



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 324**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05254121 .6**

(96) Fecha de presentación : **30.06.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1614692**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

(54) Título: **ME-5, ME-2 y EPP2: antígenos de proteína humana reactivos con anticuerpos presentes en el suero de mujeres que padecen de endometriosis.**

(30) Prioridad: **07.07.2004 US 887540**

(73) Titular/es: **Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591-5098, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2009

(72) Inventor/es: **Said El Shami, A;
Campbell, Bruce;
Sustarsic, Dennis y
Sahakian, Niver**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2009

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

ME-5, ME-2, y EPP2: antígenos de proteína humana reactivos con anticuerpos presentes en el suero de mujeres que padecen de endometriosis.

5

Antecedentes de la invención

La endometriosis es un trastorno reproductivo de las mujeres caracterizado por la presencia de tejido endometrial por fuera de su ubicación normal en el útero. Más frecuentemente, el tejido endometrial está presente en la cavidad peritoneal, uniéndose a diferentes tejidos y órganos en esta posición. La endometriosis es una enfermedad benigna que afecta aproximadamente a 5 millones de mujeres al año en los Estados Unidos con una prevalencia de 10 a 15 por ciento en mujeres en edad reproductiva. La incidencia se incrementa hasta un 60 a 80 por ciento de mujeres que son infértilles o que presentan dolor pélvico (D. Gosselin y colaboradores [1999] *Curr. Opin. Onco. Endo. & Metabol. Invest. Drugs* 1: 31). Las condiciones que predisponen a un individuo a la endometriosis son aún desconocidas. Diferentes reportes autorizados sugieren que la menstruación retrógrada puede ser un factor contribuyente clave, pero se piensa que este proceso es común en la mayoría de las mujeres. Esta teoría también ha sido cuestionada recientemente (D. B. Redwine [2002] *Fertil. Steril.* 78: 686) debido principalmente a las diferencias sustanciales que se presentan entre endometrio normal o eutópico y el tejido ectópico encontrado en pacientes enfermas. En consecuencia, se piensa que otros factores genéticos así como inmunológicos contribuyen de manera fundamental al desarrollo de la enfermedad en mujeres susceptibles. Por ejemplo, se piensa que la endometriosis es mucho más frecuente en parientes en primer grado de consanguinidad de mujeres afectadas cuando se hace una comparación con el resto de la población (Coxhead y Thomas [1993] *J. Obstet. Gynaecol. Br. Common.* 13: 42). Además de la frecuencia, se ha reportado que la enfermedad es más severa en mujeres con una familiar con endometriosis en primer grado de consanguinidad (Thomas y Campbell [2000] *Gynaecol. Obstet. Invest.* 50: 2). El (Los) gen(es) preciso(s) involucrado(s) en el trastorno es (son) desconocido(s) pero se sospecha fuertemente que el patrón es de naturaleza materna.

Aunque no corre peligro la vida, la endometriosis produce molestias abdominales importantes, y puede provocar infertilidad. En realidad, tales síntomas pueden ser indicativos de otros trastornos de salud femeninos y esto convierte al diagnóstico de la endometriosis en un hecho clínicamente retador. Esto fue enfatizado en un estudio reciente de los efectos del diagnóstico tardío de la endometriosis (G. K. Husby y colaboradores *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 82: 649). Estos investigadores reportaron demoras entre 3 y 11 años entre el inicio del dolor y el diagnóstico final de la endometriosis. En este estudio, las mujeres que reportaron tanto infertilidad como dolor no tuvieron una demora significativamente menor en el diagnóstico. Obviamente tales demoras junto con los síntomas reportados condujeron al gasto considerable de recursos tanto económicos como sicológicos.

35

Actualmente se considera que la laparoscopía quirúrgica es el estándar de oro para el diagnóstico de la endometriosis. Durante la laparoscopía se pone en evidencia visualmente la enfermedad utilizando un sistema de puntuación a partir de la fase I (enfermedad mínima, 1 a 5 puntos) hasta la fase IV (enfermedad severa, > 40 puntos). Se asignan los puntos de acuerdo con diferentes parámetros tales como ubicación, tamaño, y profundidad de las lesiones (superficiales versus profundas) (T. P. Canavan y L. Radosh [2000] *Postgrad. Med.* 107: 213). Algunas opiniones revelan que los daños potenciales con el procedimiento, y laparoscopias frecuentes no conducen a un diagnóstico definitivo de la enfermedad (S. Pillai y colaboradores [1996] *Am. J. Reprod. Immunol.* 35: 483). Por ejemplo, aunque la laparoscopía no está clasificada como una cirugía mayor, de todas maneras tiene diferentes características (es invasiva, costosa, requiere de anestesia, y de instalaciones completas para operación) que juntas hacen que el proceso sea por lo menos una escogencia infeliz para el diagnóstico. En realidad, aunque la endometriosis no sea un trastorno fatal, la laparoscopía en sí misma si puede poner en riesgo la vida de la paciente. Se ha reportado que el procedimiento a través del abdomen es responsable del 50% de las complicaciones de este procedimiento, y las lesiones a los principales vasos sanguíneos pueden provocar la muerte en un 15% de los casos (I. A. Brosens y J. J. Brosens [2000] *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 88: 117). Otros reclamos son que la evaluación visual de la enfermedad no se correlaciona con el grado de infertilidad o la severidad o la cantidad de síntomas (T. P. Canavan y L. Radosh [2000] *Postgrad. Med.* 107: 213). Se ha reportado que el sitio de la laparoscopía en el diagnóstico de la endometriosis debe ser reevaluado. (I. A. Brosens y J. J. Brosens [2000] *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 88: 117). La razón de esto se debe en parte a la sugerencia hecha por algunos (P. R. Koninckx [1994] *Hum. Reprod.* 9: 2202) de que la endometriosis suave no es para nada una enfermedad y que todas las mujeres tienen endometriosis. Además, como se observó anteriormente, existen aspectos funcionales (por ejemplo, infertilidad, dolor abdominal, etc.) para fases diferentes a la de la enfermedad suave y estas están siendo más comúnmente aplicadas al diagnóstico. En consecuencia, se ha propuesto que el "estándar de oro" tradicional sea reemplazado con una combinación de hidrolaparoscopía transvaginal (THL, un procedimiento algo más suave) e imagenología de resonancia magnética (MR) hasta que los marcadores bioquímicos hayan sido identificados adecuadamente (I. A. Brosens y J. J. Brosens *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 88: 117).

60

La frecuencia de la endometriosis y la dificultad en el diagnóstico del trastorno representan ambos una justificación suficiente para experimentos diseñados para identificar estos marcadores bioquímicos con base en el suero. Otros programas en fase de descubrimiento han dado a entender que pueden existir marcadores potenciales de la enfermedad endometrial. Por ejemplo, se ha reportado que los niveles del antígeno CA-125 derivado de epitelio de ovario se elevan en suero, en fluido peritoneal, y en fluido menstrual de pacientes con endometriosis (B. Mol y colaboradores [1998] *Fertil. Steril.* 70: 1101). El marcador exhibió buena especificidad, pero la sensibilidad es pobre con altos niveles presentes en pacientes afectados con PID, cáncer de ovario, o carcinoma cervical. A pesar de las limitaciones, se puede utilizar el marcador para pacientes que probablemente tengan la enfermedad para una orientación más rápida

hacia la laparoscopia, ya que los niveles de CA-125 se correlacionan en alguna medida con el grado de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (T.P. Canavan y L. Radosh [2000] Postgrad. Med. 107: 213).

5 También, Sharpe-Timms y colaboradores (Biol. Reprod. [1998] 58: 988) han reportado que las lesiones de la endometriosis segregan una proteína del tipo haptoglobina en un sistema modelo de roedor. La haptoglobina fue específicamente sintetizada por tejido de endometriosis y no fue encontrada en tejido uterino utilizando una técnica de PCR sensible a la transcriptasa inversa. Este antígeno es también interesante ya que e ha reportado que modula las funciones inmunes de la célula y podría contribuir a la patofisiología de la endometriosis.

