestra *in vitro*.

Adecuadamente, la muestra es una muestra extracorpórea.

Adecuadamente, la muestra es sangre.

Adecuadamente, la muestra es sobrenadante de sangre.

Adecuadamente, la muestra es suero. El suero se puede obtener como el fluido recogido de una muestra de sangre que ha coagulado.

Adecuadamente, la muestra es plasma. El plasma se puede obtener como el fluido recogido de una muestra de sangre que se ha centrifugado para sedimentar los glóbulos sanguíneos presentes. Alternativamente, el plasma se puede obtener por filtración para retirar los glóbulos sanguíneos presentes.

Adecuadamente, la sangre o sobrenadante de sangre/suero/plasma no se estimula.

Es una ventaja de la invención que el análisis convierta cada biomarcador medido en una salida binaria. Por ejemplo, cada biomarcador de citocinas examinado se convierte en un punto de datos binario SÍ/NO. Por el contrario, los enfoques del estado de la técnica existentes necesitan lecturas cuantitativas.

Es una ventaja de la invención que la exactitud del diagnóstico se logre a un nivel comparable al cultivo bacteriológico. Es una ventaja de la invención que no existan retrasos de tiempo comparables a los experimentados con cultivo bacteriológico.

Las técnicas del estado de la técnica usan células, ya sea células bacterianas o glóbulos sanguíneos aislados. Es una ventaja de la invención que no se requiera cultivar células, y no se requiera aislar células.

Es una ventaja que se analice la respuesta del hospedador/distintivo del hospedador. Sin desear quedar ligado a teoría, los intentos existentes para crear un análisis de sangre para TB se han centrado en exponer o estimular células inmunitarias del sujeto y estudiar la respuesta. Sin embargo, en principio, este enfoque es siempre examinar una "respuesta de recuerdo". Esta es una respuesta derivada de "memoria" del sistema inmunitario que ha encontrado previamente una bacteria de TB. En primer lugar, esto requiere una estimulación de la muestra, ya sea con bacterias o con antígenos, que es laborioso y costoso. Sin embargo, lo que es más importante, en principio, este tipo de enfoque solo es capaz de ensayar una respuesta secundaria. Por el contrario, la presente divulgación se refiere a la evaluación de la respuesta primaria. Esto es especialmente importante y útil cuando se aplica a niños, puesto que claramente cada paciente individual está en algún momento de sus vidas expuesto a la TB por primera vez. Si un método tal como un método del estado de la técnica solo se centra en evaluar una respuesta secundaria, entonces es poco probable que sea capaz de detectar una respuesta la primera vez que dicho sujeto lucha contra la TB. Es una ventaja que la respuesta primaria directa esté siendo evaluada.

Adecuadamente, la muestra es una muestra sin células. Adecuadamente, la muestra no comprende células. Adecuadamente, las células se retiran de la muestra de sangre por centrifugación y recuperación del sobrenadante.

Las células se pueden retirar de la muestra por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, filtración.

Un motivo clave para la exclusión de las células del análisis es debido a que la sangre es de color rojo oscuro debido a la presencia de los eritrocitos glóbulos rojos. Normalmente, la etapa de detección usada para evaluar la presencia o ausencia de los biomarcadores es sensible a la luz. Por tanto, ventajosamente, la muestra está libre de células para evitar que sean confundidas por el color rojo de la sangre completa. En principio, se podría emplear cualquier enfoque que eludiera el color rojo oscuro de la sangre completa. Adecuadamente, esto puede ser por lisis celular. Más adecuadamente, las células se retiran de la sangre antes del análisis. Adecuadamente, esto es por centrifugación. Adecuadamente, esto puede ser por filtración. Adecuadamente, esto puede ser por flujo lateral.

En algunos ámbitos, puede ser posible usar una muestra de sangre completa en el método de la invención, por ejemplo, usando flujo lateral. En este escenario, la muestra de sangre completa se dispone en un dispositivo de flujo lateral. Entonces migra el componente de fluido, tal como plasma/suero, por lo que en el punto de evaluación está libre de células.

#### ENSAYO DE FLUJO LATERAL Y OTROS DISPOSITIVOS

Los ensayos de prueba de flujo lateral (LFA) - también denominados ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral - requieren una infraestructura mínima y se han usado para desarrollar dispositivos baratos y simples para el diagnóstico y el cribado médico, análisis de diagnóstico inmediato o uso en laboratorio. El ensayo se basa en la detección de la presencia de un analito diana especificado en una muestra para el análisis principalmente cualitativo y ocasional cuantitativo. Las aplicaciones comunes del LFA incluyen su uso en la prueba de embarazo en casa, monitorización de diabetes y el rápido diagnóstico de VIH o infecciones parasitarias y bacterianas. Como se trata ampliamente en los artículos de revisión (tales como Sajid M, Kaw de A, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. Journal of Saudi Chemical Society. 2014), una tira típica de LFA está constituida por cuatro partes:

- **Parche de aplicación de muestra:** Este es un parche absorbente hecho de celulosa o fibra de vidrio sobre el que se aplica la muestra y su función principal es transportar la muestra (por ejemplo, sangre) que contiene el analito 'aguas abajo' a la otra parte de la tira de LFA. También se puede pretratar la muestra, que incluye la separación en componentes tales como plasma, antes de su transporte.

- **Parche conjugado:** Este contiene anticuerpo inmovilizado y marcado que es específico para el analito diana. El anticuerpo está conjugado con partículas coloreadas tales como látex o partículas de tamaño nanométrico y el conjugado de anticuerpo marcado se libera tras el contacto con muestra líquida en movimiento.
- **Membrana de nitrocelulosa o de reacción:** Esta membrana permite el movimiento de complejos generados desde el parche conjugado bajo acción capilar. La membrana se divide además en líneas de prueba y de control.
- **Parche adsorbente:** Este parche funciona como un 'sumidero' en el extremo de la tira y está diseñado para la extracción adicional de la muestra a través de la reacción por acción capilar.

La Figura 10 muestra la disposición estándar del dispositivo de flujo lateral (Saied Assadollahi, Christiane Reininger, Roland Palkovits, Peter Pointl and Thomas Schalkhammer. 'From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay'. *Sensors* 2009(9):6084-6100; doi:10.3390/s90806084).

La prueba del ensayo de flujo lateral puede funcionar en dos formatos principales, que son los ensayos de sándwich y competitivos. Los LFA de sándwich se diseñan para la detección de moléculas de gran peso molecular que incluyen proteínas con múltiples sitios antigénicos (por ejemplo, VIH, hCG), mientras que los ensayos competitivos se diseñan para probar moléculas pequeñas con epítopes individuales. En el LFA de sándwich, una prueba positiva mostrará bandas coloreadas en la línea de prueba, mientras que en el LFA competitivo la línea de prueba mostrará la banda coloreada en las muestras negativas.

#### Formato de detección múltiple

En el diagnóstico clínico, la especificidad más alta o exactitud predictiva de múltiples analitos interdependientes que se detectan simultáneamente en la misma condición ha conducido al desarrollo de un formato de detección de LFA múltiple usado para la detección de más de un analito diana (Panhotra BR, Hassan ZU, Joshi CS, Bahrani A. Visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay: its application in screening of blood donors a welcome tool for the limited resource settings. *Journal of clinical microbiology*. dic. 2005;43(12):6218; author reply-9. PubMed PMID: 16333138. Pubmed Central PMCID: 1317223; Corstjens PL, de Dood CJ, van der Ploeg-van Schip JJ, Wiesmeijer KC, Riuttamaki T, van Meijgaarden KE, et al. Lateral flow assay for simultaneous detection of cellular- and humoral immune responses. *Clinical biochemistry*. oct. 2011;44(14-15):1241-6. PubMed PMID: 21763300. Pubmed Central PMCID: 3177995). En este formato, el ensayo se realiza sobre una tira con número de líneas de prueba igual al número de analitos diana como se describió recientemente para la detección de cuatro tipos del virus del papiloma humano (VPH) común (Xu Y, Liu Y, Wu Y, Xia X, Liao Y, Li Q. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection. *Analytical chemistry*. 17 en. 2014 17;86(12):5611-4. PubMed PMID: 24892496).

La Figura 11 muestra el formato de detección múltiple de LFA (Ye Xu, Yinghua Liu, Yan Wu, Xiaohu Xia, Yiqun Liao y Qingge Li. 'Flourescent Probe-Based Lateral Flow Assay for multiplex Nucleic Acid Detection.' *Anal Chem.*, 2014, 86(12), 5611-5614).

#### Aplicaciones clínicas

Los ensayos de flujo lateral han encontrado uso importante en el diagnóstico clínico y como análisis de diagnóstico inmediato mediante la detección de analitos clínicos en plasma, suero, orina y otras muestras clínicas. Un ejemplo claro es los kits de pruebas del embarazo en casa. En la tuberculosis (TB), la prueba de lipoarabinomano urinario (LAM) es una prueba de LFA con baja sensibilidad (52 - 59 %) pero una alta especificidad (>94 %) (Lawn SD, Dheda K, Kerkhoff AD, Peter JG, Dorman S, Boehme CC, et al. Determine TB-LAM lateral flow urine antigen assay for HIV-associated tuberculosis: recommendations on the design and reporting of clinical studies. *BMC infectious diseases*. 2013;13:407. PubMed PMID: 24004840. Pubmed Central PMCID: 3846798). Los inventores también informaron recientemente de que el uso de la tecnología indicadora de fósforo convertidor ascendente fluorescente (UCP) combinada con LFA para detectar IP-10 y CCL4 simultáneamente en la misma tira tiene el potencial de desarrollarse como un análisis de diagnóstico inmediato para TB pleural (Sutherland JS, Mendy JF, Gindeh A, Walzl G, Togun T, Owolabi O, et al. Use of lateral flow assays to determine IP-10 and CCL4 levels in pleural effusions and whole blood for TB diagnosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015).

Un estudio multicéntrico en África informó similarmente de la aplicabilidad de la plataforma UCP-LFA de baja tecnología y robusta como un ensayo cuantitativo conveniente para la detección de múltiples quimiocinas en sangre completa (Corstjens PL, Tjon Kon Fat EM, de Dood CJ, van der Ploeg-van Schip JJ, Franken KL, Chegou NN, et al. Multi-center evaluation of a user-friendly lateral flow assay to determine IP-10 and CCL4 levels in blood of TB and non-TB cases in Africa. *Clinical biochemistry*. 15 ag. 2015. PubMed PMID: 26285074).

Por tanto, la divulgación se refiere a un dispositivo que comprende una matriz de materiales que juntos son capaces de unir cada uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF, siendo cada material dentro de la matriz capaz de unirse a uno de dichos biomarcadores, en donde dicho dispositivo es un dispositivo de flujo lateral. En esta realización, la matriz de materiales comprende adecuadamente varias líneas de prueba iguales al número de biomarcadores. Adecuadamente, cada línea de prueba comprende material

capaz de unirse a dicho biomarcador. Adecuadamente, cada línea de prueba comprende material capaz de unirse a dicho biomarcador diferente.

Alternativamente, si el dispositivo comprende un 'chip' o 'biochip', la matriz puede comprender una disposición espacial de materiales tales como una rejilla u otra disposición definida, tal como un patrón geométrico.

- 5 Adecuadamente, cada material capaz de unirse a uno de dichos biomarcadores se inmoviliza dentro del dispositivo.

Adecuadamente, se modifica cada material capaz de unirse a uno de dichos biomarcadores.

Adecuadamente, se marca cada material capaz de unirse a uno de dichos biomarcadores. Adecuadamente, la marca se une covalentemente. Adecuadamente, la marca es un colorante.

- 10 Adecuadamente, cada material capaz de unirse a uno de dichos biomarcadores es un anticuerpo diferente o fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde el fragmento de unión al antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un scFv, un Fv, un rlgG y un diacuerpo.

- 15 Adecuadamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo no humano o fragmento de unión al antígeno del mismo. Adecuadamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es recombinante, por ejemplo, se prepara por expresión *in vitro* de una secuencia de ácidos nucleicos recombinante. Adecuadamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se purifica y/o aísla.

- 20 También se pueden usar anticuerpos no reactivos para la detección, por ejemplo, de biomarcadores de proteína como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, para la detección en los métodos, como material en los dispositivos, como reactivos en los kits, u otras aplicaciones de la invención), por ejemplo, partículas de presentación en fagos que ofrecen péptidos de unión específica, afímeros, aptámeros, secuencias de proteínas o péptidos específicos que se unen a ácidos nucleicos, moléculas pequeñas con propiedades de unión específica u otro(s) de dicho(s) componente(s) de unión específica de los biomarcadores descritos.

#### DISTINTIVO

- 25 Los enfoques del estado de la técnica han identificado distintivos extremadamente grandes, tales como los que requieren el análisis de 50 o más biomarcadores individuales. Es una ventaja de la invención que el distintivo requiera el análisis de solo 8 biomarcadores.

Los intentos del estado de la técnica han implicado citometría de flujo. Sin embargo, la citometría de flujo es extremadamente laboriosa, cara, y es inadecuada para proporcionar un análisis de cabecera/diagnóstico inmediato.

- 30 Los enfoques del estado de la técnica han implicado el análisis del transcriptoma (es decir, de ARNm). Sin embargo, estos enfoques también han implicado normalmente la evaluación de al menos 50 genes, que es un problema.

Los datos se presentan en la sección de ejemplos en respaldo del ABC/especificidad/ sensibilidad de los métodos de la invención.

- 35 Y, lo que es más importante, se proporcionan valores predictivos positivos y negativos. En el campo de la TB, los valores predictivos se pueden considerar como más importantes incluso que la sensibilidad/especificidad del método. Es una ventaja que la invención proporcione valores predictivos positivos y negativos extremadamente robustos. Esto se trata con más detalle en la sección de más adelante titulada "Valores predictivos/Aplicaciones del método"

- 40 Los inventores realizaron un análisis grande y complejo que implicaba numerosas elecciones intelectuales para llegar al distintivo de 8 biomarcadores. En particular, es importante observar que este distintivo particular tiene propiedades especiales. Por ejemplo, es significativamente diferente de un distintivo de 7 biomarcadores, que es inadecuado. El análisis del distintivo que trata de disminuir cualquiera de los 8 biomarcadores desvelados conduce a una disminución en la especificidad de aproximadamente 50 % y/o una disminución en el valor predictivo de aproximadamente 25 %. Estas cifras ilustran claramente que la enseñanza de un distintivo de 8 biomarcadores según la invención no es simplemente una elección iterativa o arbitraria, sino que presenta información clínicamente útil que es un cambio de etapa desde el obtenido con incluso un marcador menos. Es sorprendente que se pueda observar un efecto tan agudo y espectacular de este modo.

Adecuadamente, el distintivo comprende 8 biomarcadores.

Adecuadamente, los biomarcadores son como se exponen en la tabla a continuación.

#### SECUENCIAS DE REFERENCIA

- 50 Adecuadamente, las secuencias de referencia de los biomarcadores de interés son como se definen en la siguiente tabla:

| Biomarcador | Número de acceso de proteína (UniProtKB) | Secuencia canónica | Isoformas de proteína            | Nombre del gen | Número de acceso de ARNm (RefSeq edición 73)                      |
|-------------|------------------------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| IL-1ra      | P18510                                   | P18510-1           | P18510-2<br>P18510-3<br>P18510-4 | <i>IL1RN</i>   | NM_173841.2<br>NM_000577.4<br>NM_173842.2<br>NM_173843.2          |
| IL6         | P05231                                   | P05231-1           |                                  | <i>IL6</i>     | NM_000600.3                                                       |
| IL-7        | P13232                                   | P13232-1           | P13232-2<br>P13232-3             | <i>IL7</i>     | NM_000880.1<br>NM_001199886.1<br>NM_001199887.1<br>NM_001199888.1 |
| IL-8        | P10145                                   | P10145-1           | P10145-2                         | <i>CXCL8</i>   | NM_000584.3                                                       |
| IL-12p70    | P29460                                   | P29460-1           |                                  | <i>IL12B</i>   | NM_002187.2                                                       |
| FGF-básico  | P09038                                   | P09038-4           | P09038-1<br>P09038-2<br>P09038-3 | <i>FGF2</i>    | NM_002006.4                                                       |
| IP-10       | P02778                                   | P02778-1           |                                  | <i>CXCL10</i>  | NM_001565.3                                                       |

|      |        |          |           |       |                |
|------|--------|----------|-----------|-------|----------------|
| VEGF | P15692 | P15692-1 | P15692-2  | VEGFA | NM_001025366.2 |
|      |        |          | P15692-3  |       | NM_001025367.2 |
|      |        |          | P15692-4  |       | NM_001025368.2 |
|      |        |          | P15692-5  |       | NM_001025369.2 |
|      |        |          | P15692-6  |       | NM_001025370.2 |
|      |        |          | P15692-8  |       | NM_001033756.2 |
|      |        |          | P15692-9  |       | NM_001171622.1 |
|      |        |          | P15692-10 |       | NM_001171623.1 |
|      |        |          | P15692-11 |       | NM_001171624.1 |
|      |        |          | P15692-12 |       | NM_001171625.1 |
|      |        |          | P15692-13 |       | NM_001171626.1 |
|      |        |          | P15692-14 |       | NM_001171627.1 |
|      |        |          | P15692-15 |       | NM_001171628.1 |
|      |        |          | P15692-16 |       | NM_001171629.1 |
|      |        |          | P15692-17 |       | NM_001171630.1 |
|      |        |          | P15692-18 |       | NM_001204384.1 |
|      |        |          |           |       | NM_001204385.1 |
|      |        |          |           |       | NM_001287044.1 |
|      |        |          |           |       | NM_001317010.1 |
|      |        |          |           |       | NM_003376.5    |

Las secuencias se incorporan por la presente en este documento como referencia.