10 A lo largo de líneas ligeramente diferentes, D. Gosselin y colaboradores (Curr. Opin. Oncol. Endo. Metabol. Inv. Drugs [1999] 1: 31) reportaron un algoritmo de diagnóstico que emplea varias combinaciones diferentes de marcadores de leucocitos presentes en subconjuntos de células T y B, macrófagos, y células NK en sangre periférica y endometrio de pacientes con endometriosis. Esto constituyó la base para el desarrollo de una prueba de diagnóstico (Prueba Metrio) por parte de PROCREA BioSciences, Inc. que está aprobada por Health Canada. La Prueba Metrio está basada en la 15 evaluación de ocho subconjuntos propios de leucocitos por medio de análisis de citometría de flujo combinada con un marcador bioquímico de sangre evaluado por ELISA (J. Brosens y colaboradores Obstet. Gynecol. Clin. North Am. [2003] 30: 95-114). Esta prueba según se informa tiene una tasa de especificidad del 95% y una tasa de sensibilidad del 61%.

20 P. Vigano y colaboradores (Obstet. Gynecol. [2000] 95: 115-118) reportan que la forma soluble de la molécula 1 de adhesión intercelular es liberada por endometrio uterino y tal liberación se correlaciona con el grado (número de implantes) de endometriosis en las pacientes. Los autores sugieren que la molécula soluble 1 de adhesión intercelular puede ser valiosa en la evaluación del potencial de propagación de endometrio de reflujo. Sin embargo, la molécula soluble 1 de adhesión intercelular es también conocida por ser liberada en otros estados enfermizos de tal manera que 25 el valor potencial como marcadora se puede ver algo disminuida.

30 J. Mahnke y colaboradores (Fertil. Steril. [2000] 73: 166-170) evaluaron los niveles de VEGF y de IL-6 en fluido peritoneal de mujeres con endometriosis y encontraron que estos eran elevados en pacientes con enfermedad avanzada. Los niveles de VEGF y de IL-6 fueron menores en mujeres normales y en pacientes con enfermedad más suave. Sin embargo, el valor de diagnóstico de estos marcadores es sospechoso ya que al menos VEGF se sabe que es un potente factor de angiogénesis que está regulado por hipoxia en endometrio normal (A. M. Sharkey y colaboradores, J. Clin. Endocrinol. Metab. [2000] 85: 402-409).

35 Matalliotakis y colaboradores (Obstet. Gynecol. [2000] 95: 810-813) encontraron niveles elevados de CD23 soluble en suero de mujeres con endometriosis cuando se los comparó con una población de control. Los niveles de CD23 disminuyeron significativamente durante el tratamiento ya sea con danazol o con acetato de leuprolida. No pareció que hubiera correlación entre los niveles de CD23 soluble y la severidad de la endometriosis en las pacientes. Como se observó anteriormente para algunos de los otros putativos, CD23 ha sido asociado con condiciones relacionadas con la producción de autoanticuerpos y los niveles de esta proteína son elevados en pacientes con enfermedades autoinmunes.

40 40 En general, pese al considerable y prolongado esfuerzo desplegado por numerosos investigadores, y también como se reporta en las publicaciones revisadas más arriba, no se ha descubierto un marcador verdaderamente aceptable para la endometriosis. A pesar de eso, el impacto físico y económico de la enfermedad, y la dificultad en el diagnóstico del trastorno dictaminan que se continúe con la búsqueda de marcadores adecuados. Por lo tanto, se emprendieron las 45 actividades descritas en esta invención para identificar marcadores de endometriosis que puedan ayudar a los médicos a monitorear a las pacientes con esta dolencia. Otros grupos han llevado a cabo tales proyectos y estos descubrimientos son el objeto de numerosos documentos de patente, que difieren sustancialmente del descubrimiento de los marcadores ME-5, ME-2 y EPP2 descritos en esta invención. En la solicitud de patente estadounidense No. 2003/0032044 se presenta una descripción de métodos para detectar generalmente los trastornos del tracto reproductivo por medio de la 50 medición de los niveles de las interleuquinas IL-13 e IL-15 en especímenes. Otra solicitud de patente estadounidense, la número 2002/0192647 propone un proceso para diagnosticar enfermedades angiogénicas por medio de la medición del polimorfismo de un solo nucleótido en el gen VEGFR-1. La endometriosis se categoriza como una de este grupo de enfermedades angiogénicas, pero no fue el objetivo de ninguna de las reivindicaciones. Las solicitudes de patente Nos. 2001/046713 y 2001/044158 describen un método de diagnóstico de endometriosis por medio de la detección 55 de anticuerpos anti-Tomson-Frienreich en especímenes. La patente estadounidense publicada No. 6.376.201 ilustra el uso de antígenos principales clase I del complejo de histocompatibilidad en el diagnóstico de la endometriosis y forman la base de la Prueba Metrio como se describió anteriormente. En esta patente, los antígenos de clase I de MHC se detectan en especímenes con anticuerpos monoclonales específicos y se hicieron descripciones similares en la patente estadounidense No. 5.618.680 y WO 0043789. Un método para diagnosticar endometriosis es descrita en 60 la patente estadounidense No. 6.540.980 que involucra la medición de niveles de eosinofil peroxidasa. El la patente estadounidense No. 6.525.187 se describe un marcador aparentemente nuevo de endometriosis que es el objetivo de anticuerpos presentes en suero de pacientes. Otro método para diagnóstico de la endometriosis es descrito en la patente estadounidense No. 6.387.629 y se basa en la medición de la proteasa catepsina S en una muestra clínica. Un gen que codifica un factor asociado con sangrado endometrial (ebaf) es descrito en la patente estadounidense No. 6.294.662 65 y este gen podría ser útil para el diagnóstico de la endometriosis. Sin embargo, el gen ebaf parece ser más útil en el diagnóstico temprano de carcinomas seleccionados (colon, ovarios, o testículos) en un humano. En la patente estadounidense No. 5.877.284 se describe otro marcador potencial de endometriosis. Este marcador es una proteína soluble pequeña aislada por medio de cromatografía de afinidad a partir de fluido peritoneal de mujeres con endometriosis,

ES 2 326 324 T3

y la proteína tiene actividad quimiotáctica para neutrófilos y macrófagos. Un proceso para monitorear funciones endometriales humanas es descrito en la patente estadounidense No. 4.489.166 e involucra la medición cuantitativa de la proteína endometrial asociada con progestágeno (PEP) en una muestra clínica. La patente europea No. 1191107 describe un método para diagnóstico de endometriosis por medio de la medición de una reducción en los niveles de un

5 grupo de 15 genes humanos diferentes. En la patente europea No. 0387027 se describe un proceso de un inmunoensayo que establece la endometriosis en un paciente por medio de la evaluación de un espécimen con un anticuerpo monoclonal antiendometriosis. En WO 0063675 se describe un método para diagnóstico de endometriosis por medio de la medición de niveles crecientes del factor de endometriosis en fluidos biológicos de una paciente. WO 9963116 proporciona un método para diagnosticar endometriosis por medio de la medición de incrementos en la cantidad de 10 protimosa en tejido endometriótico.

La patente estadounidense No. 6.531.277 describe una proteína secretora específica de la endometriosis. El documento caracteriza y describe ENDO-1 humana que es producida por células estromales de tejido endometriótico. La proteína ENDO-1 tiene un peso molecular de 40 a 50 kilodaltons y tiene un punto isoeléctrico de 4,0 a 5,5. Las 15 reivindicaciones del documento se relacionan principalmente con un ensayo de diagnóstico molecular que mide las diferencias en la expresión del ARNm de ENDO-1 en muestras de tejido de endometriosis. En una solicitud estadounidense relacionada, la No. 2002/0009718, se extiende la invención para la medición de la glicoproteína de ENDO-1 en muestras de pacientes utilizando un inmunoensayo para establecer la presencia de endometriosis. Sin embargo, las características de ENDO-1 presentadas en estos documentos sugieren que son considerablemente diferentes de los 20 marcadores descritos en la presente invención. Por ejemplo, cuando se miden las proteínas ME-5, ME-2, y EPP2 por medio de SDS-PAGE y de transferencia tipo Western, tienen un tamaño aproximadamente de 39, 49 y 9 kilodaltons, respectivamente. Únicamente el marcador ME-2 está dentro del rango especificado para ENDO-1, pero ME-2 tiene un punto isoeléctrico de 8,8 por lo que no es una proteína relacionada. También, los puntos isoeléctricos de los antígenos 25 ME-5 y EPP2 se calculan en 5,7 y 12,5 respectivamente, que están también bien por encima del rango de valores especificados para la proteína ENDO-1. Además, el marcador ENDO-1 es un miembro de la familia de proteínas de la haptoglobina, pero las comparaciones de las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos muestran que los marcadores ME-5, ME-2 y EPP2 no están relacionadas con esta familia de proteínas.

En aún otra descripción separada, la patente estadounidense No. 5.843.673 especifica un método para evaluar 30 selectivamente la endometriosis en mujeres por medio de la medición de una reducción en las cantidades de una glicoproteína con un peso molecular de 28 a 32 kilodaltons en muestras de fluido peritoneal o de suero. La proteína posee un punto isoeléctrico de 7,0 a 9,0 y es secretada específicamente por células estromales de origen endometriótico. La glicoproteína descrita en el documento está relacionada con tejido inhibidor de las metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1) en virtud de la identidad de la secuencia de aminoácidos medida en la región amino terminal de la proteína. En 35 la patente se demuestra que la endometriosis está indicada en un paciente que tiene niveles reducidos de TIMP-1 presentes en suero o en fluido peritoneal. Las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 de este invención no están relacionadas con TIMP-1 y no tienen proteína medible u homología de ácido nucleico con esta familia de proteínas. Además, y como se observó anteriormente, las propiedades biomédicas de las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 difieren de aquellas de TIMP-1 y cada una es considerablemente mayor o menor (de 38, 49, ó 9 kilodaltons, respectivamente) que el rango 40 dado para TIMP-1. Mientras que el punto isoeléctrico de ME-2 está en el rango superior de aquel de TIMP-1, el punto isoeléctrico de ME-5 es 5,7 y de EPP2 es 12,5 que son muy diferentes.

Otra descripción de agentes proteínicos implicados en endometriosis está contenida en el documento WO 01/32920 en el cual se asume que un total de 33 genes y sus productos proteínicos están asociados con la enfermedad. Estos 45 marcadores putativos de endometriosis fueron identificados por medio de la comparación del patrón de expresión genética en menos endometrio con relación a aquel de tejido normal. Este diferencial muestra que la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa empleada en el documento es una aproximación de selección puramente genética diseñada para identificar genes asociados con la enfermedad con base en las diferencias en los niveles de expresión de los ARNm. Las poblaciones comparadas de ARNm son usualmente endometrio sano normal y la contraparte endometrio enfermo, idealmente aislados ambos de un solo paciente que sufre de la enfermedad. Esta tecnología ignora la actividad funcional de las proteínas codificadas por los ARNm, y no interroga a los especímenes con base en las marcas, síntomas, o la respuesta del organismo a la enfermedad. Las últimas estrategias son posiblemente mejores aproximaciones para el descubrimiento de marcadores como se discute más adelante. Las secuencias individuales 50 de ácido nucleico identificadas en el documento caen en los grupos generales de: proteasa o inhibidor de proteasa, proteína supresora de tumores, proteínas del sistema inmune, proteínas de respuesta inflamatoria, enzimas, proteínas de enlazamiento de lípido, factores de transcripción, y moléculas matrices o de adhesión celular. Todos los genes en WO 01/32920 son conocidos y las secuencias de ácido nucleico aparecen en las bases públicas de datos permitiendo su identificación. Las secuencias individuales de ácido nucleico identificadas e implicadas por estar de alguna manera involucradas en la endometriosis son: catepsina D, AEBP-1, estromelisina-3, cistatina B, inhibidor de proteasa 1, 55 sFRP4, gelsolina, IGFBP-3, fosfatasa 1 de especificidad dual, PAEP, cadena λ de inmunoglobulina, ferritina, componente 3 complementario, colágeno pro-alfa-1 tipo III, prolina 4-hidroxilasa, colágeno alfa-2 tipo I, claudina-4, proteína de adhesión de melanoma, reforzador de procolágeno C-endopeptidasa, polipéptido alfa del complejo asociado con polipéptido naciente, alargamiento del factor 1 alfa (EF-1 α), vitamina D3 25 hidroxilasa, CSRP-1, proteína reguladora esteroidogénica aguda, apolipoproteína E, transcobalamina II, prosaposina, respuesta 1 de crecimiento temprano 60 (EGR1), proteína ribosomal S6, proteína específica de ARN de adenosina desaminasa, RAD21, polipéptido beta 2 tipo 1 de la proteína de enlazamiento del nucleótido guanina (RACK1), y podocalixina (y ver las referencias dentro de WO 01/32920). Todos los diagnósticos de endometriosis con los agentes anteriores involucrarían la evaluación del nivel 65 de expresión del gen. Las proteínas ME-5, ME-2, y EPP2 y los ácidos nucleicos descritos en esta invención también

ES 2 326 324 T3

son conocidos y aparecen en las bases de datos (ver el Ejemplo 1, más abajo). Sin embargo, ninguna de las secuencias de ME-5, ME-2, o EPP2 cae dentro de ninguno de los grupos enlistados más arriba ni corresponden a ninguno de los agentes designados ya sea por medio de comparación de homología asistida por computador o función predicha con base en la presencia de motivos reconocibles presentes en la secuencia de la proteína. Se empleó una estrategia similar 5 con base en la expresión génica en los descubrimientos documentados por S. Baban y colaboradores en la solicitud estadounidense de patente No. 2002/0127555 en la cual se encontró que 14 genes se sobreexpresaron en pacientes con endometriosis con relación a mujeres libres de la enfermedad. Los genes sobreexpresados fueron los de la NADH deshidrogenasa, hUCC1, Paralemina, proteína de transporte de citrato, HIF1-alfa, ARNT, Glut-1, MnSOD, GPx, ATP sintasa, c-jun, Cx43, HSP 70, y cox2. Además, se reportaron en este documento 19 genes que son expresados en forma 10 deficiente en pacientes con endometriosis con relación a mujeres libres de la enfermedad. Los genes expresados en forma deficiente en tejidos endometriales enfermos fueron Cap43, RNA helicasa, CO3, FKHR, AK3, catalasa, GST, eNOS, 12S rRNA, TI227H, CO2, aconitasa, ANT-1, Bcl-2, COUP-TF, IL-1 beta, HSP 90, GPx4, y GRP78. Aún otra estrategia de expresión génica fue descrita por H. Hess-Stumpf y colaboradores en la solicitud estadounidense de 15 patente No. 2003/0077589 que resultó en el descubrimiento de 15 genes que son sobreexpresados en endometriosis. Los genes sobreexpresados fueron fibronectina, IGFBP-2, el receptor transmembrana PTK7, el factor alfa de crecimiento derivado de plaquetas, colágeno tipo XVIII alfa 1, proteína tipo subtilisina (PACE4), cadena de laminina M (merosina), elastina, colágeno tipo IV alfa 2, gen inducible por el interferón alfa p27, reticulocalbina, aldehído deshidrogenasa 6, gravina, nidógeno, y fosfolipasa C epsilon. Nuevamente, como se estableció anteriormente, la proteína ME-5, ME-2, y EPP2 y las secuencias de ácido nucleico no están relacionadas con ninguno de los genes descritos en las últimas 20 dos patentes.

Tomados juntos y comparando los resultados de estos tres documentos, es interesante que todos ellos utilizaron estrategias de expresión génica similares pero no idénticas para identificar un total de 62 genes que son sobreexpresados en endometriosis y 19 genes que son expresados en forma insuficiente. La implicación es por lo tanto que los 81 genes 25 descritos están relacionados con o involucrados en la enfermedad endometrial. Sorprendentemente, entre estos tres estudios independientes, no se encontró consistente un gen humano individual o clase de genes que estuviera asociada con endometriosis. Ostensiblemente, si se sobreexpresó un gen debido a cambios ocurridos en tejido de endometriosis con relación a la contraparte normal, entonces se esperaría identificar en forma reproducible en todos los estudios que evalúan el perfil de expresión génica de tejido enfermo. Esto parece que no ocurre por el contrario en los proyectos 30 bien diseñados, y ponen en tela de juicio las estrategias para el descubrimiento de un marcador con base únicamente en las tecnologías de perfiles de expresión génica.