5 El experto solo tiene que identificar el gen/proteína correcto que se usa en el análisis. La orientación proporcionada no pretende restringir la invención rigurosamente a las secuencias a modo de ejemplo individuales específicas proporcionadas. Se conoce que las secuencias de genes (y, por tanto, las secuencias de proteínas) varían entre individuos, por ejemplo, debido a la varianza alélica o mutaciones entre individuos. La información se proporciona para ayudar al operario a trabajar la invención ensayando el gen correcto. En último lugar, el producto génico (tal como ARNm o más adecuadamente proteína) se ensaya en realidad. Por tanto, las diferencias alélicas o mutacionales menores o mínimas entre individuos no son importantes, lo que es importante es que el gen correcto (producto génico) se ensaye usando la orientación proporcionada.

10 Adecuadamente, donde se use el nombre de biomarcador, esto significa el aminoácido correspondiente o la secuencia de ácidos nucleicos de la tabla anterior. Adecuadamente, para secuencias de aminoácidos, se prefiere la secuencia canónica. Adecuadamente, para secuencias de ácidos nucleicos, se prefiere la secuencia de ácidos nucleicos más reciente (por ejemplo, la numerada más alta).

15 Se entenderá que la invención puede hacer igualmente uso de de fragmento(s), variante(s) o mutante(s) de detección de estos biomarcadores. Adecuadamente, cualquiera de dicho(s) fragmento(s), variante(s) o mutante(s) tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de referencia a lo largo de la longitud completa de dicho(s) fragmento(s), variante(s) o mutante(s), adecuadamente 90 %, adecuadamente 95 %, adecuadamente 98 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de dicho(s) fragmento(s), variante(s) o mutante(s).

## 20 LIBERACIÓN DE BASE DE DATOS

Las secuencias depositadas en las bases de datos pueden cambiar con el tiempo. Adecuadamente, se confía en la versión actual de la(s) base(s) de datos(s) de secuencias. Alternativamente, se confía en la liberación en vigor en la fecha de presentación.

25 Como conoce el experto, los números de acceso pueden ser versión/ números de acceso fechados. Los números de acceso citables para la actual entrada de la base de datos son los mismos que antes, pero omitiendo el punto

decimal y cualquier dígito posterior, por ejemplo, para VEGF una versión/número de acceso fechado es P15692-18; la entrada actual se obtiene usando P15692, etc.

GenBank es la base de datos de secuencias genéticas de NIH, una colección comentada de todas las secuencias de ADN públicamente disponibles (Centro Nacional para información Biotecnológica, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 EE. UU.; Nucleic Acids Research, en. 2013;41(D1):D36-42) y números de acceso proporcionados se refieren a esto, a menos que sea evidente de otro modo. Adecuadamente, la edición de la base de datos GenBank a la que se hace referencia es 15 de octubre de 2015, edición 210.0 de NCBI-GenBank.

UniProt (Universal Protein Resource) es un catálogo completo de información sobre proteínas ('UniProt: a hub for protein information' Nucleic Acids Res. 43: D204-D212 (2015)). Para evitar dudas, se confía en la edición 2015\_11 de UniProt.

Con más detalle, se confía en el consorcio UniProt UniProt Knowledgebase (UniProtKB) del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), Instituto Suizo de Bioinformática SIB y Recurso de Información de Proteínas (PIR) edición 2015\_11 (11-nov.-2015).

## TRATAMIENTOS

Se debe observar que el tratamiento para la TB es un programa de fármacos de mínimo seis meses. Esto es caro y puede ser muy exigente para el paciente. La dosis tiene que ser muy regular, tal como múltiples dosis por semana e idealmente diaria, lo cual es una gran carga tanto para el médico, así como para el paciente. Por tanto, es un problema en la técnica evitar el tratamiento erróneo de pacientes, es decir, la prescripción errónea de fármacos para la TB a un paciente que, de hecho, no tiene TB. La presente invención alivia este problema proporcionando una herramienta robusta para el diagnóstico (o para ayudar en el diagnóstico).

Si se decide en vista del método de la invención que el sujeto tiene TB, entonces el médico debe recetar el tratamiento para la TB. Se proporciona un método de tratamiento de un paciente que comprende determinar si tiene TB según el(los) método(s) desvelado(s) en el presente documento, en donde si se determina que el paciente tiene TB, entonces se receta el tratamiento para la TB, o más adecuadamente se administra. En otra realización, los métodos de la invención se usan para ayudar en el diagnóstico de un paciente que no necesita estar presente durante la etapa de diagnóstico en el sentido estricto (es decir, en esta realización, la invención no se refiere al diagnóstico para fines curativos en sentido estricto); el médico puede entonces tener en cuenta la información proporcionada por la invención cuando se diagnostica y/o planea el tratamiento para dicho sujeto.

Así, es una ventaja de la invención que se puedan evitar fármacos innecesarios. En una realización, la prueba de la invención encuentra aplicación como una prueba de confirmación en vez de una prueba de descarte. En otras palabras, si el(los) método(s) de la invención se usan para determinar que un sujeto tiene TB, se debe tratar definitivamente para TB. Alternativamente, si se usan los métodos de la invención y no se determina que un sujeto tenga TB, entonces puede ser útil investigación adicional –no se descarta adecuadamente que un sujeto tenga posiblemente TB si los métodos de la invención no determinan que tenga TB.

En términos de una prueba de 'confirmación', los métodos de la invención tienen un rendimiento comparable al tratamiento de referencia en la técnica (cultivo bacteriano). Así, es una ventaja de la invención que un hallazgo positivo usando los métodos de la invención proporcione un nivel de confianza muy alto de que el sujeto tiene TB, y se debe tratar para TB.

Adecuadamente, el tratamiento para TB es como se recomendó por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS puede modificar sus directrices de vez en cuando – adecuadamente, el tratamiento es según las directrices en la fecha de funcionamiento de la invención para tratar un sujeto. Más adecuadamente, este tratamiento es según las directrices en la fecha de presentación de este documento. Si se necesita cualquier orientación adicional, el tratamiento más adecuado es según las directrices de la publicación de la OMS de 2010 "Guidelines for national programmes, cuarta edición" ISBN: 9789241547833 (por ejemplo, <http://www.who.int/tb/publications/9789241547833/en/>). Este documento se incorpora por la presente en este documento como referencia, específicamente para la enseñanza del régimen de tratamiento específico para TB.

Los tratamientos a modo de ejemplo se explican a continuación.

Adecuadamente, el tratamiento para TB comprende el ciclo estándar de 6 meses de 4 fármacos antimicrobianos como se recomienda por la OMS.

Adecuadamente, el tratamiento para TB comprende 6 meses de rifampicina.

Adecuadamente, el tratamiento para TB comprende el tratamiento de seis (6) meses con fármacos anti-TB específicos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante los primeros 2 meses, seguido por 4 meses de isoniazida y rifampicina solo).

Adecuadamente, los pacientes con TB pueden recibir una fase intensiva diaria, seguida por una fase de continuación de tres veces a la semana [2HRZE/4(HR)3]; adecuadamente, cada dosis se observa directamente. Se puede usar la dosis de tres veces a la semana durante toda la terapia [2(HRZE)3/4(HR)3] como alternativa, a condición de que cada dosis sea directamente observada y el paciente NO esté infectado por el VIH o viviendo en un entorno de prevalencia del VIH.

Adecuadamente, la dosis no es inferior a 3 veces por semana. Adecuadamente, la dosis es 3 veces por semana o más. Lo más adecuadamente, la dosis es diaria.

Lo más adecuadamente, la frecuencia de administración para pacientes con TB es diariamente durante todo el transcurso de la terapia [2HRZE/4HR].

Adecuadamente, si el paciente está infectado por el VIH o viviendo en un entorno de prevalencia del VIH, la dosis es diariamente durante todo el transcurso de la terapia.

Sumario de la guía de tratamiento de la OMS (publicación de 2010 de la OMS "Guidelines for national programmes, cuarta edición", página 5):

Tabla A RÉGIMEN ESTÁNDAR Y FRECUENCIA DE ADMINISTRACIÓN PARA NUEVOS PACIENTES CON TB

| Fase intensa                 | Fase de continuación | Comentarios                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 meses de HRZE <sup>a</sup> | 4 meses de HR        |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 2 meses de HRZE              | 4 meses de HRE       | Se aplica solo en países con altos niveles de resistencia a la isoniazida en nuevos pacientes con TB, y donde no se hace la prueba de susceptibilidad al fármaco isoniazida en nuevos pacientes (o no están disponibles los resultados) antes de que empiece la fase de continuación |

<sup>a</sup> La OMS ya no recomienda la omisión de etambutol durante la fase intensa del tratamiento para pacientes con TB pulmonar no cavitaria con baciloscopia negativa o enfermedad extrapulmonar que se sabe que son VIH negativos.

| Frecuencia de administración |                      | Comentarios                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fase intensa                 | Fase de continuación |                                                                                                                                                                                                          |
| Diariamente                  | Diariamente          | Óptimo                                                                                                                                                                                                   |
| Diariamente                  | 3 veces por semana   | Alternativa aceptable para cualquier nuevo paciente con TB que recibe terapia directamente observada                                                                                                     |
| 3 veces por semana           | 3 veces por semana   | Alternativa aceptable a condición de que el paciente esté recibiendo terapia directamente observada y NO esté infectado por el VIH o viviendo en un entorno de prevalencia del VIH (véase el Capítulo 5) |

*Nota:* La administración de fase intensa diaria (en vez de tres veces a la semana) puede ayudar a prevenir la resistencia adquirida al fármaco en pacientes con TB que empiezan el tratamiento con resistencia a isoniazida (véase el Anexo 2).

Abreviaturas usadas:

H = isoniazida,

R = rifampicina,

Z = pirazinamida,

E = etambutol,

S = estreptomina.

El tratamiento de referencia anterior no se aplica adecuadamente a TB multirresistente (TB MDR). Adecuadamente, se realiza la prueba de susceptibilidad a fármacos antes del tratamiento, según las directrices de la OMS. Si se trata un paciente con TB cuyo tratamiento ha fracasado y otro paciente con alta probabilidad de TB multirresistente (TB

MDR), el tratamiento debe ser empezado adecuadamente en un régimen empírico de MDR como se recomienda por la OMS. Lo más adecuadamente, la invención se aplica a TB 'nueva', es decir, nuevos pacientes probados según la invención.

5 El tratamiento posterior o adicional puede depender de cualquier diagnóstico que se haga; normalmente un ciclo de antibióticos si es una infección bacteriana de las vías respiratorias.

La administración puede ser por comprimido o por inyección, tal como inyección intramuscular. Para regímenes HRZE/HR, la administración es adecuadamente por comprimido.

Los comprimidos típicos comprenden las siguientes dosis:

H 75 mg + R 150 mg + Z 400 mg + E 275 mg de comprimidos.

10 Los sujetos se administran o recetan con varios comprimidos según su peso corporal (y/o cualquier otro factor relevante, si fuera necesario) para lograr la dosis correcta. Este número puede incluir fracciones de un comprimido. Una dosis típica para un sujeto de 30-39 kg de peso corporal es 2 comprimidos de H 75 mg + R 150 mg + Z 400 mg + E 275 mg diariamente durante los primeros 2 meses de tratamiento, seguido por 1,5 comprimidos de H 150 mg + R 150 mg durante los meses 3 a 6 de tratamiento. La determinación de la dosis exacta, por ejemplo basada en el  
15 peso corporal, es una cuestión para el médico.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los inventores consideraron enfoques de referencia para el análisis estadístico. Sin embargo, los inventores tuvieron conocimiento de que los modelos de regresión convencionales tendían a conducir a un exceso de optimismo. Esto es particularmente cierto, considerando la multidimensionalidad de los datos que surgen de un gran número de  
20 covariables de citocinas, algunos de los cuales están altamente correlacionados entre sí. Por diversos motivos, los inventores usaron un enfoque diferente, e intentaron simultáneamente reducir el conjunto de marcadores (es decir, para reducir la dimensionalidad) mientras aplicaban penalizaciones para la reducción en el análisis estadístico. Sin desear quedar ligado a teoría, su motivación era que si un distintivo evalúa dos marcadores que se mueven en la misma dirección, entonces cualitativamente se está obteniendo la misma información de dos fuentes comparables.  
25 Esto proporciona la oportunidad de eliminar uno de los marcadores, simplificando así el distintivo sin comprometer la calidad de la información obtenida. El corolario de esto es que si dos análisis proporcionan información en dos direcciones diferentes, entonces se puede observar que esto proporciona información adicional para mejorar el distintivo. De este modo, los inventores buscaron retirar cualquier marcador que se pudiera considerar estadísticamente relacionado entre sí, llegando a un distintivo empírico mejorado (reducido), pero que todavía  
30 proporcionó excelentes características de diagnóstico.

### SELECCIÓN DE MARCADORES

Los inventores realizaron una selección de marcadores no sesgada. Los enfoques basados en el estado de la técnica han terminado usando un enfoque de "casos-contrroles". En resumen, esto se podría caracterizar por  
35 escoger TB como el objeto a ser tratado, seleccionar pacientes sanos, seleccionar pacientes que tienen TB y comparar los pacientes sanos con los pacientes enfermos con TB. Por el contrario, los inventores diseñaron un estudio de casos-contrroles anidados dentro de un enfoque de cohorte prospectiva (es decir, casos-contrroles anidados). Seleccionaron una cohorte de niños usando el mismo proceso de selección para identificar niños en diferentes localizaciones geográficas. Solo entonces identificaron dentro de las cohortes pacientes que tenían TB y pacientes que no tenían TB. Lo que es más importante, los inventores eligieron comparar TB con OD (es decir, "otra enfermedad respiratoria, pero no TB"). Esto es debido a que es una decisión clínica clave identificar los pacientes con TB en comparación con los que presentan otras enfermedades que no son TB. Así, se puede considerar un problema en la técnica diferenciar pacientes con TB de pacientes con "otra enfermedad".

Otro inconveniente con los estudios del estado de la técnica es que han tendido a escoger biomarcadores tales como citocinas que han sido publicados o asociados a TB. Por el contrario, los inventores tomaron un enfoque  
45 completamente imparcial y no seleccionaron biomarcadores por asociación con TB. Realizaron un análisis ciego y llegaron al distintivo de 8 biomarcadores sin saber que eran los biomarcadores individuales. Solo entonces los inventores analizaron las identidades de los biomarcadores en su distintivo. Un ejemplo de la sorpresa de este enfoque es considerando IFN- $\gamma$ . La vista en la técnica es que IFN- $\gamma$  participa con TB. De hecho, los enfoques del estado de la técnica han intentado usar IFN- $\gamma$  y/o IP-10 como biomarcadores para TB. Es extremadamente  
50 sorprendente que el distintivo de biomarcador enseñado en el presente documento no comprenda IFN- $\gamma$ .

Quantiferon ('QFT' - disponible comercialmente de Qiagen Inc.) es un ensayo de liberación de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), comúnmente conocido como un IGRA, y es una alternativa moderna a la prueba cutánea de la tuberculina (TST o Mantoux). En resumen, QFT mide la respuesta inmunitaria celular (citocinas) a antígenos de TB muy  
55 específicos. La prueba se realiza recogiendo sangre completa (1 mL) en cada uno de tres tubos de extracción de sangre. Cuando la sangre de un paciente infectado se estimula con los antígenos específicos de *M. tuberculosis* en QFT, sus linfocitos T responden secretando una citocina denominada IFN- $\gamma$ . La concentración de IFN- $\gamma$  en plasma se determina usando un ELISA sensible.

Así, Quantiferon ('QFT') es un ensayo comercial que todavía mide IFN-gamma tras la estimulación de la sangre con antígenos específicos para *M. tb*. También se han investigado algunos ensayos de IP-10 en el estado de la técnica. Sin embargo, mientras que IP-10 es supuestamente más robusto que IFN-gamma (es decir, se libera a un nivel mucho más alto tras la estimulación), por sí mismo no se puede distinguir entre enfermedad de TB y sensibilización a TB similar a IFN-gamma, que es un problema en la técnica. Ventajosamente, en la presente invención, lo que se enseña es una combinación de marcadores, que cuando se usan juntos - no individualmente - pueden distinguir TB de OD. Esto se basa en la percepción de los inventores de que, dada la complejidad de la enfermedad de TB, una combinación de marcadores en vez de un marcador individual tiene una mayor potencia y especificidad para distinguir TB de sensibilización a TB y/u otra enfermedad.

Con más detalle, los inventores adoptaron un enfoque poco usual analizando diversas citocinas y quimiocinas y con los valores de cada una en deciles. Empezando con 27 citocinas/quimiocinas como candidatos, cada una se transformó en 10 deciles dando 270 para cada paciente estimulado y 270 para cada paciente no estimulado.

Esto representa un enfoque categórico (en vez de continuo) que es en sí mismo una parte clave del innovador enfoque adoptado. Este enfoque nunca antes había sido aplicado al análisis de citocinas. Esto tiene ventajas que incluyen retirar el efecto de confusión del sesgo o selección en los biomarcadores que se usan.