El documento WO 94/28021 describe proteínas endometriales, compuestos antigenicos, y métodos para detectar endometriosis. La descripción abarca proteínas específicas de la endometriosis, definidas por el peso molecular y el punto isoelectrico. Muchas de las reivindicaciones presentadas se basan únicamente en el tamaño, pero otras especifican un peso molecular y un punto isoelectrico. El antígeno principal de la endometriosis del documento y que está descrito en la reivindicación inicial tiene un peso molecular de 64 kilodaltons y un punto isoelectrico de 3,5. Se usa el antígeno para medir anticuerpos en especímenes obtenidos a partir de pacientes con endometriosis y también puede ser medido él mismo directamente por su presencia en muestras de pacientes. Además, se describe también una proteína 35 de endometriosis de peso molecular mayor de 94 kilodaltons con un punto isoelectrico de 3,5 presumiblemente para ser utilizada en los mismos formatos que el antígeno más pequeño. El documento también reivindica ácidos nucleicos para estas proteínas, sin embargo estas secuencias no aparecen con suficiente detalle para permitir la comparación con las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 y con los ácidos nucleicos de esta invención. Se presenta una pequeña cantidad de secuencia de aminoácidos en WO 94/28021, pero existen únicamente 17 residuos mostrados en el documento y de 40 estos cerca de la mitad son ambiguos. Aunque están previstas aplicaciones similares para las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 descritas en esta invención, los antígenos descritos anteriormente no son comparados en ninguna de las propiedades reportadas con aquellas de los tres antígenos de endometriosis presentados aquí. Inicialmente, ninguno de los residuos no ambiguos de la secuencia amino terminal de la proteína están presentes en las regiones correspondientes de ME-5, ME-2 y EPP2. Además, las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 tienen un tamaño de 38, 49, y 9 kilodaltons, que 45 son considerablemente más pequeños que los antígenos descritos en el documento esbozado anteriormente. Además, los puntos isoelectrinos de ME-5, ME-2 y EPP2 son 5,7; 8,8 y 12,5 que son considerablemente mayores que los descritos para las otras proteínas. Se debe concluir que los antígenos endometriales ME-5, ME-2 y EPP2 de esta invención tienen poco en común con las proteínas descritas en WO 94/28021.

55 Los métodos y reactivos para diagnóstico de endometriosis están descritos en NZ 232801 (también en la solicitud EP-A-0 387 027) esencialmente por medio de la medición de un antígeno de endometriosis en un espécimen de paciente utilizando un anticuerpo antiendometriosis. Se describen diferentes antígenos en el documento en un rango de peso molecular entre 50 y 173 kilodaltons, pero no se llevó a cabo una caracterización adicional de las proteínas. Estas proteínas fueron aisladas como una mezcla del medio de cultivo y el citoplasma de 2.774 células de carcinoma 60 de ovario, y se pueden obtener también a partir de otras líneas celulares cultivadas. También se describen en la descripción un anticuerpo antiendometrial, que es monoclonal IgM humano originalmente aislado debido a que reacciona con antígenos asociados con cáncer de ovario. El aislamiento del anticuerpo se hizo aparentemente a través de un conjunto de actividades que no estuvieron relacionadas con endometriosis y los objetivos de antígeno de cáncer de ovario aparentemente no fueron bien caracterizados. Se elaboró el anticuerpo por medio de fusión del linfocitos del paciente con un heteromieloma, y aparentemente la reactividad del antígeno monoclonal con antígenos endometriales 65 fue descubierta posteriormente. A pesar de eso, con base en los criterios presentados es poco probable que alguna de las proteínas de NZ 232801 sea la misma que las proteínas más pequeñas ME-5, ME-2 y EPP2 de esta invención.

ES 2 326 324 T3

Otra serie de antígenos endometriales reactivos con anticuerpos antiendometriales es descrita en WO 92/18535 y estos están caracterizados también por el peso molecular por medio del análisis SDS-PAGE. Los fragmentos descriptos de antígeno de proteína fueron aislados del citoplasma de células epiteliales de adenocarcinoma y son descriptas como útiles para la detección de anticuerpos endometriales que son indicativos de endometriosis. Los antígenos son

5 proteínas citoplasmáticas con tamaños de 63 a 67, de 33 a 37, de 40 a 44, de 31 a 35, y de 57 a 64 kilodaltons. Las designaciones probablemente se refieren a una única especie de proteína, pero los rangos de tamaño fueron presentados en el documento para reflejar la imprecisión inherente ($\pm 10\%$) por el método de análisis SDS-PAGE utilizado. Aparentemente las proteínas preferidas para uso son las proteínas de 33 a 37, de 40 a 44, y de 57 a 59 kilodaltons. Las proteínas de 33 a 37 y de 40 a 44 parecen estar presentes en la mayoría de las líneas celulares que fueron estudiadas
10 en el documento para uso como fuentes de antígeno, mientras que los fragmentos de proteína de 57 a 59 se originan a partir de la línea celular de carcinoma de seno T47D. El documento describe el uso de estas proteínas individualmente (o mezcladas) inmovilizadas sobre soporte sólido para medir anticuerpos endometriales. Desde luego están previstas aplicaciones similares para los antígenos ME-5, MÈ-2 y EPP2, sin embargo con la excepción posiblemente de los fragmentos de 33 a 37 kilodaltons existe poco más presentado en este documento que se compare con las descripciones en
15 WO 92/18535.

Resumen de la invención

20 La invención se relaciona con el método de la reivindicación 1 y la composición de la reivindicación 5. Además, se describen aquí las siguientes materias:

Un polinucleótido recombinante que incluye una secuencia aislada de nucleótido de la SEQ ID NO: 2 que codifica a un epítopo de polipéptido de al menos 5 aminoácidos de ME-5 (SEQ ID NO: 3), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.
25

Un polipéptido recombinante ME-5 purificado cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 3 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 3.

30 Un polipéptido purificado que incluye un epítopo de al menos 5 aminoácidos de ME-5 (SEQ ID NO: 3), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.

Una composición que consiste esencialmente de un anticuerpo que se enlaza específicamente a un epítopo del polipéptido ME-5 (SEQ ID NO: 3).
35

Un método para detectar un polipéptido ME-5 (SEQ ID NO: 3) en una muestra, que comprende las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítopo del polipéptido ME-5 y
(b) detectar el enlazamiento específico entre el anticuerpo y el polipéptido ME-5;

por medio de lo cual el enlazamiento específico permite la detección del polipéptido ME-5 en la muestra.
45

Un método para diagnosticar endometriosis en un individuo humano que comprende las etapas de:

- 50 (a) detectar una cantidad de prueba de un anticuerpo que específicamente se enlaza a un epítopo del polipéptido ME-5 (SEQ ID NO: 3) en una muestra del individuo; y
(b) comparar la cantidad de prueba con el rango normal del anticuerpo en una muestra de control de un individuo que no sufre de endometriosis,

55 por medio de lo cual una cantidad de prueba por encima del rango normal proporciona una indicación positiva en el diagnóstico de la endometriosis.

Un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 que codifica a un epítopo de polipéptido de al menos 5 aminoácidos de ME-2 (SEQ ID NO: 6), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.
60

Un polipéptido recombinante ME-2 purificado cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 6 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 6.

65 Un polipéptido purificado que comprende un epítopo de al menos 5 aminoácidos de ME-2 (SEQ ID NO: 6), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.

ES 2 326 324 T3

Una composición que consiste esencialmente de un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítopo del polipéptido ME-2 (SEQ ID NO: 6).

5 Un método para detectar un polipéptido ME-2 (SEQ ID NO: 6) en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítopo del polipéptido ME-2 y

10 (b) detectar el enlazamiento específico entre el anticuerpo y el polipéptido ME-2;

por medio de lo cual el enlazamiento específico permite la detección del polipéptido ME-2 en la muestra.

15 Un método para diagnosticar endometriosis en un individuo humano que comprende las etapas de:

(a) detectar una cantidad de prueba de un anticuerpo que específicamente se enlaza a un epítopo del polipéptido ME-2 (SEQ ID NO: 6) en una muestra del individuo; y

20 (b) comparar la cantidad de prueba con un rango normal del anticuerpo en una muestra de control de un individuo que no sufre de endometriosis,

por medio de lo cual una cantidad de prueba por encima del rango normal proporciona una indicación positiva en el diagnóstico de la endometriosis.

25

Un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 que codifica a un epítopo de polipéptido de al menos 5 aminoácidos de EPP2 (SEQ ID NO: 9), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.

30

Un polipéptido recombinante EPP2 purificado cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 9 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 9.

35

Un polipéptido purificado que comprende un epítopo de al menos 5 aminoácidos de EPP2 (SEQ ID NO: 9), en donde el epítopo se enlaza específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.

Una composición que consiste esencialmente de un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítopo del polipéptido EPP2 (SEQ ID NO: 9).

40

Un método para detectar un polipéptido EPP2 (SEQ ID NO: 9) en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se enlaza específicamente con un epítopo del polipéptido EPP2 y

45

(b) detectar el enlazamiento específico entre el anticuerpo y el polipéptido EPP2;

por medio de lo cual el enlazamiento específico permite la detección del polipéptido EPP2 en la muestra.

50

Un método para diagnosticar endometriosis en un individuo humano que comprende las etapas de:

(a) detectar una cantidad de prueba de un anticuerpo que específicamente se enlaza a un epítopo del polipéptido EPP2 (SEQ ID NO: 9) en una muestra del individuo; y

55

(b) comparar la cantidad de prueba con el rango normal del anticuerpo en una muestra de control de un individuo que no sufre de endometriosis,

60

por medio de lo cual una cantidad de prueba por encima del rango normal proporciona una indicación positiva en el diagnóstico de la endometriosis.

Una composición que contiene al menos uno de

65

un polipéptido recombinante ME-5 purificado cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 3 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 3;

ES 2 326 324 T3

un polipéptido recombinante ME-2 purificado cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 6 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 6;

5 un polipéptido recombinante EPP2 purificado cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica a aquella de la SEQ ID NO: 9 o una variante alélica de la SEQ ID NO: 9;

en donde dichos epítopos se enlazan específicamente con anticuerpos de individuos diagnosticados con endometriosis.

10 10 Un método para diagnosticar endometriosis en un individuo humano que comprende las etapas de:

(a) detectar una cantidad de prueba de un anticuerpo que específicamente se enlaza con al menos un polipéptido ME-5 (SEQ ID NO: 3), un polipéptido ME-2 (SEQ ID NO: 6); y un polipéptido EPP2 (SEQ ID NO: 9) en una muestra del individuo; y

15 (b) comparar la cantidad de prueba con el rango normal del anticuerpo en una muestra de control de un individuo que no sufre de endometriosis,

20 por medio de lo cual una cantidad de prueba por encima del rango normal proporciona una indicación positiva en el diagnóstico de la endometriosis.

Como se muestra en los documentos citados anteriormente, se han documentado una cantidad de descubrimientos para marcadores candidatos de endometriosis. Ninguno de estos corresponde a las proteínas ME-5, ME-2 o EPP2 ni a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Por consiguiente, las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 representan novedosos marcadores nuevos para endometriosis y los objetivos de anticuerpos antiendometriales producidos por mujeres que sufren de tal trastorno. El descubrimiento de los marcadores ME-5, ME-2 y EPP2 de esta invención se basó en el conocimiento de que las mujeres que sufren de endometriosis tienen defectos en sus sistemas inmunológicos. Se asume que algunos problemas del sistema inmunológico se pueden manifestar en presencia de autoanticuerpos dirigidos a antígenos endometriales. Otros (S. Pillai y colaboradores [1998] Am. J. Reprod. Immunol. 39: 235; Van Voorhis y Stovall [1997] J. Reprod. Immunol. 33: 239) han discutido tal situación. Claramente, esto representa un medio atractivo para identificar marcadores candidatos de la enfermedad y como herramientas útiles para monitorear pacientes con endometriosis. Recientemente, un resumen de la precisión de marcadores en suero para el diagnóstico de endometriosis mostró que habían anticuerpos endometriales entre los mejores marcadores con sensibilidades de 74% a 83% y específicamente de 79% a 100% (J. Brosens y colaboradores Obstet. Gynecol. Clin. North Am. 30: 95). Sin embargo, no se midieron los anticuerpos contra antígenos discretos aislados tales como ME-5, ME-2, y EPP2 por ejemplo.

Al comienzo de un programa para identificar antígenos que pueden ser marcadores útiles de endometriosis (y por lo tanto provechosos en el monitoreo de mujeres que sufren del trastorno) se hicieron hipótesis relacionadas con este enfermedad. Primero, como se observó anteriormente, se asumió que se presentan defectos del sistema inmunológico en estas mujeres que les permiten elaborar anticuerpos dirigidos a antígenos endometriales específicos. Segundo, estos anticuerpos en suero podrían ser utilizados como herramientas para identificar los antígenos, y estas proteínas formarían en parte los fundamentos de los sistemas de análisis inmunodiagnóstico para monitorear pacientes con el trastorno. La estrategia para identificación de marcadores de endometriosis fue utilizar suero del paciente para inmunoselección una biblioteca de expresión de ADNc de tejido endometrial. Los clones candidatos serían completamente caracterizados para el desarrollo de un inmunoensayo adecuado para monitorear pacientes en un ambiente clínico.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

50 Se describen un total de tres proteínas endometriales que reaccionan con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con endometriosis. El marcador de endometriosis ME-5 se especifica por medio de un ARNm de aproximadamente 1,4 kb, de los cuales 1.302 nucleótidos son descritos en esta invención. La proteína predicha a partir de esta secuencia tiene un tamaño de 303 aminoácidos y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 35.000 daltons. El producto proteínico natural tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kD de acuerdo a lo medido por medio de transferencias tipo Western con un anticuerpo monoclonal específico. La proteína fue particularmente abundante en tejido de ovario el cual, tomado con el aislamiento de tejido endometrial apoya firmemente su presencia en tejidos reproductivos y como marcador de una enfermedad reproductiva. En experimentos de inmunotransferencias con antígeno recombinante inmovilizado ME-5, se evaluaron una cantidad de pacientes con endometriosis y las señales generadas fueron considerablemente más fuertes que aquellas obtenidas con una cantidad de pacientes de control.

El marcador de endometriosis ME-2 está especificado por un ARNm de aproximadamente 2,0 kb de los cuales 1.353 nucleótidos son descritos en esta invención. La proteína predicha a partir de esta secuencia es de un tamaño de 393 aminoácidos y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 45.000 Daltons. En experimentos de inmunotransferencias con antígeno recombinante inmovilizado ME-2, se evaluaron una cantidad de pacientes con endometriosis y las señales generadas fueron considerablemente más fuertes que aquellas obtenidas con una cantidad de pacientes de control.

El marcador de endometriosis EPP2 está especificado por un ARNm de aproximadamente 1,0 kb de los cuales 891 nucleótidos son descritos en esta invención. La proteína predicha a partir de esta secuencia es de un tamaño de 99 aminoácidos y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 9.300 Daltons. En experimentos de inmunotransferencias con antígeno recombinante inmovilizado EPP2, se evaluaron una cantidad de pacientes con 5 endometriosis y las señales generadas fueron considerablemente más fuertes que aquellas obtenidas con una cantidad de pacientes de control.

Los detalles de estas y otras publicaciones relacionadas con los marcadores de endometriosis ME-5, ME-2 y EPP2 y sus ácidos nucleicos están contenidos en los ejemplos más adelante.

10 Claramente, como se citó por medio de los documentos presentados anteriormente, se han documentado una cantidad de descubrimientos para marcadores candidatos de endometriosis. Ninguno de estos corresponde a las proteínas ME-5, ME-2 o EPP2 ni a las secuencias de ácido nucleico descritas aquí. Por consiguiente, las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 de esta invención representan novedosos marcadores nuevos para endometriosis y los objetivos de anticuerpos 15 antiendometriales producidos por mujeres que sufren de tal trastorno. El descubrimiento de los marcadores ME-5, ME-2 y EPP2 en esta invención se basó en el conocimiento de que las mujeres que sufren de endometriosis tienen defectos en sus sistemas inmunológicos. Se asume que algunos problemas del sistema inmunológico se pueden manifestar en presencia de autoanticuerpos dirigidos a antígenos endometriales. Otros (S. Pillai y colaboradores [1998] Am. J. Reprod. Immunol. 39: 235; Van Voorhis y Stovall [1997] J. Reprod. Immunol. 33: 239) han discutido tal situación. Claramente, esto representa un medio atractivo para identificar marcadores candidatos de la enfermedad y como 20 herramientas útiles para monitorear pacientes con endometriosis. Recientemente, un resumen de la precisión de marcadores en suero para el diagnóstico de endometriosis mostró que habían anticuerpos endometriales entre los mejores marcadores con sensibilidades de 74% a 83% y específicamente de 79% a 100% (J. Brosens y colaboradores [2003] Obstet. Gynecol. Clin. North Am. 30: 95). Sin embargo, no se midieron los anticuerpos contra antígenos discretos 25 aislados tales como ME-5, ME-2, y EPP2 por ejemplo.

Al comienzo de un programa para identificar antígenos que pueden ser marcadores útiles de endometriosis (y por lo tanto provechosos en el monitoreo de mujeres que sufren del trastorno) se hicieron hipótesis relacionadas con este 30 enfermedad. Primero, como se observó anteriormente, se asumió que se presentan defectos del sistema inmunológico en estas mujeres que les permiten elaborar anticuerpos dirigidos a antígenos endometriales específicos. Segundo, estos anticuerpos en suero podrían ser utilizados como herramientas para identificar los antígenos, y estas proteínas formarían en parte los fundamentos de los sistemas de análisis inmunodiagnóstico para monitorear pacientes con el trastorno. La estrategia para identificación de marcadores de endometriosis fue utilizar suero del paciente para inmunoselección una biblioteca de expresión de ADNc de tejido endometrial. Los clones candidatos serían completamente 35 caracterizados para el desarrollo de un inmunoensayo adecuado para monitorear pacientes en un ambiente clínico.