El panel de 27 candidatos inicial no tuvo ninguna asociación previa con TB. Por ejemplo, no fueron específicos de TB. Como máximo, se puede considerar como un "panel inmunitario". Son simplemente marcadores implicados en linfocitos como parte de un kit comercial que no está de ningún modo comercializado o dirigido hacia TB. Para ilustrar cómo de sorprendentes fueron los hallazgos, incluso los inventores no predijeron lo que usarían usando este enfoque.

En una realización, el análisis se puede llevar a cabo del siguiente modo:

distribución de frecuencia > 10 deciles > hacer cada uno un cuantil binario.

En una realización, el análisis se puede llevar a cabo del siguiente modo:

distribución de frecuencia > deciles > 10 - cuantiles de igual tamaño > usar cada cuantil como corte para generar una variable binaria.

Se debe observar que cada citocina puede estar presente en un intervalo diferente de concentraciones de manera que cada uno de los deciles pueda no ser el mismo entre biomarcadores individuales. Sin embargo, la distribución de cada biomarcador individual se divide adecuadamente en 10 deciles (es decir, 10 cuantiles de igual tamaño) según su propio intervalo de concentraciones cuando está presente; cada valor de biomarcador determinado para un paciente se convierte entonces en un decil de esa distribución de frecuencia.

Se debe observar que la invención se refiere a obtener una decisión clínica si un sujeto tiene TB, u OD.

Es posible usar la invención como herramienta de cribado, tal como una prueba de cribado de la población.

Es una ventaja de la invención que es útil en ayudar en la decisión clínica si un paciente tiene TB, u OD.

#### DETERMINACIÓN DE DECILES

Se generan deciles según técnicas estadísticas estándar. La generación de deciles es un procedimiento matemático frecuente que se puede obtener o generar por cualquier software estadístico. Una variable específica (por ejemplo, una citocina medida) con valores cuantitativos cuando se mide de varios sujetos tendrá una distribución de frecuencia que entonces se usa para generar los deciles constituidos de 10 cuantiles de igual tamaño.

En caso de que se necesite cualquier orientación adicional, lo más adecuadamente se generan deciles como se describe más adelante en la sección de ejemplos.

#### SUJETOS

La presente invención se puede aplicar a cualquier sujeto desde recién nacido en adelante.

La presente invención se puede aplicar a adultos o niños.

Adecuadamente, el sujeto tiene 18 años o más, adecuadamente 16 años o más, adecuadamente 15 años o más, adecuadamente 7 años o más, adecuadamente 6 años o más, adecuadamente 5 años o más, adecuadamente 2 años o más.

Se debe observar que la mayoría de los sistemas inmunitarios funcionan como "adulto" desde 2 hasta 5 años en adelante. Así, adecuadamente, el sujeto tiene al menos 2 a 5 años. Adecuadamente, el sujeto tiene al menos 2 años. Adecuadamente, el sujeto tiene al menos 3 años, adecuadamente al menos 4 años, lo más adecuadamente al menos 5 años.

Adecuadamente, el sujeto es un niño.

Adecuadamente, el sujeto tiene 16 años o más.

Adecuadamente, el sujeto tiene 15 años o más.

5 Adecuadamente, el sujeto tiene 2 a 16 años, adecuadamente 3 a 16, adecuadamente 4 a 16, adecuadamente 5 a 16 años.

Adecuadamente, el sujeto tiene 2 a 15 años, adecuadamente 3 a 15, adecuadamente 4 a 15, adecuadamente 5 a 15 años.

Adecuadamente, el sujeto a ensayar ha presentado al menos uno de los siguientes síntomas: tos, pérdida de peso, sudoración, glándulas inflamadas y opcionalmente septicemia.

10 La invención se puede aplicar a TB intratorácica.

La invención se puede aplicar a TB pulmonar.

La invención se puede aplicar a TB extrapulmonar.

La invención se puede aplicar a pacientes que no están infectados por el VIH.

La invención se puede aplicar a pacientes que están infectados por el VIH.

15 Se debe observar que, puesto que el método se basa en la respuesta inmunitaria, que es poco probable que cualquier sujeto con un recuento de CD4 de 50 o menos muestre una respuesta. Así, adecuadamente, el sujeto tiene un recuento de CD4 de 51 o mayor. Para referencia, un recuento de CD4 normal en un humano sano tiene aproximadamente 1000.

#### DETECCIÓN

20 Adecuadamente, los biomarcadores descritos en el presente documento se detectan por los medios adecuados en la técnica. Por ejemplo, los biomarcadores se pueden detectar por uno o más anticuerpos que reconocen específicamente dichos biomarcadores.

Por ejemplo, los biomarcadores se pueden detectar por un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se ha descrito anteriormente, en donde el fragmento de unión al antígeno del mismo se selecciona del grupo  
25 que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un scFv, un Fv, una rIgG y un diacuerpo.

El modo de evaluación de la unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para detectar los marcadores es una cuestión de elección del operador. En caso de que se necesite cualquier orientación, se podrían usar ELISAs para cada una de las citocinas identificadas, por ejemplo, un ELISA para cada biomarcador. A  
30 continuación, se muestran ejemplos de reactivos de ELISA adecuados.

Los ELISA para las citocinas incluidas en el distintivo de la invención se pueden obtener comercialmente a partir de las siguientes empresas, con nombres de producto/detalles a modo de ejemplo cuando corresponda:

Elisa de sándwich Quantikine de R&D Systems UK, 19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon, OX14 3NB, Reino Unido (Tel +44 (0)800 3734 15).

35 Elisa Human Platinum o Elisa de alta sensibilidad de eBioscience, Ltd. (Irlanda, Reino Unido), 2nd Floor, Titan Court, 3 Bishop Square, Hatfield, AL10 9NA, Reino Unido.

Kits BD OptEIA de BD Biosciences, Edmund Halley Road, Oxford Science Park, Oxford, OX4 4DQ (Tel.: +44 1865 781 666; Fax: +44 1865 781 627).

40 Como sabrá el experto, los ELISAs individuales para cada citocina podrían ser laboriosos, y/o requieren mayores tamaños de muestra. Por tanto, es una ventaja llevar a cabo la detección en una muestra múltiplex o individual, cuando sea posible. Esto proporciona ventajas tales como bajo volumen (particularmente importante para una prueba pediátrica donde se desean volúmenes más bajos de sangre/suero), y combinación de las citocinas (menos trabajo para completar la prueba).

45 Existen numerosos proveedores comerciales de kit(s) de multiplexado adecuados útiles para detectar los biomarcadores del distintivo, por ejemplo:

MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay, número de catálogo: HCYTOMAG-60K disponible de Merck-Millipore, Suite 21, Building 6, Croxley Green Business Park, Watford, Hertfordshire WD18 8YH, Reino Unido.

Human Luminex Performance Assay Base Kit, Panel A [número de catálogo LUH000] de R&D Systems UK, 19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon, OX14 3NB, Reino Unido (Tel.: +44 (0) 800 37 34 15).

Human Cytokine/ Chemokine/ Growth Factor Panel 1 (45 plex), (número de catálogo: EPX450-12171-901) de eBioscience, Ltd., (Irlanda, Reino Unido), 2nd Floor, Titan Court, 3 Bishop Square, Hatfield, AL 10 9NA, Reino Unido.

5 Lo más adecuadamente, los anticuerpos usados pueden estar en el kit Bio-Rad Human cytokine Th-1/Th-2 27-plex (número de catálogo N° M500KCAF0Y de Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maxted Road, Hemel Hempstead, Hertfordshire, HP2 7DX, Reino Unido). Lo más adecuadamente, la detección de las citocinas del distintivo de la invención se detecta/ensaya usando este kit.

10 Es importante observar que la opinión predominante en la técnica es que se requiere la estimulación de células para su uso para el análisis. La estimulación puede ser por presentación con bacterias, o puede ser por presentación con antígeno o cualquier otra forma apropiada de estimulación. Sin embargo, se debe observar que estos tipos de estimulaciones están todos dirigidos a analizar las respuestas de recuerdo. Es una ventaja de la invención que se analicen las muestras no estimuladas. En particular, es una ventaja que la muestra sea de sangre no estimulada.

15 En particular, cuando se estudia el panel clave de 8 biomarcadores, la invención omite adecuadamente una etapa de estimulación; adecuadamente la invención no comprende una etapa de estimulación; adecuadamente la invención excluye una etapa de estimulación.

En algunas realizaciones, se puede emplear un noveno marcador o marcador adicional - se puede emplear una etapa de estimulación para dicho(s) marcador(es) adicional(es), si es apropiado.

20 Lo más adecuadamente, la invención omite una etapa de estimulación. Lo más adecuadamente, la invención no comprende una etapa de estimulación. Lo más adecuadamente, la invención excluye una etapa de estimulación.

#### Detección de ácidos nucleicos

Por ejemplo, los biomarcadores se pueden detectar en forma de ácido nucleico, por ejemplo, por detección de uno o más ARNm que codifican los biomarcadores.

25 Si el experto desea leer/ detectar ácidos nucleicos mediante un enfoque de micromatrices, se hace referencia a Anderson et al. 2014 (N Engl J Med. 1 my. 2014 ;370(18):1712-23 'Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa.' ILULU Consortium; KIDS TB Study Group).

Se emplean adecuadamente tecnologías de ARNm en un entorno de laboratorio.

En resumen, la detección de ARNm puede comprender las siguientes etapas:

- estabilización de ARN - se puede hacer con un reactivo específico,
- 30 • extracción de ARN,
- transcripción en ADNc,
- amplificación,
- matriz,
- lectura de datos.

35 Por supuesto, el experto en la técnica se dará cuenta de que algunas etapas son opcionales o se pueden combinar, por ejemplo, se puede no requerir la estabilización/extracción si la transcripción se puede realizar directamente sobre la muestra. Por ejemplo, se puede no requerir matriz si el material ejemplificado se ensaya directamente.

Así, en esencia, las etapas requeridas son:

- extracción de ácido nucleico
- 40 • ensayo de ácido nucleico para determinar el nivel de expresión de ARNm de marcadores de interés
- lectura de datos.

45 Para la detección multiplex, se usa adecuadamente una sonda de oligonucleótidos fluorogénica que es específica para el gen diana/diana amplificada. Se usan comúnmente sondas Taqman para el multiplexado, pero también se pueden usar si no se requiere multiplexado. Los protocolos son como se establecieron por el fabricante, por ejemplo, Applied Biosystems (5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, EE. UU.).

Se pueden usar diferentes colorantes para las sondas fluorogénicas; ejemplos que pueden ser útiles dependiendo de las condiciones tampón y el tipo de ciclador térmico se muestran en la tabla a continuación (Tabla de Qiagen Inc.):

\*Los espectros de emisión pueden variar dependiendo de las condiciones tampón.

| Colorante     | Máximo de excitación (nm) | Máximo de emisión (nm)* |
|---------------|---------------------------|-------------------------|
| Fluoresceína  | 490                       | 513                     |
| Oregon Green  | 492                       | 517                     |
| FAM           | 494                       | 518                     |
| SYBR Green I  | 494                       | 521                     |
| TET           | 521                       | 538                     |
| JOE           | 520                       | 548                     |
| VIC           | 538                       | 552                     |
| Yakima Yellow | 526                       | 552                     |

5

|                             |     |     |
|-----------------------------|-----|-----|
| HEX                         | 555 | 553 |
| Cy3                         | 562 | 570 |
| Bodipy TMR                  | 544 | 574 |
| NED                         | 548 | 575 |
| TAMRA                       | 560 | 582 |
| Cy3.5                       | 568 | 604 |
| ROX                         | 587 | 607 |
| Texas Red                   | 596 | 615 |
| LightCycler Red 640 (LC640) | 625 | 640 |
| Bodipy 630/650              | 625 | 640 |
| Alexa Fluor 647             | 650 | 666 |
| Cy5                         | 643 | 667 |
| Alexa Fluor 660             | 663 | 690 |
| Cy 5.5                      | 683 | 707 |

Se conocen bien en la técnica protocolos, por ejemplo, usando los sistemas de PCR en tiempo real StepOne y/o StepOne Plus Real Time según las instrucciones del fabricante Applied Biosystems (5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, EE. UU.).

- 10 Se pueden usar otros ensayos si no se desea el multiplexado, por ejemplo, después de la transcripción inversa, usando colorantes que se unen a ADN bicatenario y se vuelven fluorescentes. Por ejemplo, se puede usar SYBR green 1 (Qiagen Inc./ Qiagen Ltd. Skelton House, Lloyd Street North, Manchester M15 6SH, R.U).

- 15 Se pueden diseñar, o comprar prediseñados, ensayos de cebador-sonda útiles en la invención para el gen diana de interés, es decir, los biomarcadores de la invención. Por ejemplo, se puede usar el protocolo de Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific (5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, EE. UU.) para el diseño personalizado de SYBR green 1 ("Design and optimization of SYBR Green assays"), que incluye las herramientas de diseño de cebadores públicamente disponibles tratadas en el presente documento. Este documento se incorpora aquí en el presente documento como referencia específicamente para los protocolos de diseño de cebador/sonda y enseñanzas de detección de ácidos nucleicos.

- 20 En caso de que se requiera cualquier orientación adicional, se hace referencia a la sección de ejemplos de más adelante.

#### DETERMINACIÓN DE CUANTILES/ DECILES

Adecuadamente, convertir cada concentración de biomarcador determinada en un valor de decil comprende las etapas de:

- 25 (ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinada con una distribución de frecuencia de referencia de concentraciones de dicho biomarcador; y
- (cii) leer el valor de decil de la distribución de frecuencia para la concentración de dicho biomarcador.

Una "distribución de frecuencia" muestra una agrupación de datos resumida dividida en clases mutuamente excluyentes y el número de apariciones en una clase. Así, es posible hacer una distribución de frecuencia incluso con pequeños números de puntos de datos tales como 30 (por ejemplo, las notas del examen de 30 niños en una clase). Cuanto más grande sea el número de sujetos usados (es decir, puntos de datos), más representativa será la distribución de la población real, es decir, más normalmente distribuida estará la distribución de frecuencia. Normalmente se desvían las variables biológicas, por ejemplo, peso, altura, tensión arterial, concentración de hemoglobina, electrolitos en sangre, mediciones de citocina, etc. Así, para conseguir una curva normalmente distribuida para dichas variables biológicas usando un histograma normal se necesitan, por ejemplo, números muy grandes de puntos de datos que pueden ser problemáticos. Por tanto, se usan métodos no paramétricos, tales como Kernel, que es una estimación de densidad del suavizado de datos. Esto es especialmente útil cuando los presentes inventores quieren presentar la representación de distribución de dichos datos con un tamaño de muestra razonablemente bueno, por ejemplo, de 100 o más.

Por tanto, cuando se menciona 'distribución de frecuencia' en el presente documento, esto puede comprender adecuadamente un equivalente no paramétrico equivalente, tal como una estimación no paramétrica de la densidad, tal como una estimación de densidad de suavizado de datos, lo más adecuadamente una estimación de densidad de Kernel.

Considerando las Figuras 2 a 9, los ejes Y se etiquetan apropiadamente 'Densidad' debido a que indican la estimación de densidad de Kernel.

Con más detalle, la distribución de frecuencia de Kernel es un enfoque estadístico de suavizado de datos para presentar la distribución de frecuencia. A diferencia del 'histograma' regular, es un método no paramétrico que lo hace muy apropiado para el tipo de datos de los presentes inventores, que al igual que la mayoría de los datos biológicos, no sigue la distribución gaussiana normal. El histograma básico muestra la frecuencia en número o proporción y los problemas con los histogramas incluyen el hecho de que no es suave y depende de la anchura de las cajas (es decir, las barras) y el punto final de las cajas se puede elegir arbitrariamente. Sin embargo, la estimación de densidad de Kernel retira la dependencia del punto final de las cajas suponiendo que no hay hueco en el intervalo de las mediciones de citocinas dentro de un intervalo especificado, dando una estimación de densidad suave. El eje Y de las Figuras 2 a 9 se puede resumir simplemente como: "la función de densidad de probabilidad de cada marcador respectivo".

Adecuadamente, la distribución de frecuencia de referencia (o estimación de densidad de Kernel) se genera midiendo la concentración del biomarcador en varios sujetos, por ejemplo, un mínimo de 100 sujetos, y que recopila las mediciones en una distribución de frecuencia (o estimación de densidad de Kernel).

Alternativamente, se pueden usar las distribuciones de frecuencia (estimaciones de densidad de Kernel) presentadas en las Figuras 2 a 9 en el presente documento.

Adecuadamente, la etapa (c) convertir cada concentración determinada en (b) en un valor de decil comprende las etapas de:

(ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinado en (b) con la distribución de frecuencia de referencia correspondiente o estimación de densidad de Kernel de concentraciones de dicho biomarcador seleccionado de las Figuras 2 a 9; y

(cii) leer el valor de decil de la distribución de frecuencia o estimación de densidad de Kernel para la concentración de dicho biomarcador.