Descripción de los dibujos

40 Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) para el ADNc aislado de ME-5, la secuencia de nucleótidos de la región de codificación (SEQ ID NO: 2) de este ADNc de ME-5, y la secuencia deducida de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos del ADNc de ME-5. En la Fig. 1A existe una secuencia 5' no traducida de 112 pares de bases secuencia arriba del codón de inicio predicho ATG. También en la Figura 1A es una región 3' no traducida de 254 pares de bases secuencia abajo del codón de detención 45 TGA. La región 3' no traducida termina en un tramo de dT correspondiente a la cola poli A del ARNm. El codón de inicio (ATG) y el codón de detención de la traducción (TGA) se presentan en negrilla en la secuencia de ADNc de las Figuras 1A y B.

Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) para el ADNc aislado de ME-2, la 50 secuencia de nucleótidos de la región de codificación (SEQ ID NO: 5) de este ADNc de ME-2, y la secuencia deducida de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos del ADNc de ME-2. En la Fig. 2A existe una secuencia 5' no traducida de 54 pares de bases secuencia arriba del codón de inicio predicho ATG. También en la Figura 2A es una región 3' no traducida de 95 pares de bases secuencia abajo del codón de detención 55 TGA. La región 3' no traducida termina en un tramo de dT correspondiente a la cola poli A del ARNm. El codón de inicio (ATG) y el codón de detención de la traducción (TGA) se presentan en negrilla en la secuencia de ADNc de las Figuras 2A y B.

Las Figuras 3A, 3B y 3C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) para el ADNc aislado de EPP2, la secuencia de nucleótidos de la región de codificación (SEQ ID NO: 8) de este ADNc de EPP2, y la secuencia deducida 60 de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos del ADNc de EPP2. En la Fig. 3A existe una secuencia 5' no traducida de 45 pares de bases secuencia arriba del codón de inicio predicho ATG. También en la Figura 3A es una región 3' no traducida de 522 pares de bases secuencia abajo del codón de detención TAA. La región 3' no traducida termina en un tramo de dT correspondiente a la cola poli A del ARNm. El codón de inicio (ATG) y el codón de detención de la traducción (TAA) se presentan en negrilla en la secuencia de ADNc de las 65 Figuras 3A y B.

La Figura 4 demuestra el patrón de expresión del ARNm de ME-5 en diferentes tejidos humanos. Una transferencia comercial tipo Northern (BD Biosciences; San Diego, CA) fue hibridada con la secuencia completa de codificación

ES 2 326 324 T3

de ME-5 marcada con ^{32}P de la Figura 1B. Las condiciones de hibridación y de lavado fueron como las descritas por el fabricante. Se observaron bandas de hibridación correspondientes a un ARNm de aproximadamente 1.400 nucleótidos (migra solo un poco más lentamente que el marcador de 1.350 nucleótidos) así como otras más grandes pero quizás un mensaje menos abundante de 1.800 a 2.000 nucleótidos (que migra justo por delante del marcador de 2.400 nucleótidos). La secuencia de ME-5 parece ser expresada más abundantemente en tejidos de próstata, testículo y de úteros, pero se detectaron cantidades menores en los otros tejidos evaluados (bazo, timo, intestino delgado, colon y leucocitos de sangre periférica).

La Figura 5 demuestra el patrón de expresión del ARNm de ME-2 en diferentes tejidos humanos. Una transferencia comercial tipo Northern (BD Biosciences; San Diego, CA) fue hibridada con la secuencia completa de codificación de ME-2 marcada con ^{32}P de la Figura 2B. Las condiciones de hibridación y de lavado fueron como las descritas por el fabricante. Se observaron bandas de hibridación correspondientes a un ARNm de aproximadamente 2.000 nucleótidos (migra aproximadamente a medio camino entre los marcadores de 2.400 nucleótidos y de 1.350 nucleótidos). No se detectaron otras bandas fuertemente hibridantes sobre la transferencia. La secuencia de ME-2 parece ser expresada más abundantemente en tejidos de próstata y de testículo. Niveles moderados son detectables en tejido de bazo, útero, intestino delgado, colon y de leucocitos de sangre periférica. En este experimento se observaron cantidades menores de hibridación en tejido de timo.

La Figura 6 demuestra el patrón de expresión del ARNm de EPP2 en diferentes tejidos humanos. Una transferencia comercial tipo Northern (BD Biosciences; San Diego, CA) fue hibridada con la secuencia completa de codificación de EPP2 marcada con ^{32}P de la Figura 3B. Las condiciones de hibridación y de lavado fueron como las descritas por el fabricante. Se observaron bandas de hibridación correspondientes a un ARNm de aproximadamente 1.000 nucleótidos (migra justo más rápido que el marcador de 1.350 nucleótidos). La secuencia de EPP2 parece ser expresada más abundantemente en próstata, testículos, colon y en leucocitos de sangre periférica. Se observaron cantidades menores de señal en tejidos de bazo, timo e intestino delgado, pero poca o ninguna señal se detectó en tejido de útero.

La Figura 7 muestra el patrón de expresión de ME-5 recombinante en una célula huésped de insecto. Se clonó el ADNc de ME-5 para expresión como una proteína recombinante etiquetada con histidina 6X en células de insecto. Se preparó y se lisó un cultivo de células de insectos Sf9 que expresa ME-5 recombinante. Se lavó el medio de cultivo con PBS, y se analizaron las fracciones soluble e insoluble del lisado celular por medio de SDS-PAGE y se coloreó (panel izquierdo) el gel con azul GelCode (Pierce Chemicals; Rockford, IL). Se evaluaron también las muestras de expresión por medio de transferencias tipo Western (panel derecho) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HisG (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario IgG antiratón de conejo marcado con ^{125}I . Se oscureció la proteína recombinante por medio de la multiplicidad de bandas de proteína en un gel coloreado a la izquierda, pero se detectó claramente una banda de aproximadamente 38 kD por medio de la transferencia tipo Western. Esto confirmó la presencia de una proteína etiquetada con His 6X con el peso molecular aproximado esperado para el antígeno recombinante ME-5. No se pudo detectar proteína recombinante ME-5 en el medio celular de cultivo, pero algo estaba presente en el PBS utilizado para lavar las células de insecto antes de la lisis. La mayor parte de la proteína recombinante ME-5 pareció estar presente en la fracción soluble del lisado de células de insecto, pero algo estaba asociado con el material insoluble.

La Figura 8 muestra el patrón de expresión de ME-2 recombinante en una célula huésped de insecto. Se clonó el ADNc de ME-2 para expresión como una proteína recombinante etiquetada con histidina 6X en células de insecto. Se preparó y se lisó un cultivo de células de insectos Sf9 que expresa ME-2 recombinante. Se lavó el medio de cultivo con PBS, y se analizaron las fracciones soluble e insoluble del lisado celular por medio de SDS-PAGE y se coloreó (panel izquierdo) el gel con azul GelCode (Pierce Chemicals; Rockford, IL). Se evaluaron también las muestras de expresión por medio de transferencias tipo Western (panel derecho) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HisG (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario IgG antiratón de conejo marcado con ^{125}I . Se oscureció la proteína recombinante por medio de la multiplicidad de bandas de proteína en un gel coloreado a la izquierda, pero se detectó claramente una banda de aproximadamente 49 kD por medio de la transferencia tipo Western. Esto confirmó la presencia de una proteína etiquetada con His 6X con el peso molecular aproximado esperado para el antígeno recombinante ME-2. No se pudo detectar proteína recombinante ME-5 en el medio celular de cultivo, pero algo estaba presente en el PBS utilizado para lavar las células de insecto antes de la lisis. Aproximadamente cantidades iguales de la proteína recombinante ME-2 pareció estar distribuida entre las fracciones soluble e insoluble del lisado de células de insecto.

La Figura 9 muestra el patrón de expresión de EPP2 recombinante en una célula huésped de insecto. Se clonó el ADNc de EPP2 para expresión como una proteína recombinante etiquetada con histidina 6X en células de insecto. Se preparó y se lisó un cultivo de células de insectos Sf9 que expresa EPP2 recombinante. Se lavó el medio de cultivo con PBS, y se analizaron las fracciones soluble e insoluble del lisado celular por medio de SDS-PAGE y se coloreó (panel izquierdo) el gel con azul GelCode (Pierce Chemicals; Rockford, IL). Se evaluaron también las muestras de expresión por medio de transferencias tipo Western (panel derecho) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HisG (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario IgG antiratón de conejo marcado con ^{125}I . Se oscureció la proteína recombinante por medio de la multiplicidad de bandas de proteína en un gel coloreado a la izquierda, pero se detectó claramente una banda de aproximadamente 9 kD por medio de la transferencia tipo Western. Esto confirmó la presencia de una proteína etiquetada con His 6X con el peso molecular aproximado esperado para el antígeno recombinante EPP2. No se pudo detectar proteína recombinante EPP2 en el medio celular de cultivo, ni estaba presente ninguna cantidad medible en el PBS utilizado para lavar las células de insecto antes de la lisis.

ES 2 326 324 T3

Aproximadamente cantidades iguales de la proteína recombinante EPP2 pareció estar distribuida entre las fracciones soluble e insoluble del lisado de células de insecto.

La Figura 10 muestra el aislamiento de la proteína recombinante ME-5 etiquetada con 6X utilizando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Se expresó la proteína recombinante ME-5 en células de insecto Sf9 y se lisaron las células en amortiguador de enlazamiento de columna de IMAC. Se cargó la fracción soluble de las células de insecto (Lisado) sobre una columna de Sefarosa de Quelación de Flujo Rápido (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) que había sido cargada con iones de níquel. Se capturó el lisado después de pasar a través de la resina de la columna (rompimiento) y se lavó la columna extensivamente con amortiguador de lavado de IMAC. La ME-5 recombinante enlazada a la resina fue eluida de la columna con amortiguador que contenía imidazol. Las muestras del lisado, rompimiento, lavado y elusión fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y transferencias tipo Western como se describió anteriormente. EL gel coloreado mostró la complejidad del lisado de células de insecto, que resultó en una mancha de proteína para ésta y el rompimiento de las muestras. Se lavó una cantidad razonable de contaminantes no enlazados a la proteína con el amortiguador de Columna A20, y apareció una banda bonita correspondiente a una proteína de 38 kD entre el material eluido a partir de la columna con imidazol. Las transferencias tipo Western de estas muestras mostraron buenos niveles de la proteína recombinante ME-5 en el lisado, y en el rompimiento mostrando que en este experimento particular la cantidad de ME-5 excedió la capacidad de enlazamiento para la columna. Quizás una traza de ME-5 estaba en el amortiguador de lavado de la Columna A20 utilizado para remover las impurezas enlazadas a la Sefarosa. Las transferencias tipo Western mostraron una reactividad intensa del anticuerpo anti-HisG con el antígeno ME-5 eluido y purificado parcialmente de 38 kD.

La Figura 11 muestra el aislamiento de la proteína recombinante ME-2 etiquetada con 6X utilizando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Se expresó la proteína recombinante ME-2 en células de insecto Sf9 y se lisaron las células en amortiguador de enlazamiento de columna de IMAC. Se cargó la fracción soluble de las células de insecto (Lisado) sobre una columna de Sefarosa de Quelación de Flujo Rápido (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) que había sido cargada con iones de níquel. Se capturó el lisado después de pasar a través de la resina de la columna (rompimiento) y se lavó la columna extensivamente con amortiguador de lavado de IMAC A10, A15, y A20. La ME-2 recombinante enlazada a la resina fue eluida de la columna con amortiguador que contenía imidazol. Las muestras del lisado, rompimiento, lavado y elusión fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y transferencias tipo Western como se describió anteriormente. EL gel coloreado mostró la complejidad del lisado de células de insecto, que resultó en una mancha de proteína para ésta y el rompimiento de las muestras. Se lavó una cantidad razonable de contaminantes no enlazados a la proteína con el amortiguador de lavado de Columna A10, A15 y A20. Finalmente, se presentó una banda bonita correspondiente a una proteína de 49 kD entre el material eluido a partir de la columna con imidazol. Las transferencias tipo Western de estas muestras mostraron buenos niveles de la proteína recombinante ME-2 en el lisado, y algo también en el rompimiento mostrando que en este corrimiento particular la cantidad de ME-2 puede haber excedido la capacidad de enlazamiento para la columna. Quizás una traza de ME-2 estaba presente en el amortiguador de Lavado de la Columna A10, pero se detectaron señales más fuertes en el lavado con amortiguadores de Lavado de columna A20 utilizados para remover las impurezas enlazadas a la Sefarosa. Las transferencias tipo Western mostraron una reactividad intensa del anticuerpo anti-HisG con el antígeno ME-2 eluido y purificado parcialmente de 49 kD.

La Figura 12 muestra el aislamiento de la proteína recombinante EPP2 etiquetada con 6X utilizando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Se expresó la proteína recombinante EPP2 en células de insecto Sf9 y se lisaron las células en amortiguador de enlazamiento de columna desnaturizante de IMAC. Se cargó el lisado de células de insecto sobre una columna de Sefarosa de Quelación de Flujo Rápido (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) que había sido cargada con iones de níquel. Se capturó el lisado después de pasar a través de la resina de la columna (rompimiento) y se lavó la columna extensivamente con amortiguadores de lavado de IMAC A10, A15, A20, A25 y A30. La EPP2 recombinante enlazada a la resina fue eluida de la columna con amortiguador que contenía imidazol. Las muestras del lisado, rompimiento, lavados y elusión fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y transferencias tipo Western como se describió anteriormente. EL gel coloreado mostró la complejidad del lisado de células de insecto, que resultó en una mancha de proteína. Además, el rompimiento y las muestras de Lavado de Columna A10 contenían una cantidad sustancial de material que no se enlaza a la matriz de la columna. Se lavaron muy pocos contaminantes de la proteína con los amortiguadores de Lavado de Columna A15, A20, A25y A30 como se observó a partir del gel coloreado. Se presentó una banda muy bonita correspondiente a una proteína de 9 kD entre el material eluido a partir de la columna con imidazol. La transferencia tipo Western de estas muestras mostró niveles detectables de la proteína recombinante EPP2 en el lisado. Poca o ninguna EPP2 estaba presente en el rompimiento, las muestras A10 o A15 mostrando que en este corrimiento particular la EPP2 se enlazó bastante bien a la columna. Quizás se detectó una traza de EPP2 en los amortiguadores de Lavado de Columna A20, A25 y A30 utilizados para remover las impurezas enlazadas a la Sefarosa. La transferencia tipo Western mostró una reactividad intensa del anticuerpo anti-HisG con el antígeno EPP2 eluido de 9 kD.

La Figura 13 muestra análisis de transferencias tipo Western de una proteína ME-5 recombinante aislada así como el antígeno ME-5 nativo presente en células de carcinoma endometrial RL95-2. Se lisaron las células cultivadas RL95-2 y se sometió a electroforesis una muestra de la fracción soluble en un gel de 4% a 20% de Tris Glicina SDS PAGE (Invitrogen; Carlsbad, CA). Se incluyó una muestra de ME-5 recombinante aislada por medio de IMAC a partir de células de insecto Sf9 sobre el gel como control positivo para el anticuerpo anti-ME-5. Se llevaron a cabo transferencias tipo Western con el anticuerpo monoclonal anti-ME-5 2D1 seguido por anticuerpos secundario IgG antiratón de conejo marcado con ¹²⁵I: Se observó una banda clara de reactividad (senda derecha) entre las proteínas RL95-2 que parecieron migrar con un peso molecular que fue ligeramente superior que la recombinante de célula de insecto.

ES 2 326 324 T3

La Figura 14 es una transferencia tipo Western que muestra la expresión de antígeno nativo ME-5 en diferentes tejidos humanos. Se separaron los extractos de proteína de tejido en amortiguador de muestra SDS PAGE (mezclas de proteína: BD Biosciences; San Diego, CA) en geles de SDS PAGE y se hicieron las transferencias tipo Western como se describe en la Figura 13. El antígeno nativo ME-5 parece estar presente por doquier en todos los tejidos examinados, pero parece ser ligeramente más abundante en extractos de corazón, hígado, ovario y riñón.