En una realización, los cortes de deciles/cuantiles pueden ser aumentados o sustituidos por cortes absolutos expresados como concentraciones absolutas del (de los) biomarcador(es) en la muestra. Se proporcionan en la tabla a continuación los valores de corte absolutos a modo de ejemplo:

| Biomarcador | Valor de corte de cuantil específico | Intervalo de concentración para cuantil específico (pg/mL) | Concentraciones absolutas de corte, es decir, $\geq$ XX |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| IL-1ra      | 3                                    | 76,0 - 99,5                                                | 76,0                                                    |
| IL6         | 6                                    | 759,0 - 1203,0                                             | 759,0                                                   |
| IL-7        | 8                                    | 167,0 - 269,0                                              | 167,0                                                   |
| IL-8        | 9                                    | 20196,0 - 25900,0                                          | 20196,0                                                 |
| IL-12p70    | 9                                    | 596,0 - 776,0                                              | 596,0                                                   |

|            |   |                 |        |
|------------|---|-----------------|--------|
| FGF-básico | 3 | 125,5 - 145,0   | 125,5  |
| IP-10      | 4 | 3096,5 - 4537,0 | 3096,5 |
| VEGF       | 9 | 3378,0 - 5381,0 | 3378,0 |

En una realización, se pueden aumentar los cortes de deciles/cuantiles o sustituir por el intervalo de concentración para el cuantil específico de interés expresado como el intervalo de concentraciones absolutas de biomarcador(es) en la muestra. Los intervalos de concentración a modo de ejemplo se proporcionan en la tabla anterior.

## 5 ANÁLISIS DE DIAGNÓSTICO INMEDIATO

En muchas realizaciones, el operario experto puede elegir analizar las concentraciones de los marcadores en un laboratorio o instalación de pruebas.

La invención también se puede aplicar como análisis de diagnóstico inmediato. Adecuadamente, la invención también se puede aplicar como análisis de cabecera.

- 10 Cuando la invención es un análisis de diagnóstico inmediato/de cabecera, adecuadamente la muestra es sangre o plasma. Cuando la invención es un análisis de diagnóstico inmediato/de cabecera, los marcadores se analizan adecuadamente en forma de proteína.

Cuando la invención es un análisis de diagnóstico inmediato / de cabecera, la detección es adecuadamente detección inmunológica.

- 15 Cuando la invención es un análisis de diagnóstico inmediato / de cabecera, la prueba es adecuadamente un formato de un ensayo de flujo lateral.

## VALORES PREDICTIVOS/APLICACIONES DEL MÉTODO

- 20 La siguiente tabla proporciona resultados adicionales de valores predictivos del distintivo biológico. Los presentes inventores muestran y comparan PPV y NPV del distintivo biológico con los métodos del estado de la técnica. Los presentes inventores muestran además que tiene rendimiento comparable demostrable con el método de referencia de cultivo. La alta especificidad y el valor predictivo positivo de la invención se prestan a sí mismos a cambiar las decisiones de tratamiento. Esto permite la precisa prescripción para TB detectada según la invención. Esto también evita el desperdiciar recursos en la prescripción de fármacos no necesarios. Esto demuestra además la utilidad de la invención.

| Exactitud diagnóstica de pruebas con respecto a un 'patrón de referencia compuesto' |                                                              |                                 |                       |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                                                                     | 'Todo diagnóstico de TB' como patrón de referencia compuesto |                                 |                       |                       |
|                                                                                     | Sensibilidad (%) (IC del 95 %)                               | Especificidad (%) (IC del 95 %) | PPV (%) (IC del 95 %) | NPV (%) (IC del 95 %) |
| <b>Radiografía del tórax (estado de la técnica)</b>                                 | 76 (62 - 86)                                                 | 34 (26 - 43)                    | 34 (25 - 43)          | 76 (62 - 87)          |
| <b>Algoritmo clínico (estado de la técnica)</b>                                     | 15 (7 - 28)                                                  | 99 (95 - 100)                   | 89 (52 - 100)         | 73 (65 - 79)          |
| <b>Cultivo (estado de la técnica)</b>                                               | 36 (23 - 50)                                                 | 100 (97 - 100)                  | 100 (82 - 100)        | 78 (71 - 84)          |
| <b>Distintivo biológico (invención)</b>                                             | 23                                                           | 99                              | 92                    | 75                    |
|                                                                                     | (12 - 36)                                                    | (95 - 100)                      | (64 - 100)            | (67 - 81)             |

- 25
- 30 Se evalúa ventajosamente el conjunto clave de 8 biomarcadores a partir de muestras no estimuladas. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser útil evaluar además un noveno marcador o marcador adicional; adecuadamente, dicho noveno marcador o marcador adicional comprende un marcador estimulado, tal como VEGF estimulado con EC. Adecuadamente, el corte para VEGF estimulado con EC es el decil 2. Para evitar dudas, los detalles del biomarcador de 'VEGF' de áreas de VEGF estimulado con EC anteriormente en el panel clave de 8 biomarcadores de la invención ('VEGF').

Un método para ayudar en el diagnóstico de TB en un sujeto, comprendiendo el método;

- 5 (a) proporcionar una muestra de dicho sujeto, siendo dicha muestra seleccionada del grupo que consiste en: sangre, suero y plasma;
- (b) determinar la concentración en dicha muestra de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF;
- (c) convertir cada concentración de biomarcador determinada en (b) en un valor de decil; y
- (d) convertir cada valor de decil en una presencia o ausencia binaria comparando los valores de decil de (c) con los siguientes valores de corte de cuantil específico:

| Biomarcador | Valor de corte de cuantil específico |
|-------------|--------------------------------------|
| IL-1ra      | 3                                    |
| IL6         | 6                                    |
| IL-7        | 8                                    |
| IL-8        | 9                                    |
| IL-12p70    | 9                                    |
| FGF-básico  | 3                                    |
| IP-10       | 4                                    |
| VEGF        | 9                                    |

- 10 en donde un valor de decil que corresponde o supera el valor de corte de cuantil específico se convierte en presencia binaria del biomarcador, y un valor de decil inferior a los valores de corte de cuantil específico se convierte en ausencia binaria del biomarcador;

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores indica un aumento de la probabilidad de que el sujeto tenga TB.

- 15 Un método de diferenciación de TB de OD en un sujeto, comprendiendo el método llevar a cabo las etapas (a) a (d) anteriores

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores indica que el sujeto tiene TB.

Un método de recogida de información útil en el diagnóstico de TB en un sujeto, comprendiendo el método:

llevar a cabo las etapas (a) a (d) anteriores

- 20 en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores identifica que el sujeto tiene TB.

Un método para el diagnóstico de TB en un sujeto, comprendiendo el método;

llevar a cabo las etapas (a) a (d) anteriores

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores proporciona el diagnóstico de que el sujeto tiene TB.

- 25 Un método de selección de un sujeto para recibir tratamiento para TB, comprendiendo el método llevar a cabo las etapas (a) a (d) anteriores

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores selecciona dicho sujeto para recibir dicho tratamiento.

- 30 Un método que comprende las etapas de seleccionar un sujeto para recibir tratamiento para TB llevando a cabo las etapas (a) a (d) anteriores

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores selecciona dicho sujeto para recibir dicho tratamiento; y administrar dicho tratamiento a dicho sujeto.

Un método de tratamiento de TB en un sujeto que comprende administrar un régimen de 2HRZE/4HR (2 meses HRZE seguido por 4 meses HR en donde H = isoniazida, R = rifampicina, Z = pirazinamida, E = etambutol) a un

sujeto que se ha determinado que tiene uno de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF. La invención también se refiere a dicho método que comprende además probar el sujeto antes de la etapa de administración para determinar que el sujeto tiene los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF. Adecuadamente, la prueba se lleva a cabo llevando a cabo las etapas (a) a (d) anteriores.

En la medida en que se implementan las realizaciones de la invención descritas anteriormente, al menos en parte, usando aparato de procesamiento de datos controlado por software, se apreciará que se prevén como aspectos de la presente invención un programa informático que proporciona dicho control de software y un medio de almacenamiento por el que dicho programa informático se almacena. Claramente en varios de los métodos o procesos de la invención, una etapa (normalmente la etapa (a)) comprende proporcionar una muestra del sujeto - claramente esa etapa no se realizaría normalmente usando el aparato de procesamiento de datos controlado por software; adecuadamente esa etapa se ejecuta manualmente, o se omite, en realizaciones implementadas usando el aparato de procesamiento de datos controlado por software.

Así, la invención se refiere a un aparato, tal como un ordenador que comprende lógica, circuitería o código configurado para llevar a cabo el método que se ha descrito anteriormente.

Así, la invención se refiere a un producto de programa informático operable, cuando se ejecuta en un ordenador, para realizar el método que se ha descrito anteriormente.

Los aspectos particulares y preferidos adicionales se explican en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes se pueden combinar con características de las reivindicaciones independientes según convenga, y en combinaciones distintas de las explícitamente expuestas en las reivindicaciones.

Donde se describe una característica de aparato por ser operable para proporcionar una función, se apreciará que esta incluye una característica de aparato que proporciona esa función o que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra modelos de LASSO óptimos con covariables de citocinas, ajustados para la edad y el origen. Paneles a, b, c: Modelo de LASSO óptimo, ajustado para la edad y el origen, determinado por una validación cruzada quíntuple en el conjunto de entrenamiento. Paneles d, e, f: Diagrama de caja y bigotes que muestra la probabilidad de la enfermedad de TB en los sujetos con TB bacteriológicamente confirmada, TB clínicamente diagnosticada y con OD en el conjunto de entrenamiento como se predice por el distintivo biológico identificado. Paneles g, h, i: ABC que muestra la capacidad de discriminación del distintivo biológico identificado para clasificar TB confirmada de OD en el conjunto de prueba independiente

La Figura 2 muestra una distribución de frecuencia para IL-1ra

La Figura 3 muestra una distribución de frecuencia para IL-6

La Figura 4 muestra una distribución de frecuencia para IL-7

La Figura 5 muestra una distribución de frecuencia para IL-8

La Figura 6 muestra una distribución de frecuencia para IL-12p70

La Figura 7 muestra una distribución de frecuencia para FGF-básico

La Figura 8 muestra una distribución de frecuencia para IP-10

La Figura 9 muestra una distribución de frecuencia para VEGF

La Figura 10 muestra un dispositivo de flujo lateral.

La Figura 11 muestra el formato de detección múltiple de un dispositivo de flujo lateral.

## **EJEMPLOS**

### **Métodos**

#### *Breve descripción de la cohorte*

Se rastrearon activamente niños de menos de 15 años de edad que se expusieron a un caso de TB infecciosa en el adulto en el ámbito familiar y se cribaron para síntomas sugerentes de enfermedad de TB en los hogares

respectivos. Aquellos con sospecha de enfermedad por TB intratorácica tuvieron a partir de aquí una evaluación detallada adicional e investigaciones para determinar su estado de enfermedad de TB. Se incluyeron un total de 173 contactos con TB con los niños con sospecha de enfermedad por TB intratorácica, reclutados prospectivamente tanto en Gambia (n=150) como en el Reino Unido (n=23), en los experimentos de descubrimiento de distintivo biológico usando un enfoque inmunoepidemiológico.

#### *Ensayo de estimulación de sangre completa (WBA)*

Para la cohorte de Gambia, se estableció un WBA en el reclutamiento en el plazo de cuatro horas desde la venopunción. Se incubaron por duplicado 100 µL de sangre completa heparinizada no diluida con los antígenos de *M. tb* proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 (EC; 10 µg/mL de concentración final; amablemente proporcionado por el Profesor Tom Ottenhoff, Centro Médico de la Universidad de Leiden, Países Bajos) y controles positivos (PHA-L, Sigma Chemicals, UK; 10 µg/mL de concentración final) y negativos (medio RPMI 1640; BioWittaker, Verviers, Bélgica). Después de la incubación durante la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, se recogieron los sobrenadantes, se reunieron los duplicados y se almacenaron a -20 °C antes del análisis. Se añadieron muestras a esta cohorte de una configuración equivalente de un estudio de contacto en el hogar en el R. U., realizado por BK. Para los niños de la cohorte del R. U., los presentes inventores también habían obtenido los datos demográficos y clínicos relevantes y obtuvieron sobrenadantes de la prueba de IGRA (Quantiferon-TB Gold In-Tube (QFT-G)) test (Cellestis, Australia). Similar a nuestro ensayo en casa, este ensayo de liberación de IFN-γ *in vitro* comercialmente disponible usa la estimulación de sangre completa fresca en tres tubos separados que contienen antígenos de *M. tb* (ESAT-6, CFP10 y TB 7.7), controles positivos (fitohemaglutinina-L) y negativos (Nulo), respectivamente. Estas muestras se transportaron congeladas a Gambia para análisis conjuntos.

Se usaron los sobrenadantes de WBA de los niños gambianos y los sobrenadantes de QFT de los niños de la cohorte del R. U. para un ensayo de detección de citocinas múltiplex (MCA). El MCA se llevó a cabo en el sitio en el Laboratorio de Inmunología de TB MRC en Gambia, con las muestras gambianas y del R. U. aleatoriamente distribuidas en las placas de múltiplex.

#### *Ensayo de detección de citocinas múltiplex (MCA)*

Los presentes inventores llevaron a cabo un amplio MCA por Luminex usando los sobrenadantes de WBA no estimulados y estimulados por EC de los niños gambianos y sobrenadantes de QFT (de tubos de antígeno y de QFT nulo) de los niños de la cohorte del R. U. Se analizaron los sobrenadantes de cultivo usando el kit Bio-Rad Human cytokine Th-1/Th-2 27-plex según las instrucciones del fabricante y como se describe previamente [1]. Las citocinas evaluadas fueron: IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, FGF básico, G-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, TNFα y VEGF. Tras el humedecimiento previo de la placa filtrante, se añadieron 50 µL de la suspensión de perlas a cada pocillo y se lavaron dos veces. Entonces se añadieron 50 µL de muestras y patrones, se probaron individualmente y por duplicado, respectivamente, y se selló la placa y se agitó durante 30 segundos a 1100 rpm y luego se incubó durante una hora a 300 rpm. La placa se lavó tres veces, se añadieron 25 µL de anticuerpo de detección previamente diluido y la placa se agitó y se incubó durante 30 minutos a 300 rpm en la oscuridad. Después de lavar, se añadieron 50 µL de 1 x estreptavidina-PE a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos con agitación a 300 rpm. La placa se lavó nuevamente y se resuspendió en 125 µL de tampón de ensayo, se selló, se mezcló y se leyó inmediatamente en el analizador Bio-plex usando Bioplex Manager Software (versión 4.0; Bio-Rad, EE. UU.) y una configuración de tubo fotomultiplicador bajo (PMT). Se calcularon como cero en el análisis las concentraciones de citocinas por debajo del nivel de detección – informadas como 'OOR' en el software Bioplex.

#### *Análisis estadístico*

Los presentes inventores analizaron los datos obtenidos del ensayo de citocinas múltiplex (MCA) de sobrenadantes de cultivo de sangre completa no estimulada y estimulada con EC para la identificación del distintivo biológico de multicitocinas específicas del hospedador asociado a TB en niños. Para este análisis, se analizaron como variables separadas las respuestas de citocinas no estimuladas y específicas del antígeno del MCA 27-plex. Los presentes inventores asignaron al azar los sujetos del estudio a un conjunto de entrenamiento (80 % de sujetos) y un conjunto de prueba independiente (20 %). Los presentes inventores usaron entonces el modelo lineal generalizado (GLM) aplicando la penalización del encogimiento mínimo absoluto y operador de selección (LASSO) para ajustar los modelos de regresión logística en el conjunto de entrenamiento ajustando para la edad en años y el origen de la muestra, inicialmente con TB bacteriológicamente confirmada (tratamiento de referencia) en comparación con otras enfermedades respiratorias que imitan a la TB pero no TB (grupo OD) como la variable de resultado binario. El modelo LASSO se aplica a probabilidad penalizada máxima al tamaño absoluto de los coeficientes de regresión, reduciéndolos hacia cero, es decir, se aplica una penalización de la norma L1 a los coeficientes de regresión. Este procedimiento da como resultado tanto la selección variable (algunos coeficientes de regresión iguales a cero) y estimaciones de coeficientes de regresión distintos de cero reducidos hacia cero. Esta metodología es adecuada para los datos de las citocinas de los presentes inventores en los que hubo muchas medidas, muchas de las cuales pudieron estar posiblemente altamente correlacionadas.

Los presentes inventores ajustaron las covariables de citocinas como variables categóricas y continuas y como una combinación de ambas. Se construyeron covariables de citocinas categóricas por un fraccionamiento de los valores

de citocinas en deciles dividiendo la distribución de frecuencia de cada valor de citocina en 10 cuantiles del mismo tamaño, que luego se ajustaron en el modelo como 10 variables binarias para cada citocina usando cada uno de los 10 cuantiles como corte. Se determinó el modelo de LASSO óptimo usando una validación cruzada quíntuple en el conjunto de entrenamiento, que posteriormente se aplicó para clasificar TB bacteriológicamente confirmada de OD en el conjunto de pruebas independientes intacto de origen. Se definió el modelo óptimo como el modelo con el parámetro de penalización más alto ('lambda) que da como resultado el error de predicción más pequeño y la mejor ABC de validación cruzada media. El proceso de validación cruzada explica y sustituye el método clásico de ajuste de múltiples pruebas. Además, protege naturalmente contra el ajuste en exceso y es una forma de evaluar cómo un modelo se generalizará a un conjunto de datos independiente. Se evaluó el rendimiento de predicción del modelo de LASSO óptimo estimando las probabilidades de predicción para TB y el área bajo las curvas (ABC) de eficacia diagnóstica.

#### Resultados

En general, se diagnosticaron 53 niños de las cohortes combinadas con TB y empezaron con el tratamiento de referencia para TB; 24 tuvieron TB bacteriológicamente confirmada y 29 tuvieron TB diagnosticada basándose en las características clínicas y radiológicas sin pruebas microbiológicas positivas. Se diagnosticaron ciento veinte y se trataron para OD. Con detalle, treinta y cinco de los 150 niños gambiaños TB, que comprende 16 casos de TB bacteriológicamente confirmada y 19 clínicamente diagnosticada, mientras que 115 tuvieron OD. De los 23 niños del R. U., 18 fueron diagnosticados con TB (8 TB confirmadas y 10 clínicamente diagnosticadas), mientras que 5 tuvieron OD. Ninguno de los niños reclutados de Gambia o el R. U. estuvo infectado por el VIH. La Tabla 1 muestra que fue comparable la distribución de los perfiles basales de los niños de Gambia y del R. U.

**Tabla 1: Perfil demográfico de niños por origen**

| Características         | Total        | Gambia       | Reino Unido |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------|
|                         | N =173       | N=150        | N=23        |
| <b>Edad:</b>            |              |              |             |
| Años, mediana (IQR)     | 6 (3 - 9)    | 6 (3 - 9)    | 7 (3 - 12)  |
| <5 años, n/N (%)        | 65/173 (38)  | 55/150 (37)  | 10/23 (43)  |
| <b>Sexo:</b>            |              |              |             |
| Masculino, n/N (%)      | 88 (51)      | 76 (51)      | 12 (52)     |
| <b>Prueba del VIH:</b>  |              |              |             |
| Positiva, n/N (%)       | 0            | 0            | 0           |
| <b>Cicatriz de BCG:</b> |              |              |             |
| Presente, n/N (%)       | 117/164 (71) | 99/141 (70)  | 18/23 (78)  |
| <b>TST:</b>             |              |              |             |
| ≥ 10 mm, n/N (%)        | 98/171 (57)  | 82/149 (55)  | 16/22 (72)  |
| <b>IGRA:</b>            |              |              |             |
| Positivo, n/N (%)       | 120/173 (69) | 103/150 (69) | 17/23 (74)  |

#### *Patrón de producción de citocinas y quimiocinas en TB confirmada frente a OD*

Se compararon las concentraciones de citocinas y quimiocinas obtenidas por un análisis de citocinas múltiple 27-plex de sobrenadantes no estimulados y sobrenadantes estimulados con EC de niños con TB bacteriológicamente

confirmada con los niveles en niños con OD por análisis de regresión lineal multivariable, ajustando para la edad en años y el origen. Se analizaron los valores no estimulados y específicos de EC (es decir, valores de control negativo estimulados con EC *menos* no estimulados) para cada citocina o quimiocina como variables separadas.

**Tabla 2. Diferencia media en la concentración (pg/mL) de los 27 marcadores: TB confirmada frente a OD**

| Analitos        | Valores no estimulados (pg/mL) |                        |                         | Valores específicos de ESAT-6/CFP-10 (pg/mL) |                        |                         |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
|                 | TB confirmada frente a OD      |                        |                         | TB confirmada frente a OD                    |                        |                         |
|                 | Diferencia media               | IC del 95 %            | Valor de P <sup>Ω</sup> | Diferencia media                             | IC del 95 %            | Valor de P <sup>Ω</sup> |
| IL-1b           | 307,7                          | -961,8 - 1577,1        | 0,633                   | 41,3                                         | -4025,6 - 4108,3       | 0,984                   |
| <b>IL-1ra</b>   | <b>118,2</b>                   | <b>13,4 - 222,9</b>    | <b>0,027</b>            | 336,9                                        | -359,5 - 1033,4        | 0,340                   |
| IL-2            | 43,9                           | -71,7 - 159,6          | 0,454                   | <b>4995,1</b>                                | <b>1981,2 - 8009,0</b> | <b>0,001</b>            |
| IL-4            | 58,8                           | -2,3 - 119,9           | 0,059                   | 76,4                                         | -52,4 - 205,2          | 0,243                   |
| IL-5            | 36,8                           | -17,8 - 91,4           | 0,185                   | -39,9                                        | -670,3 - 590,3         | 0,900                   |
| IL-6            | 1289,8                         | -1193,7 - 3773,3       | 0,306                   | -555,1                                       | -4207,1 - 3097,0       | 0,764                   |
| <b>IL-7</b>     | <b>181,8</b>                   | <b>90,0 - 273,6</b>    | <b>0,000</b>            | <b>-82,1</b>                                 | <b>-140,9 a -23,3</b>  | <b>0,007</b>            |
| IL-8            | 2555,1                         | -388,3 - 5498,6        | 0,088                   | -1800,4                                      | -5554,9 - 1954,1       | 0,345                   |
| IL-9            | 81,6                           | -28,1 - 191,1          | 0,144                   | -61,9                                        | -281,8 - 157,9         | 0,578                   |
| IL-10           | 5 1,2                          | -140,7 - 243,2         | 0,598                   | 28,1                                         | -3357,7 - 3413,9       | 0,987                   |
| <b>IL-12p70</b> | <b>153,5</b>                   | <b>43,0 - 263,9</b>    | <b>0,007</b>            | 7,1                                          | -158,9 - 173,0         | 0,933                   |
| <b>IL-13</b>    | <b>129,1</b>                   | <b>26,7 - 231,6</b>    | <b>0,014</b>            | 728,2                                        | -331,4 - 1787,8        | 0,176                   |
| <b>IL-15</b>    | <b>1258,5</b>                  | <b>468,4 - 2048,6</b>  | <b>0,002</b>            | -237,7                                       | -928,7 - 453,3         | 0,498                   |
| <b>IL-17</b>    | <b>116,3</b>                   | <b>11,9 - 220,7</b>    | <b>0,029</b>            | 122,6                                        | -20,3 - 265,5          | 0,092                   |
| <b>Eotaxina</b> | <b>214,2</b>                   | <b>75,5 - 352,9</b>    | <b>0,003</b>            | 13,4                                         | -138,5 - 165,2         | 0,862                   |
| <b>FGF-</b>     | <b>114,9</b>                   | <b>13,6 - 216,1</b>    | <b>0,026</b>            | 65,5                                         | -59,7 - 190,8          | 0,303                   |
| <b>GCSF</b>     | <b>222,9</b>                   | <b>51,3 - 394,6</b>    | <b>0,011</b>            | 1009,0                                       | -793,6 - 2811,6        | 0,270                   |
| GMCSF           | 41,4                           | -185,6 - 268,4         | 0,719                   | 236,1                                        | -81,0 - 553,2          | 0,143                   |
| <b>IFN-γ</b>    | <b>81,4</b>                    | <b>4,8 - 158,0</b>     | <b>0,038</b>            | 2148,9                                       | -1144,4 - 5442,4       | 0,199                   |
| <b>IP-10</b>    | <b>4631,9</b>                  | <b>877,2 - 8386,7</b>  | <b>0,016</b>            | -434,3                                       | -4602,8 - 3734,2       | 0,837                   |
| MCP1-           | 4739,8                         | -314,5 - 9794,1        | 0,066                   | -3830,4                                      | -9061,8 - 1400,9       | 0,150                   |
| MIP1a           | 2721,4                         | -337,5 - 5780,3        | 0,081                   | -939,9                                       | -4887,5 - 3007,8       | 0,639                   |
| <b>MIP1b</b>    | <b>4400,8</b>                  | <b>364,0 - 8437,5</b>  | <b>0,033</b>            | -3997,5                                      | -8244,7 - 249,8        | 0,065                   |
| PDGF            | 326,1                          | -1053 - 1705,3         | 0,641                   | 437,8                                        | -575,8 - 1451,2        | 0,395                   |
| RANTES          | -106,3                         | -1446,0 - 1233,4       | 0,876                   | 273,5                                        | -943,5 - 1490,6        | 0,657                   |
| TNF-α           | 273,8                          | -1,7 - 549,3           | 0,051                   | -399,0                                       | -4033,0 - 3234,9       | 0,828                   |
| VEGF            | <b>1977,7</b>                  | <b>1116,1 - 2839,2</b> | <b>0,000</b>            | -491,6                                       | -1224,0 - 240,8        | 0,187                   |

<sup>Ω</sup>Ajustado para la edad en años y origen

IC del 95 % = intervalo de confianza del 95 % de diferencia media

Como se muestra en la Tabla 2, de las 27 citocinas y quimiocinas analizadas, las concentraciones no estimuladas de IL1ra, IL7, IL12p70, IL13, IL15, IL17, eotaxina, FGF básico, GCSF, IFN- $\gamma$ , IP10, MIP1b y VEGF fueron significativamente más altas en niños con TB confirmada en comparación con niños con OD. De las concentraciones específicas de EC de todos los analitos, solo IL2 e IL7 fueron significativamente diferentes entre los dos grupos.

Además, los presentes inventores encontraron que las concentraciones en muestras no estimuladas fueron significativamente más altas para todos los analitos en niños del R. U. en comparación con niños gambiaños independientemente de la edad o diagnóstico (valor de  $p < 0,001$  para todos), con la excepción del valor de IL7 no estimulada en el que no hubo diferencia significativa (datos no mostrados). Por el contrario, las concentraciones específicas de EC de los analitos fueron significativamente más bajas en niños del R. U. en comparación con los niños gambiaños independientemente de la edad y el diagnóstico (valor de  $p < 0,001$  en todos), con la excepción de las concentraciones específicas de EC de IL2, IL5, IL7, IL13, IFN- $\gamma$  y RANTES en las que no hubo diferencias significativas.

#### *Identificación de un distintivo biológico específico de hospedador para el diagnóstico de TB en los niños*

Usando GLM con penalización por LASSO para ajustar un modelo de regresión logístico binario, ajustando para la edad en años y origen y con validación cruzada quíntuple en el conjunto de entrenamiento, una combinación de nueve citocinas categóricas predijo óptimamente TB u OD con un ABC de validación cruzada media de 0,82. Cada una de las nueve citocinas es una variable binaria con un valor de corte.

Las citocinas - con el valor de corte de cuantil específico para cada una entre paréntesis - fueron: IL-1ra (3), IL6 (6), IL-7 (8), IL-8 (9), IL-12p70 (9), FGF-básico (3), IP-10 (4), VEGF (9) no estimulados y VEGF estimulado con EC (2). Cuando se aplicaron al conjunto de pruebas independientes, este modelo clasificado de forma fiable confirmó TB de OD con un ABC de 0,91 (IC del 95 % 0,80 - 1,0) como se representa gráficamente en la Figura 1.

#### *Exactitud del diagnóstico y valor añadido del distintivo biológico de multicitocinas*

Los valores de corte de cuantil específico para cada citocina en el distintivo biológico permitieron a los presentes inventores convertir el distintivo biológico en una prueba binaria - positiva o negativa. Los presentes inventores investigaron la exactitud del diagnóstico del distintivo biológico como dos variables separadas, es decir, "*distintivo biológico 1*" (combinación de las 9 citocinas identificadas) y "*distintivo biológico 2*" (combinación de solo las 8 citocinas de sobrenadantes no estimulados). Cuando los presentes inventores compararon los resultados de los novedosos distintivos biológicos de multicitocina con la *clasificación de certeza* de la enfermedad (es decir, TB bacteriológicamente confirmada (=TB confirmada), TB clínicamente diagnosticada (=TB probable) y otras enfermedades respiratorias pero no TB (OD) como se define por la OMS [2], el '*distintivo biológico 1*' fue positivo en 8 % de la TB confirmada y 7 % de casos de TB clínicamente diagnosticada. Sin embargo, el '*distintivo biológico 2*' tuvo una sensibilidad relativamente más alta con resultados positivos en 21 % y 24 % de los casos de TB confirmada y clínicamente diagnosticada, respectivamente. Ambas versiones del distintivo biológico fueron negativas en 119 de los 120 casos de OD dando una especificidad muy alta de 99,2 % (Tabla 3).

**Tabla 3: Rendimientos de distintivos biológicos con respecto a la clasificación de certeza de enfermedad por TB**

| Definición de casos de TB revisados por la OMS*                                                                                                                                                                                                                                               |                               |                               |                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                               | TB confirmada (N = 24), n (%) | TB clínicamente diagnosticada | OD (no TB) (N = 120), n (%) |
| 'Distintivo biológico 1' +                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2                             | 2                             | 1 (0,8)                     |
| 'Distintivo biológico 1' -                                                                                                                                                                                                                                                                    | 22                            | 27                            | 119 (99,2)                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                               |                               |                             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                               | TB confirmada (N = 24), n (%) | TB clínicamente diagnosticada | OD (no TB) (N = 120), n (%) |
| 'Distintivo biológico 2' +                                                                                                                                                                                                                                                                    | 5                             | 7                             | 1 (0,8)                     |
| 'Distintivo biológico 2' -                                                                                                                                                                                                                                                                    | 19                            | 22                            | 119 (99,2)                  |
| + = prueba positiva;                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |                               |                             |
| - = prueba negativa;                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |                               |                             |
| % = porcentaje de columna, es decir, n/N                                                                                                                                                                                                                                                      |                               |                               |                             |
| (* W.H.O. Definitions and reporting framework for Tuberculosis – revisión de 2013, Ginebra, Suiza. <a href="http://www.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf">www.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf</a> [se accedió el 3 de diciembre de 2014]) |                               |                               |                             |

Usando un patrón de referencia compuesto de todos los niños diagnosticados con enfermedad por TB activa, el 'distintivo biológico 2' obtenido de solo marcadores en sobrenadantes no estimulados fue positivo en 12 de los 53 niños diagnosticados con enfermedad por TB activa dando una sensibilidad de 23 % (IC del 95 % 12 - 36). Como pruebas individuales, la sensibilidad del 'distintivo biológico 2' fue significativamente superior a la de la baciloscopia (5,7 %; valor de  $p = 0,020$ ), pero comparable a la del cultivo de *M. tb* (35,9 %; valor de  $p = 0,127$ ). La combinación de 'distintivo biológico 2' y baciloscopia dio positivo en 15 de los 53 niños con enfermedad por TB activa, dando una sensibilidad de 28,3 %, que fue significativamente superior a la sensibilidad de la baciloscopia sola (5,7 %;  $p < 0,001$ ). Similarmente, el 'distintivo biológico 2' combinado con el cultivo de *M. tb* tuvo una sensibilidad de 49,1 %, que fue significativamente superior a la sensibilidad del cultivo de *M. tb* usado solo (35,9 %;  $p < 0,001$ ). La sensibilidad del 'distintivo biológico 2' combinada con el cultivo de *M. tb* fue significativamente superior a la del 'distintivo biológico 2' combinado con la microscopía ( $p < 0,001$ ), pero comparable a la sensibilidad de la combinación del 'distintivo biológico 2', microscopía y cultivo de *M. tb* ( $p = 0,320$ ). El uso del 'distintivo biológico 2' en combinación con estas pruebas diagnósticas no dio como resultado ningún cambio en la especificidad de las pruebas.

## Sumario

Puesto que se ha mostrado que son importantes los factores inmunitarios del hospedador, tales como IFN- $\gamma$ , pero insuficientes para confirmar o excluir TB [3, 4], el objetivo de este estudio fue investigar citocinas distintas de IFN- $\gamma$  que pudieran ayudar a diferenciar TB de OD en niños gambiaños y del R. U., puesto que la distinción de estas dos presentaciones clínicas es importante para iniciar la terapia adecuada. Estudios previos han informado de otras citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-12(p40), IL-6, IL-10, IL-18 y IL-17, FGF y VEGF que se ha encontrado que son importantes en la respuesta inmunitaria contra *M. tb* y/o en distinguir TB de OD [1, 5, 6].

Los presentes inventores identificaron un distintivo biológico único, de cuantil específico, de 9 citocinas que distinguió óptimamente la TB bacteriológicamente confirmada de OD independientemente de la edad y origen de los niños. El distintivo biológico también predijo la probabilidad de enfermedad por TB activa en niños con TB clínicamente diagnosticada que fue comparable a la de los casos de TB bacteriológicamente confirmada. Específicamente, los presentes inventores usaron un modelo de regresión de LASSO ajustado a la edad y el origen para identificar una combinación de cuantil específico de IL-1ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF básico, IP-10, VEGF no estimulados y VEGF estimulado con EC que distinguieron óptimamente entre la TB bacteriológicamente confirmada y OD con un ABC de 0,91 en un conjunto de pruebas independientes. El rendimiento de este distintivo biológico fue independientemente de la sensibilización a *M. tb* en los grupos de desenlace clínico, mientras que ocho de las 9 citocinas en el distintivo biológico fueron de sobrenadantes no estimulados. La mayor fortaleza del estudio de los presentes inventores es el enfoque prospectivo usado en un contexto del estudio de búsqueda de casos activos exclusivamente pediátricos mientras que el distintivo biológico identificado en la cohorte de los presentes inventores contiene citocinas conocidas por estar estrechamente asociadas a inmunidad a TB.

Los presentes inventores investigaron por separado la exactitud diagnóstica del distintivo biológico de 8 citocinas que comprende solo los marcadores de sobrenadantes no estimulados, y el distintivo biológico completo de 9 citocinas de los presentes inventores comparando sus resultados con las *clasificaciones de certeza de la enfermedad* según las definiciones de casos de la OMS y un patrón de referencia compuesto de todos los niños diagnosticados con enfermedad por TB activa. Los presentes inventores encontraron que mientras que el distintivo biológico de 8 citocinas no estimuladas tenía una sensibilidad relativamente mayor que el distintivo biológico completo de 9 citocinas, ambas versiones de distintivo biológico distinguieron enfermedad por TB activa de OD con una especificidad muy alta del 99,2 %. El distintivo biológico de 8 citocinas no estimulada detectó un número comparable de casos de TB entre todos los niños diagnosticados con enfermedad por TB activa en el estudio de los presentes inventores con respecto al cultivo de *M. tb*, y demostró un valor añadido sustancial cuando se combinó con pruebas diagnósticas de TB rutinarias. Mostró una especificidad comparablemente más alta, pero una menor sensibilidad con respecto a una puntuación de riesgo basada en un transcrito de 51 genes de sangre completa que se identificó en un estudio de biomarcadores de TB en los niños en múltiples países en África oriental y del sur, así como una combinación de tres marcadores de TNF- $\alpha$ , IL-12(p40) y IL-17 en sobrenadantes de sangre completa estimulados con antígeno de gambiaños adultos [1, 7]. Sin embargo, la especificidad de este distintivo biológico pediátrico es comparable a la de la combinación de IL-13, FCF y IFN- $\gamma$  en muestras de esputo *ex vivo* en otro estudio en adultos en Gambia, que dio como resultado 96 % de clasificación correcta de casos de TB confirmada de cultivo consecutivamente reclutados de OD con una sensibilidad de 85 % y especificidad de 96 % [6].

Varios factores hacen que este distintivo biológico de multicitocinas no estimuladas sea un enfoque particularmente prometedor para su uso en países con una alta carga de TB. En primer lugar, los valores de corte de cuantil específico para cada una de las citocinas componente significa que las lecturas pueden ser fácilmente convertidas en una prueba binaria con o un resultado positivo o negativo, que hace que sea más fácilmente interpretable. En segundo lugar, este distintivo biológico de multicitocinas, derivado de solo marcadores en sobrenadantes no estimulados, tuvo propiedades epidemiológicas similares para cultivo de *M. tb*, pero no se somete posiblemente al mismo retraso de tiempo o riesgo de contaminación como cultivo. En tercer lugar, tiene un potencial demostrable para reducir el supuesto tratamiento de enfermedad de TB en niños en ámbitos de atención primaria en países en desarrollo donde el diagnóstico de TB se basa principalmente en el uso de baciloscopia, así como en centros de

traslado con instalaciones de rayos X, Xpert y/o de cultivo. Esto es debido al aumento sustancial en el número de niños que se consideraría que tendrían enfermedad por TB activa cuando se usa en combinación con las pruebas diagnósticas rutinarias. En cuarto lugar, este distintivo biológico de multicitocina no estimulada se podría medir posiblemente directamente en muestras de suero o plasma sin el coste adicional, entrenamiento o infraestructura necesarios para la estimulación e incubación de antígenos en el laboratorio. Así, el distintivo biológico de 8 citocinas es la realización más preferida de la invención.

## Ejemplo 2: Detección basada en ácidos nucleicos

En este ejemplo, los presentes inventores describen el procesamiento de muestras para ilustrar la aplicación de la invención/distintivo génico en ayudar al diagnóstico de TB (tal como TB en los niños) mediante detección de ácidos nucleicos, tal como detección de ARN (ARNm).

### 1. Recogida de muestras:

Se recoge la muestra de sangre en un tubo que contiene un agente estabilizante para ARN, tal como un tubo PaxGene o tubo tempus.

Alternativamente se añade trizol a la muestra.

Dicha muestra se puede guardar en el frigorífico o congelador hasta que se procese.

Si se guarda en el frigorífico, el tiempo de almacenamiento es días, si se guarda en el congelador, el tiempo de almacenamiento puede ser meses.

### 2. Procesamiento de muestras

Dependiendo del tubo de recogida y el agente estabilizante, se seleccionan kit(s) de extracción de ARN comercialmente disponible(s) adecuado(s) y se usan según las instrucciones del fabricante.

En este ejemplo, se usan kits de Qiagen que contienen columnas de centrifugación y tampones de lavado para la extracción de ARN.

Se extrae ARN total que incluye microARN usando estos métodos establecidos.

### 3. Transcripción inversa

Para obtener ADN que se pueda amplificar, una reacción de transcripción necesita convertir primero el ARNm en ADNc. Esto se hace mediante la adición de cebadores aleatorios de RT, dNTPs, transcriptasa inversa y tampones de RT en las cantidades apropiadas, seguido por incubación por ciclado térmico como se conoce en la técnica.

De esta forma, el ARN se transcribe de forma inversa en ADN.

### 4. Amplificación

Entonces se puede amplificar el ADNc usando cebadores y/o sondas específicas para los transcritos de interés de los biomarcadores como se ha descrito anteriormente, adecuadamente junto con cebadores y/o sondas específicos para genes de referencia para normalización.

Por comodidad, en este ejemplo, se añaden cebadores y/o sondas para cada citocina en cuestión, controles internos y genes de control endógeno a una mezcla madre junto con el molde de ADNc, y se llevan a cabo reacciones de PCR por triplicado en tanto modo individual como múltiplex usando un instrumento de PCR en tiempo real.

### Referencias:

1. Sutherland JS, de Jong BC, Jeffries DJ, Adetifa IM, Ota MO. Production of TNF- alpha, IL-12(p40) and IL-17 can discriminate between active TB disease and latent infection in a West African cohort. PloS one 2010; 5(8): e12365.

2. W.H.O. Definitions and reporting framework for Tuberculosis – revision de 2013, Ginebra, Suiza. [www.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf) [Accedido el 03 de diciembre de 2014], 2013.

3. Kaufmann SH. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. The Lancet infectious diseases 2011; 11(8): 633-640.

4. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. The Journal of experimental medicine 1993; 178(6): 2249-2254.

5. Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14(6): 467-477.

6. Ota MO, Mendy JF, Donkor S, Togun T, Daramy M, Gomez MP, Chegou NN, Sillah AK, Owolabi O, Kampmann B, Walzl G, Sutherland JS. Rapid diagnosis of tuberculosis using ex vivo host biomarkers in sputum. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 2014; 44(1): 254-257.

7. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, Wright VJ, Banwell CM, Chagaluka G, Crampin AC, Dockrell HM, French N, Hamilton MS, Hibberd ML, Kern F, Langford PR, Ling L, Mlotha R, Ottenhoff TH, Pienaar S, Pillay V, Scott JA, Twahir H, Wilkinson RJ, Coin LJ, Heyderman RS, Levin M, Eley B. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. The New England journal of medicine 2014; 370(18): 1712-1723.

#### Listado de secuencias

>sp|P05231|IL6\_HUMANA Interleucina-6 OS=Homo sapiens GN=IL6 PE=1 SV=1  
MNSFSTSAFGPVAFLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYI  
LDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITG  
LLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLT  
KLOAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

>sp|P18510|IL1RA\_HUMANA Proteína antagonista del receptor de interleucina-1  
OS=Homo sapiens GN=IL1RN PE=1 SV=1  
MEICRGLRSHLITLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQAfRIWDVNQKTFYLRNNQLVAG  
YLOGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSER  
RKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYF  
QEDE

>sp|P18510-2|IL1RA\_HUMANA Isoforma 2 de la proteína antagonista del receptor de  
interleucina-1 OS=Homo sapiens GN=IL1RN  
MALETICRPSGRKSSKMQAfRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLOGPNVNLEEKIDVVPI  
EPHALFLGIHGGKMCSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSERRKQDKRFAFIRSDSGPTT  
SFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

>sp|P18510-3|IL1RA\_HUMANA Isoforma 3 de la proteína antagonista del receptor de  
interleucina-1 OS=Homo sapiens GN=IL1RN  
MALADLYEEGGGGGGEGEDNADSKETICRPSGRKSSKMQAfRIWDVNQKTFYLRNN  
QLVAGYLOGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCSCVKSGDETRLQLEAVNIT  
DLSERRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMV  
TKFYFQEDE

>sp|P18510-4|IL1RA\_HUMANA Isoforma 4 de la proteína antagonista del receptor de  
interleucina-1 OS=Homo sapiens GN=IL1RN  
MQAfRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLOGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMC  
LSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSERRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAM  
EADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

>sp|P13232|IL7\_HUMANA Interleucina-7 OS=Homo sapiens GN=IL7 PE=1 SV=1  
MFHVVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNC  
LNNEFNFFKRHICDANKVKGKPAALGQAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLOEIKTCWNKILMG  
TKEH

>sp|P13232-2|IL7\_HUMANA Isoforma 2 de interleucina-7 OS=Homo sapiens GN=IL7  
MFHVVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNC  
LNNEFNFFKRHICDANKVKGKPAALGQAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLOEIKTCWNKILMG  
TKEH

>sp|P13232-3|IL7\_HUMANA Isoforma 3 de interleucina-7 OS=Homo sapiens GN=IL7  
MKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKVKGKPAALGQAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLOEIKTCWNKIL  
MG TKEH

>sp | P10145 | IL8\_HUMANA Interleucina-8 OS=Homo sapiens GN=CXCL8 PE=1 SV=1  
MTSKLAVALLAAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPH  
CANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS

>sp | P10145-2 | IL8\_HUMANA Isoforma 2 de interleucina-8 OS=Homo sapiens GN=CXCL8  
MTSKLAVALLAAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPH  
CANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVEKAEPENRGMDS

>sp | P29460 | IL12B\_HUMANA Subunidad beta de interleucina-12 OS=Homo sapiens  
GN=IL12B PE=1 SV=1  
MCHQQLVISWFSVLFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDG  
ITWTLDDQSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTD  
ILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA  
TLAERVRGDNKEYEYSVECCQEDSACPAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI  
KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF  
TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

FGF-básico; P09038; *FGF2*

MVGVGGGDVE DVTPRPGGCQ | SGRGARGCN GIPGAAAWEA ALPRRRPRRH  
PSVNPRSRAA GSPTRGRRT EERPSGSRLG DRGRGRALPG GRLGGRGRGR  
APERVGGRGR GRGTAAPRAA PAARGSRPGP AGTMAAGSIT TLPALPEDGG  
SGAFPPGHFK DPKRLYCKNG GFFLRIHPDG RVDGVREKSD PHIKLQLQAE  
ERGVVSIKGV CANRYLAMKE DGRLLASKCV TDECEFFERL ESNNYNTYRS  
RKYTSWYVAL KRTGQYKLGS KTGPQKAIL FLPM SAKS

>sp | P02778 | CXL10\_HUMANA Quimiocina 10 de motivo C-X-C OS=Homo sapiens  
GN=CXCL10 PE=1 SV=2  
MNQTAILICCLIFLTLSGIQGVPLSRTVRCTCISINQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEI  
ATMKKKGEKRCLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP

>sp | P15692 | VEGFA\_HUMANO Factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo  
sapiens GN=VEGFA PE=1 SV=2  
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
ETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
QHI GEM SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVVVGAR  
CCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRC  
DKPRR

5

>sp | P15692-2 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF189 del factor de crecimiento  
endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
ETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
QHI GEM SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPC  
SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRC DKPRR

>sp | P15692-3 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF183 del factor de crecimiento  
endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
ETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
QHI GEM SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPC  
SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRC DKPRR

>sp | P15692-4 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF165 del factor de crecimiento  
endotelial vascular OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
ETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
QHI GEM SFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSR  
CKARQLELNERTCRC DKPRR

>sp | P15692-5 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF148 del factor de crecimiento endotelial A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
 ETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
 QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQOTCKCSCKNTDSR  
 CKM

>sp | P15692-6 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF145 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
 ETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
 QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVCDKPR  
 R

>sp | P15692-8 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF165B del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
 ETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
 QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQOTCKCSCKNTDSR  
 CKARQLELNERTCRSLTRKD

>sp | P15692-9 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF121 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
 ETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
 QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR

5

>sp | P15692-10 | VEGFA\_HUMANO Isoforma VEGF111 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPI  
 ETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG  
 QHIGEMSFLQHNKCECRCDKPRR

>sp | P15692-11 | VEGFA\_HUMANO Isoforma L-VEGF165 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MTDRTQDTAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
 LLGCSRFGGAVVRAGEAEPGGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGAR  
 KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
 AGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
 VYQRSYCHPIETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
 QIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQOT  
 CKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

>sp | P15692-12 | VEGFA\_HUMANO Isoforma L-VEGF121 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MTDRTQDTAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
 LLGCSRFGGAVVRAGEAEPGGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGAR  
 KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
 AGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
 VYQRSYCHPIETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
 QIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR

>sp | P15692-13 | VEGFA\_HUMANO Isoforma L-VEGF189 del factor de crecimiento endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
 MTDRTQDTAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
 LLGCSRFGGAVVRAGEAEPGGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGAR  
 KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
 AGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
 VYQRSYCHPIETLVDFIQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
 QIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRY  
 KSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQOTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

>sp | P15692-14 | VEGFA\_HUMANO Isoforma L-VEGF206 del factor de crecimiento  
endotelial vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
LLGCSRFGGAVVRAGEAEPSCGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEEEERGPQWRLGAR  
KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
AGPGRASETMNFFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
VYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
QIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRY  
KWSVYVGAROC LMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQ  
LELNERTCRCDKPRR

>sp | P15692-15 | VEGFA\_HUMANO Isoforma 15 del factor de crecimiento endotelial  
vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
LLGCSRFGGAVVRAGEAEPSCGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEEEERGPQWRLGAR  
KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
AGPGRASETMNFFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
VYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
QIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQT  
CKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRSLTRKD

>sp | P15692-16 | VEGFA\_HUMANO Isoforma 16 del factor de crecimiento endotelial  
vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
LLGCSRFGGAVVRAGEAEPSCGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEEEERGPQWRLGAR  
KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
AGPGRASETMNFFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
VYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
QIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRY  
CGPCSEERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

>sp | P15692-17 | VEGFA\_HUMANO Isoforma 17 del factor de crecimiento endotelial  
vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
LLGCSRFGGAVVRAGEAEPSCGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEEEERGPQWRLGAR  
KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
AGPGRASETMNFFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
VYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
QIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQT  
CKCSCKNTDSRCKM

>sp | P15692-18 | VEGFA\_HUMANO Isoforma 18 del factor de crecimiento endotelial  
vascular A OS=Homo sapiens GN=VEGFA  
MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQ  
LLGCSRFGGAVVRAGEAEPSCGAARSASSGREEPQPEEGEEEEEEEEERGPQWRLGAR  
KPGSWTGEAAVCADSAPAAAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASR  
AGPGRASETMNFFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMD  
VYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITM  
QIMRIKPHQGQHI GEMSFLQHNKCECRCDKPRR

5

Listado de secuencias

<110> Medical Research Council

Imperial Innovations Limited

<120 > BIOMARCADORES DE TB

5 <130> P10280GBWO

<150> 1602305.3

<151> 02-09-2016

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro  
20 25 30

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

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile  
50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser  
65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
130 135 140

15 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
145 150 155 160

# ES 2 805 056 T3

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Leu Arg Gln Met  
210

<210> 2

<211> 177

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser  
20 25 30

Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe  
35 40 45

Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn  
50 55 60

Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala  
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys  
85 90 95

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

Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser  
115 120 125

Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp  
130 135 140

Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn  
145 150 155 160

Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp  
165 170 175

Glu

<210> 3

10 <211> 159

# ES 2 805 056 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
 20          25          30

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
 35          40          45

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

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
 65          70          75          80

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
 85          90          95

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
100          105          110

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
115          120          125

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro
130          135          140

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
145          150          155

```

5 <210> 4

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

10 Met Ala Leu Ala Asp Leu Tyr Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Glu

ES 2 805 056 T3

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

<210> 5

$\langle 211 \rangle$  143

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu  
1 5 10 15

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn  
20 25 30

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe

# ES 2 805 056 T3

35

40

45

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly  
50 55 60

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser  
65 70 75 80

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser  
85 90 95

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu  
100 105 110

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro  
115 120 125

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu  
130 135 140

<210> 6

<211> 177

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile  
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys  
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu  
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe  
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe  
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser  
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr  
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala

# ES 2 805 056 T3

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |

His

<210> 7

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile |     |
| 1                                                               | 5   |
| Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys |     |
| 20                                                              | 25  |
| Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu |     |
| 35                                                              | 40  |
| Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe |     |
| 50                                                              | 55  |
| Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Val Lys Gly Arg |     |
| 65                                                              | 70  |
| Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu |     |
| 85                                                              | 90  |
| Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu |     |
| 100                                                             | 105 |
| Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met |     |
| 115                                                             | 120 |
| Gly Thr Lys Glu His                                             |     |
| 130                                                             |     |

<210> 8

<211> 64

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 8

# ES 2 805 056 T3

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

Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys  
20 25 30

Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln  
35 40 45

Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His  
50 55 60

<210> 9

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu  
20 25 30

Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe  
35 40 45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr  
50 55 60

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

Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala  
85 90 95

Glu Asn Ser

<210> 10

<211> 102

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 10

# ES 2 805 056 T3

```

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser
1          5          10          15

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu
          20          25          30

Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe
          35          40          45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr
          50          55          60

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

Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Ala Glu Val Pro Glu
          85          90          95

Asn Arg Gly Met Asp Ser
          100

```

<210> 11

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

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

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
          20          25          30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
          35          40          45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
          50          55          60

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

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
          85          90          95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
          100          105          110

```

# ES 2 805 056 T3

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe  
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp  
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg  
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser  
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu  
180 185 190

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

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr  
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn  
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp  
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr  
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg  
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala  
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser  
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser  
325

<210> 12

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

# ES 2 805 056 T3

Met Val Gly Val Gly Gly Gly Asp Val Glu Asp Val Thr Pro Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Cys Gln Ile Ser Gly Arg Gly Ala Arg Gly Cys Asn Gly Ile  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ala Ala Trp Glu Ala Ala Leu Pro Arg Arg Arg Pro Arg  
 35 40 45  
 Arg His Pro Ser Val Asn Pro Arg Ser Arg Ala Ala Gly Ser Pro Arg  
 50 55 60  
 Thr Arg Gly Arg Arg Thr Glu Glu Arg Pro Ser Gly Ser Arg Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Gly Arg Gly Arg Ala Leu Pro Gly Gly Arg Leu Gly Gly Arg  
 85 90 95  
 Gly Arg Gly Arg Ala Pro Glu Arg Val Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 100 105 110  
 Gly Thr Ala Ala Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Arg Gly Ser Arg Pro  
 115 120 125  
 Gly Pro Ala Gly Thr Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala  
 130 135 140  
 Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile  
 165 170 175  
 His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His  
 180 185 190  
 Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys  
 195 200 205  
 Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu  
 210 215 220  
 Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp  
 245 250 255  
 Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr  
 260 265 270  
 Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser  
 275 280 285

<210> 13

<211> 98

# ES 2 805 056 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu
 1          5          10          15

Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys
          20          25          30

Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu
          35          40          45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
          50          55          60

Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
65          70          75          80

Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg
          85          90          95

Ser Pro

```

5

<210> 14

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
          20          25          30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
          35          40          45

```

10

# ES 2 805 056 T3

```

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50                      55                      60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
                        85                      90                      95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
                        100                    105                    110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
                        115                    120                    125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130                    135                    140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145                    150                    155                    160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
                        165                    170                    175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
                        180                    185                    190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195                    200                    205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210                    215                    220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225                    230

```

<210> 15

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1                      5                      10                      15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
                20                25                30

```

# ES 2 805 056 T3

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

<210> 16

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
 20 25 30

# ES 2 805 056 T3

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val  
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Pro  
145 150 155 160

Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro  
165 170 175

Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala  
180 185 190

Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg  
195 200 205

Arg

<210> 17

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

# ES 2 805 056 T3

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
130 135 140

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

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln  
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
180 185 190

<210> 18

<211> 174

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

# ES 2 805 056 T3

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
130 135 140

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

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Met  
165 170

<210> 19

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

# ES 2 805 056 T3

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val  
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr  
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
165 170

<210> 20

<211> 191

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
130 135 140

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

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln  
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Ser Leu Thr Arg Lys Asp  
180 185 190

<210> 21

# ES 2 805 056 T3

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
          20          25          30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
          35          40          45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50          55          60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
          85          90          95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
          100          105          110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
          115          120          125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Cys Asp Lys
          130          135          140

Pro Arg Arg
145

```

5

<210> 22

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

10

# ES 2 805 056 T3

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly  
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

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

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
130 135

<210> 23

<211> 371

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln  
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg  
35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe  
50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala  
65 70 75 80

# ES 2 805 056 T3

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu  
 85 90 95  
 Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly  
 100 105 110  
 Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp  
 115 120 125  
 Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly  
 130 135 140  
 Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro  
 145 150 155 160  
 His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg  
 165 170 175  
 Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu  
 180 185 190  
 Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro  
 195 200 205  
 Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met  
 210 215 220  
 Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
 245 250 255  
 Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu  
 260 265 270  
 Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg  
 275 280 285  
 Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln  
 290 295 300  
 His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln  
 325 330 335  
 Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys  
 340 345 350  
 Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys  
 355 360 365  
 Pro Arg Arg  
 370

# ES 2 805 056 T3

<210> 24

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 24

```

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
          20              25              30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
          35              40              45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
 50              55              60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
65              70              75              80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
          85              90              95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
          100              105              110

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp
          115              120              125

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
          130              135              140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
145              150              155              160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
          165              170              175

```

# ES 2 805 056 T3

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu  
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro  
195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met  
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp  
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
245 250 255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu  
260 265 270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg  
275 280 285

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

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu  
305 310 315 320

Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
325

<210> 25

<211> 395

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln  
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg  
35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe  
50 55 60

# ES 2 805 056 T3

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

# ES 2 805 056 T3

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys  
325 330 335

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu  
340 345 350

Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser  
355 360 365

Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn  
370 375 380

Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
385 390 395

<210> 26

<211> 412

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln  
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg  
35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe  
50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu  
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly  
100 105 110

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp  
115 120 125

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly  
130 135 140

# ES 2 805 056 T3

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

<210> 27

<211> 371

<212> PRT

# ES 2 805 056 T3

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
          20          25          30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
          35          40          45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
 50          55          60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
65          70          75          80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
          85          90          95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
          100          105          110

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp
          115          120          125

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
          130          135          140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
145          150          155          160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
          165          170          175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
          180          185          190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro

```

# ES 2 805 056 T3

195

200

205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met  
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp  
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
245 250 255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu  
260 265 270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg  
275 280 285

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

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu  
305 310 315 320

Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln  
325 330 335

Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys  
340 345 350

Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Ser Leu Thr  
355 360 365

Arg Lys Asp  
370

<210> 28

<211> 389

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln  
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

ES 2 805 056 T3

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

# ES 2 805 056 T3

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

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu  
305 310 315 320

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys  
325 330 335

Lys Ser Arg Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe  
340 345 350

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser  
355 360 365

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys  
370 375 380

Asp Lys Pro Arg Arg  
385

<210> 29

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

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

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln  
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg  
35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe  
50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala  
65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu  
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly  
100 105 110

# ES 2 805 056 T3

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp  
115 120 125

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly  
130 135 140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro  
145 150 155 160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg  
165 170 175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu  
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro  
195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met  
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp  
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
245 250 255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu  
260 265 270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg  
275 280 285

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

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu  
305 310 315 320

Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln  
325 330 335

Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys  
340 345 350

Lys Met

<210> 30

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

# ES 2 805 056 T3

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

# ES 2 805 056 T3

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp  
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
245 250 255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu  
260 265 270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg  
275 280 285

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

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
305 310 315

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el diagnóstico de TB en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una muestra de dicho sujeto, siendo dicha muestra seleccionada del grupo que consiste en: sangre, suero y plasma;

5 (b) determinar la concentración en dicha muestra de los siguientes biomarcadores: IL-1ra, IL6, IL-7, IL-8, IL-12p70, FGF-básico, IP-10 y VEGF;

(c) convertir cada concentración de biomarcador determinada en (b) en un valor de decil; y

(d) convertir cada valor de decil en una presencia o ausencia binaria comparando los valores de decil de (c) con los siguientes valores de corte de cuantil específico:

| <b>Biomarcador</b> | <b>Valor de corte de cuantil específico</b> |
|--------------------|---------------------------------------------|
| IL-1ra             | 3                                           |
| IL6                | 6                                           |
| IL-7               | 8                                           |
| IL-8               | 9                                           |
| IL-12p70           | 9                                           |
| FGF-básico         | 3                                           |
| IP-10              | 4                                           |
| VEGF               | 9                                           |

10 en donde un valor de decil que se corresponde con o supera el valor de corte de cuantil específico se convierte en la presencia binaria del biomarcador, y un valor de decil inferior al valor de corte de cuantil específico se convierte en la ausencia binaria del biomarcador;

en donde detectar la presencia de cada uno de dichos biomarcadores indica que el sujeto tiene TB.

15 2. Un método según la reivindicación 1, en donde la etapa (c) convertir cada concentración determinada en (b) en un valor de decil comprende las etapas de:

(ci) comparar la concentración de cada biomarcador determinada en (b) con una distribución de frecuencia de referencia de concentraciones de dicho biomarcador; y

(cii) leer el valor de decil de la distribución de frecuencia para la concentración de dicho biomarcador.

20 3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde determinar la concentración de cada biomarcador comprende:

(bi) detección poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de unirse específicamente al biomarcador; y

(bii) cuantificación de dicha unión.

25 4. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde determinar la concentración de cada biomarcador comprende la detección del ARNm para el biomarcador, en donde la detección del ARNm comprende:

(bi) poner en contacto la muestra con sonda(s) de ácidos nucleicos o cebador(es) específico(s) para el biomarcador; y

(bii) cuantificación de dicha(s) sonda(s) o cebador(es).

30 5. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha muestra es una muestra de suero o plasma.

6. Un método según la reivindicación 5, en donde dicho suero o plasma está esencialmente libre de células.

7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto tiene 16 años o menos.

8. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto tiene 15 años o menos.
9. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto tiene 2 años o más.
10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto tiene 5 años o más.
11. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto tiene 5 a 15 años.
- 5 12. Un método según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho método comprende además determinar la concentración en dicha muestra de biomarcador VEGF estimulado con EC (valor de corte de cuantil específico 2).
- 10 13. Un proceso de selección de un régimen de tratamiento, comprendiendo dicho proceso llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde si se determina que el sujeto tiene TB, entonces se selecciona un régimen de tratamiento de 2HRZE/4HR (2 meses HRZE seguido por 4 meses HR en donde H = isoniazida, R = rifampicina, Z = pirazínamida, E = etambutol).
14. Un aparato que comprende lógica configurada para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. Un producto de programa informático operable, cuando se ejecuta en un ordenador, para realizar las etapas del método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

FIGURA 1

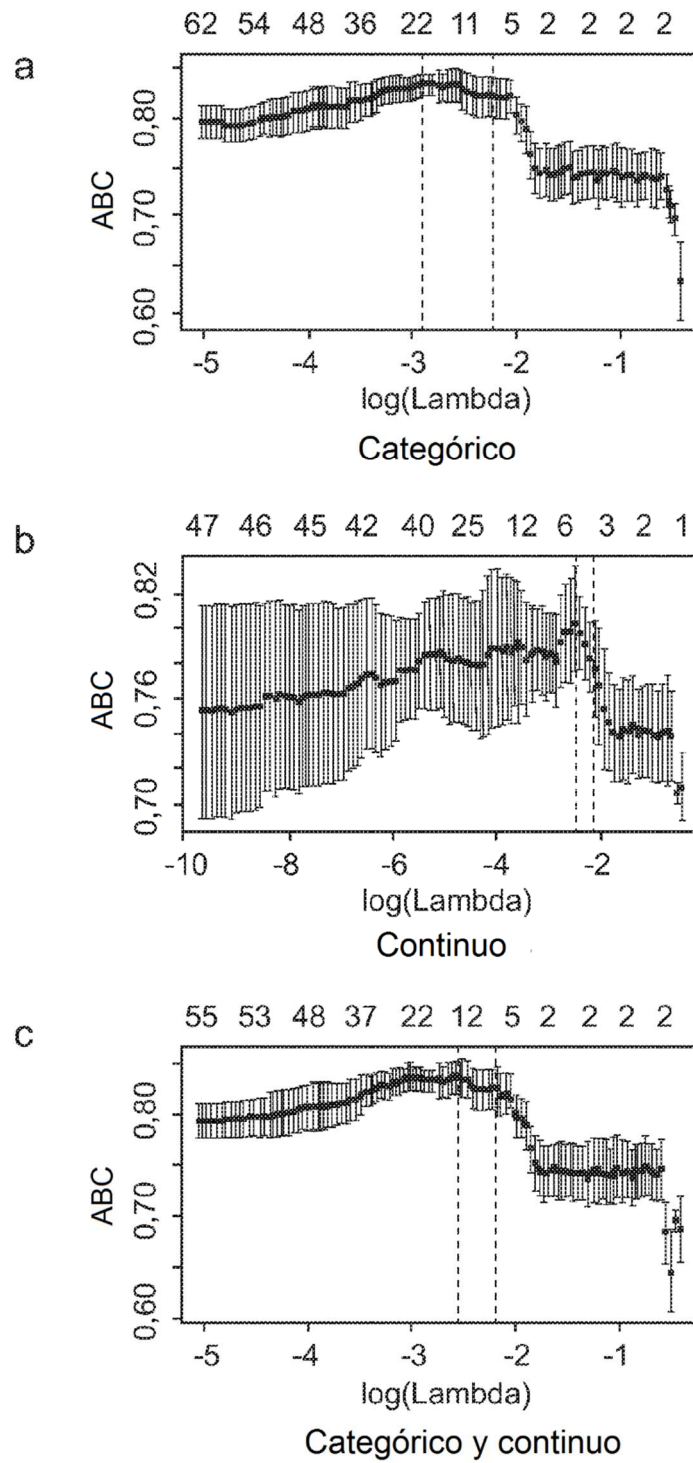


FIGURA 1 continuación

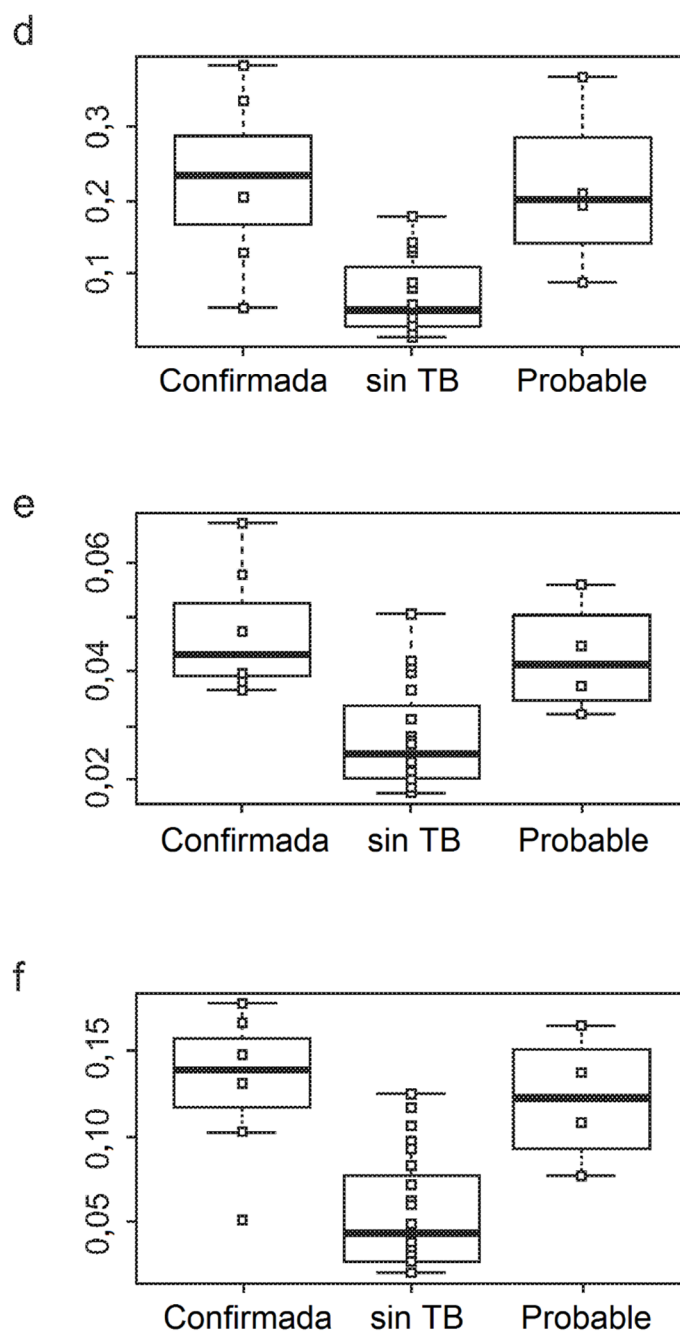


FIGURA 1 continuación

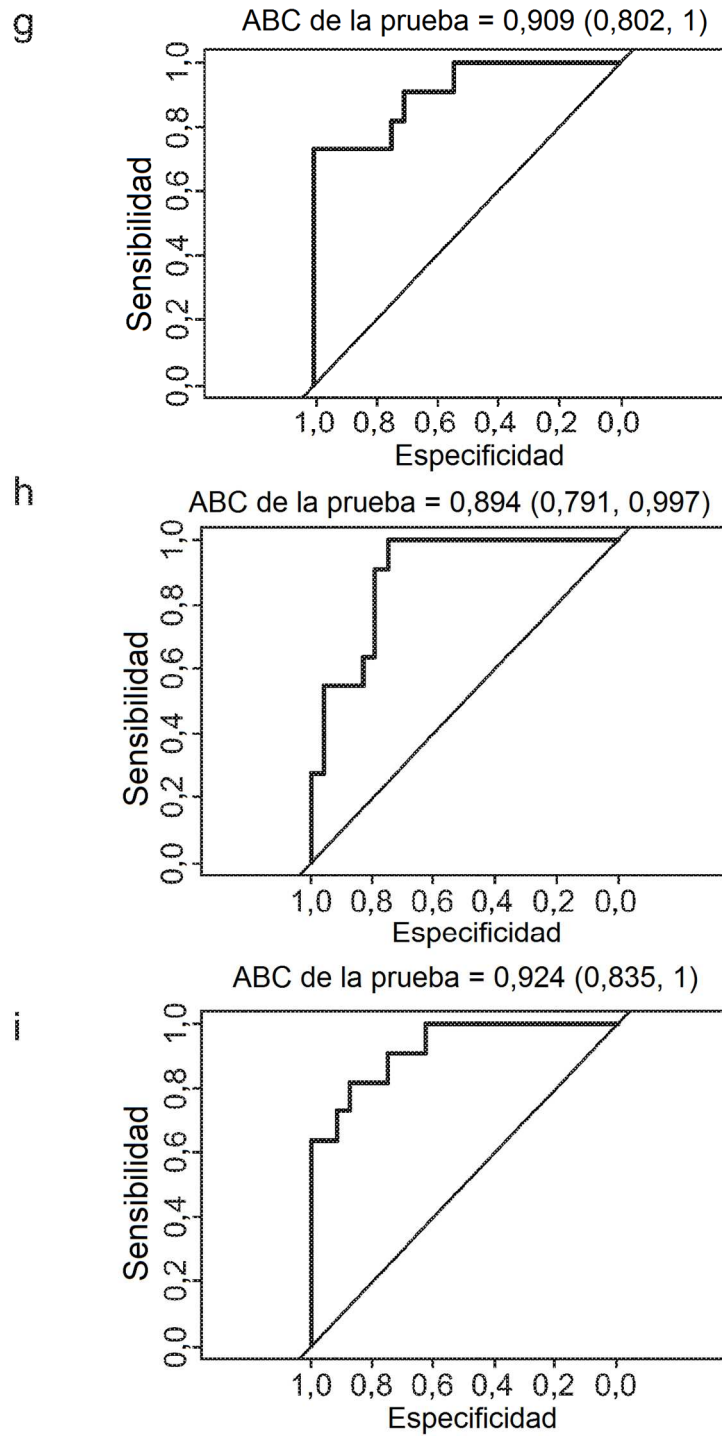


FIGURA 2

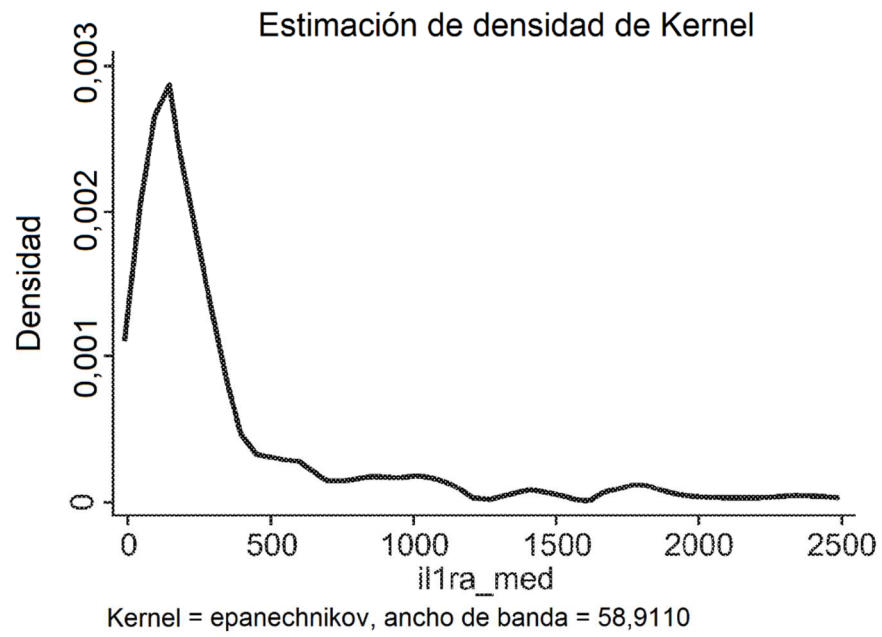


FIGURA 3

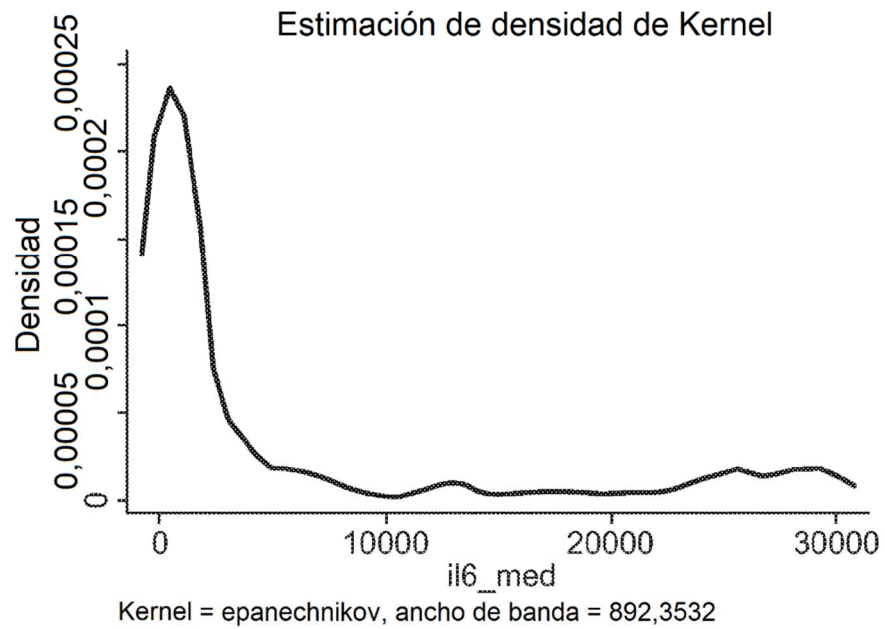


FIGURA 4

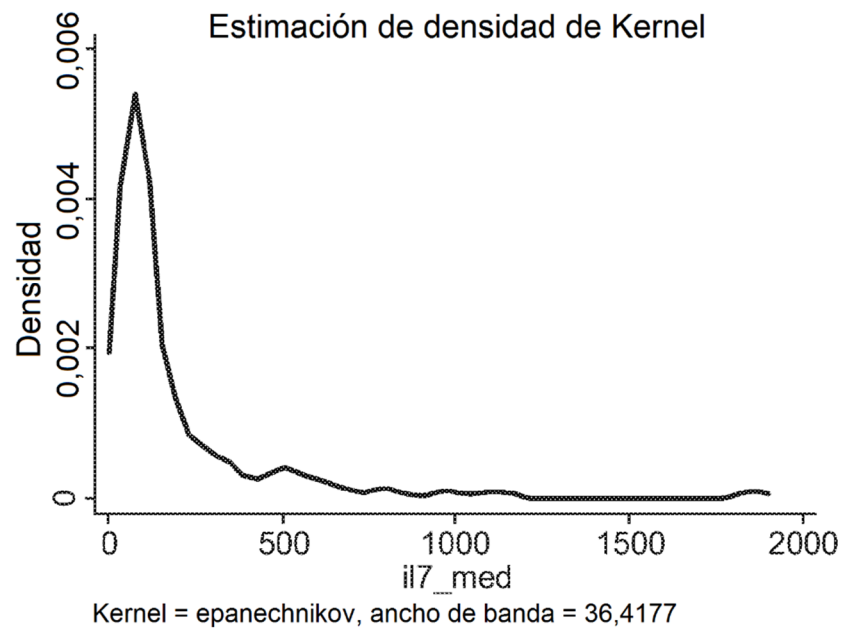


FIGURA 5

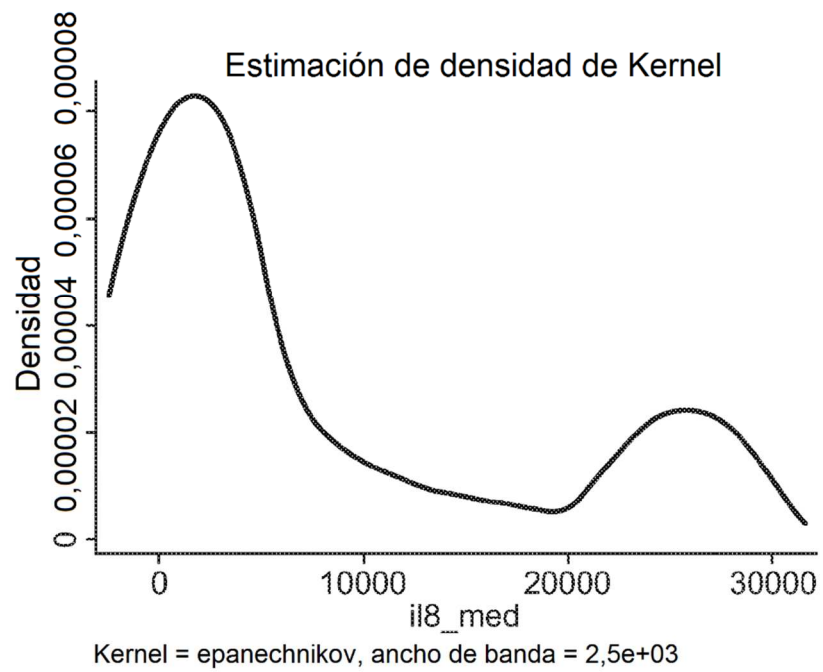


FIGURA 6

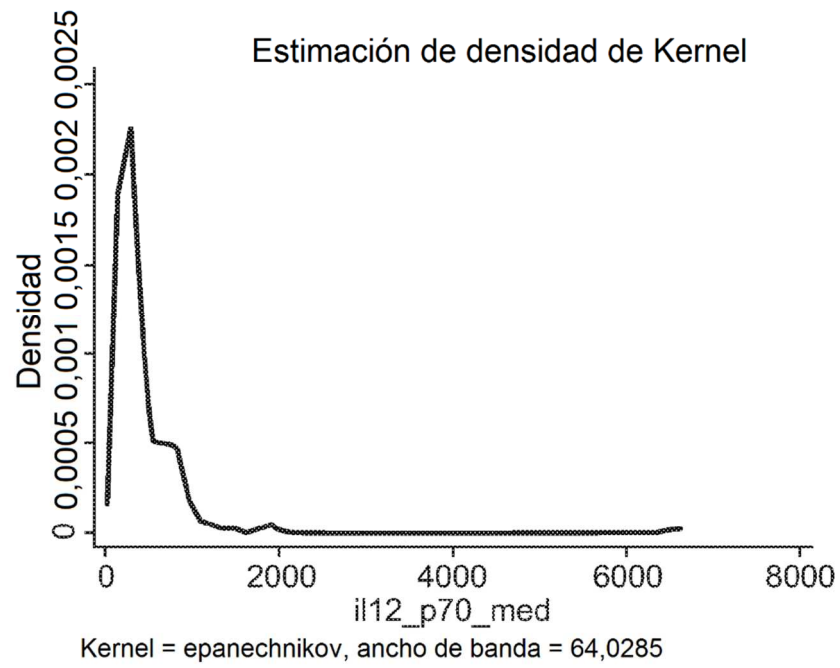


FIGURA 7

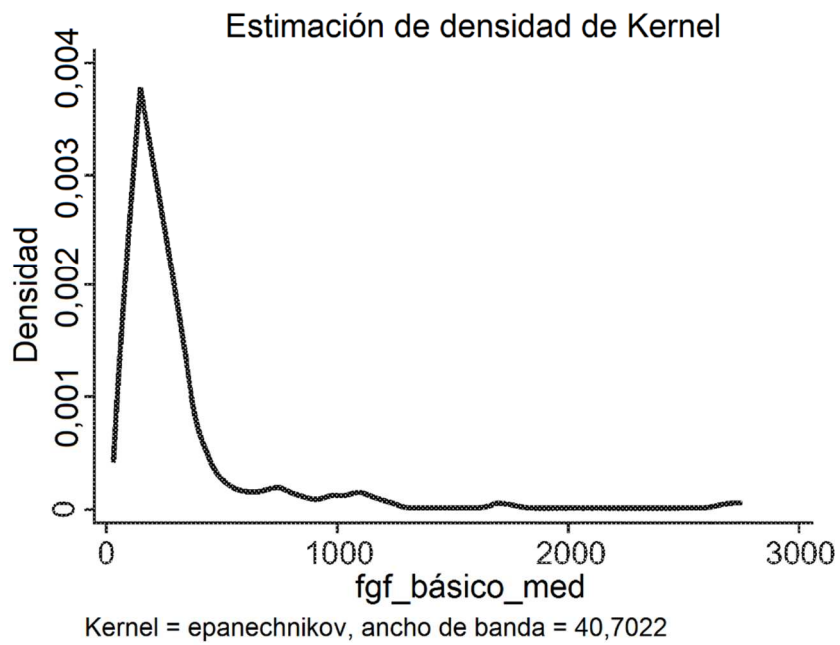


FIGURA 8

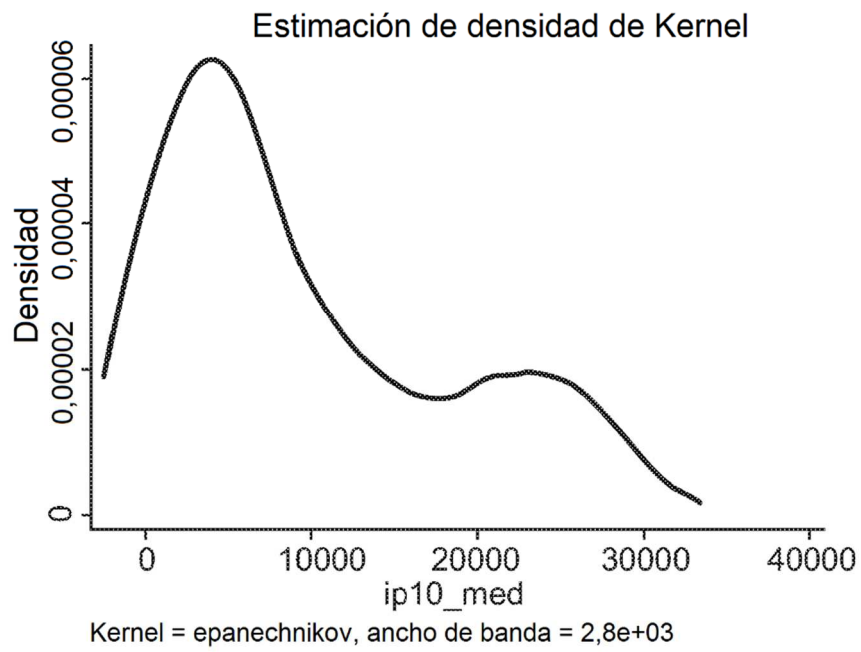


FIGURA 9

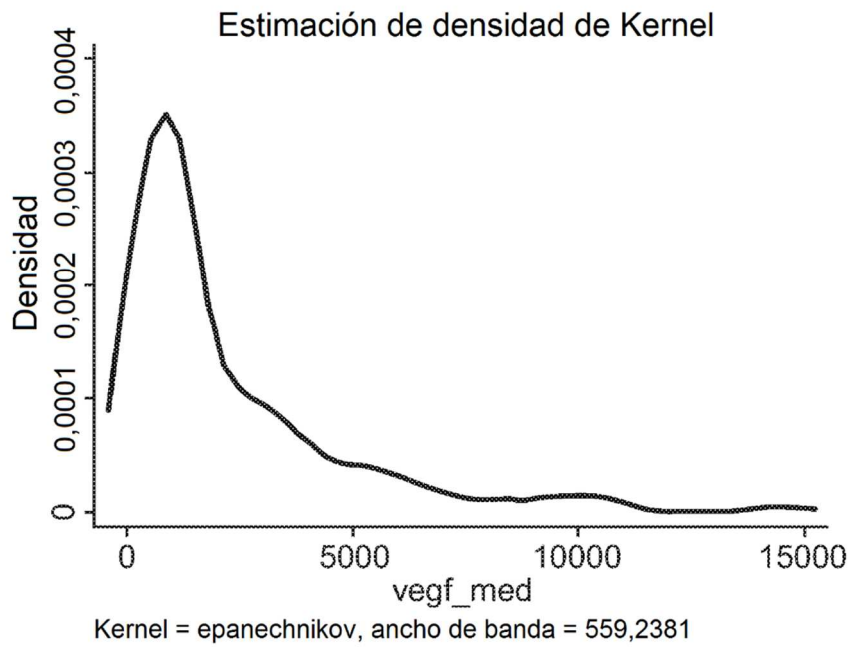


FIGURA 10

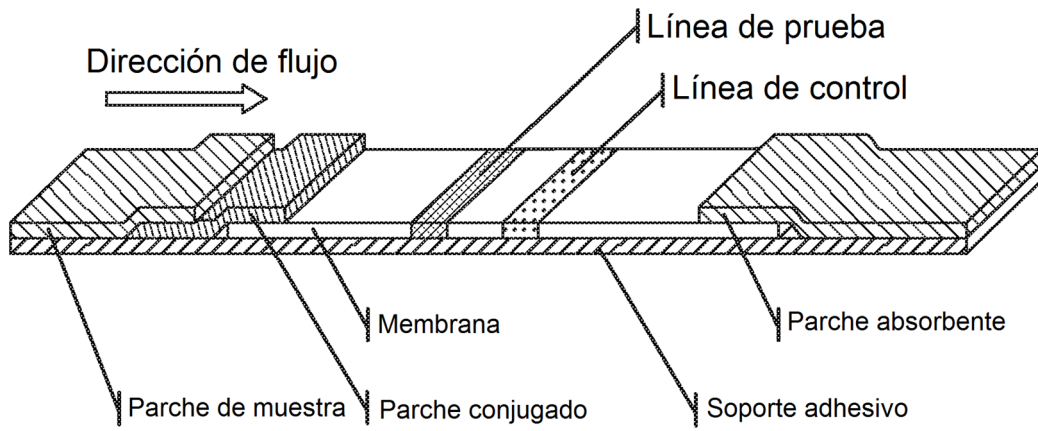


FIGURA 11