Las Figuras 15A y 15B muestran inmunotransferencias representativas en línea que ilustran la habilidad de la ME-5 recombinante para reaccionar con anticuerpos presentes en suero obtenidos a partir de pacientes con endometriosis, pero no en sueros normales de control. Cada tira contiene antígenos inmovilizados que fueron acanalados sobre la membrana en diferentes concentraciones. Las concentraciones de proteína para ME-5 son 0,018; 0,036; 0,072 y 0,144 miligramos por mililitro (mg/ml). La concentración óptima para discriminación entre pacientes y controles fue de 0,036 mg/ml como se designa por medio de la flecha a la derecha de las tiras de transferencias en línea. Una ventaja del ensayo de inmunotransferencias en línea es que muchas proteínas diferentes pueden ser interrogadas sobre una tira única, y que proteínas adicionales no relacionadas están presentes sobre las tiras que actúan como controles internos. Se incluye un reactivo de control (monoclonal IgG antihumano de ratón) sobre cada tira para actuar como control positivo. Se incubó cada tira con suero de una persona normal (control) o de un paciente con endometriosis confirmada. Los patrones de transferencias en línea para un total de 11 controles (A6, A7, A8, A9, A10, A14, A15, A16, A17, A18, A21) se muestran en la Figura 15A. Además, se muestran 23 pacientes con endometriosis (DS01, DS02, DS03, DS04, DS05, DS06, DS07, DS08, DS10, DS11, DS12, DS13, DS27, DS28, DS29, DS30, DS31, DS32, DS33, DS34, DS36, DS38, DS39) en la Figura 15B. La intensidad de la coloración de cada banda es indicativa de la reactividad del suero analizado con ME-5. En este panel seleccionado de transferencias en línea, ME-5 con una concentración de 0,036 mg/ml detectó 18 pacientes con endometriosis como positivos (DS01, DS03, DS05, DS06, DS10, DS11, DS12, DS27, DS28, DS29, DS30, DS31, DS32, DS33, DS34, DS36, DS38, y DS39). Además, 5 pacientes con endometriosis (DS02, DS04, DS07, DS08, and DS13) produjeron patrones de reactividad que fueron un poco menores. Entre los 11 controles normales, ME-5 claramente no reaccionó con nueve de ellos (A6, A7, A8, A10, A15, A16, A17, A18, A21). Puede que se hayan observado señales detectables (A9, A14), pero estas fueron claras con relación a los patrones observados con sueros de pacientes con endometriosis y se interpretan como negativos.

Las Figuras 16A y 16B muestran inmunotransferencias representativas en línea que ilustran la habilidad de la ME-2 recombinante para reaccionar con anticuerpos presentes en suero obtenidos a partir de pacientes con endometriosis, pero no en sueros normales de control. Cada tira contiene antígenos inmovilizados que fueron acanalados sobre la membrana en diferentes concentraciones. Las concentraciones de proteína de ME-2 aplicadas a las tiras son 0,009 (para sueros con endometriosis, únicamente), 0,018; 0,036; 0,072 y 0,144 (para sueros de control, únicamente) miligramos por mililitro (mg/ml). La concentración óptima para discriminación entre pacientes y controles se estableció en 0,018 mg/ml como se designa por medio de la flecha a la derecha de las tiras de transferencias en línea. Una ventaja del ensayo de inmunotransferencias en línea es que muchas proteínas diferentes pueden ser interrogadas sobre una tira única por la reactividad con anticuerpos, y que proteínas adicionales no relacionadas están presentes sobre las tiras que actúan como controles internos. Se incluye un reactivo de control (monoclonal IgG antihumano de ratón) sobre cada tira para capturar IgG humano y actuar como control positivo. Se incubó cada tira con suero de una persona normal (control) o de un paciente con endometriosis confirmada. Los patrones de transferencias en línea para un total de 11 controles (A01, A02, A03, A06, A08, A15, A20, A21, A22, A23, y A24) se muestran en la Figura 16A. Además, se muestran 21 pacientes con endometriosis (DS10, DS11, DS12, DS13, DS14, DS17, DS19, DS20, DS21, DS22, DS24, DS25, DS26, DS27, DS28, DS29, DS30, DS31, DS32, DS33, y DS35) en la Figura 16B. La intensidad de la coloración de cada banda es indicativa de la reactividad del suero analizado con ME-2. En este panel seleccionado de transferencias en línea, ME-2 con una concentración de 0,018 mg/ml detectó 15 pacientes con endometriosis como positivos (DS012, DS17, DS19, DS20, DS21, DS22, DS24, DS25, DS26, DS27, DS28, DS30, DS31, DS33, y DS35). Además, 6 pacientes con endometriosis (DS10, DS11, DS13, DS14, DS29 y DS13) produjeron patrones de reactividad que fueron un poco menores. Entre los 11 controles normales, ME-2 no reaccionó con ninguno de ellos con los 0,018 mg/ml de corte aplicados a pacientes con endometriosis.

Las Figuras 17A y 17B muestran inmunotransferencias representativas en línea que ilustran la habilidad de la EPP2 recombinante para reaccionar con anticuerpos presentes en suero obtenidos a partir de pacientes con endometriosis, pero no en sueros normales de control. Cada tira contiene antígenos inmovilizados que fueron acanalados sobre la membrana en diferentes concentraciones. Las concentraciones de proteína para EPP2 son 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 y 0,25 miligramos por mililitro. La concentración óptima para discriminación entre pacientes y controles fue de 0,05 mg/ml como se designa por medio de la flecha a la derecha de las tiras de transferencias en línea. Una ventaja del ensayo de inmunotransferencias en línea es que muchas proteínas diferentes pueden ser interrogadas sobre una tira única por la reactividad con anticuerpos, y que proteínas adicionales no relacionadas están presentes sobre las tiras que actúan como controles internos. Se incluye un reactivo de control (monoclonal IgG antihumano de ratón) sobre cada tira para capturar IgG humano en la muestra y actuar como control positivo. Se incubó cada tira con suero de una persona normal (control) o de un paciente con endometriosis confirmada. Los patrones de transferencias en línea para un total de 11 controles (A01, A02, A03, A04, A05, A09, A13, A14, A16, A20, y A24) se muestran en la Figura 17A. Además, se muestran 39 pacientes con endometriosis (DS06, DS12, DS24, DS05, BBI01, BBI02, BBI03, BBI04, BBI05, BBI06, BBI07, BBI08, BBI09, BBI10, BBI11, BBI12, BBI13, BBI14, BBI15, BBI16, BBI20, BBI21, BBI22, BBI23, BBI24, BBI25, BBI26, BBI27, BBI28, BBi30, BBI31, BBI32, BBI34, BBI35, BBI36, BBI37, BBI38, BBI39, y BBI40) en la Figura 17B. La intensidad de la coloración de cada banda es indicativa de la reactividad del suero analizado con EPP2. En este panel seleccionado de transferencias en línea, EEP2 con una concentración de 0,05 mg/ml detectó 33 pacientes con endometriosis como positivos (DS06, DS12, DS24, DS05, BBI02, BBI03, BBI04,

ES 2 326 324 T3

BBI06, BBI07, BBI08, BBI09, BBI10, BBI11, BBI12, BBI13, BBI15, BBI16, BBI20, BBI22, BBI23, BBI25, BBI26, BBI27, BBI28, BBI30, BBI31, BBI32, BBI34, BBI35, BBI37, BBI38, BBI39, and BBI40). Además, 6 pacientes con endometriosis (BBI01, BBI05, BBI14, BBI21, BBI24, y BBI36) produjeron patrones de reactividad que fueron mucho menores. Entre los 11 controles normales, EPP2 no reaccionó fuertemente con ninguno de ellos con los 0,05 mg/ml de corte.

“Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de ocurrencia natural, y análogos sintéticos de ocurrencia no natural de los mismos enlazados a través de enlaces peptídicos, análogos relacionados de ocurrencia natural de los mismos. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar utilizando por ejemplo un sintetizador automatizado de polipéptidos. El término “proteína” típicamente se refiere a polipéptidos grandes. El término “péptido” típicamente se refiere a polipéptidos cortos.

Se utiliza aquí notación convencional para representar secuencias de péptidos: el extremo del lado izquierdo de la secuencia de un polipéptido es el terminal amino; el extremo del lado derecho de la secuencia de un polipéptido es el terminal carboxilo.

“Sustitución conservadora” se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido funcionalmente similar. Se debe entender que las reivindicaciones abarcan sustituciones conservadoras. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 20
1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
25 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
30 4) Arginina (R), Lisina (K);
5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
35 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

35 “Variante Alélica” se refiere a cualquiera entre dos o más formas polimórficas de un gen que ocupa el mismo locus genético. Las variaciones alélicas surgen naturalmente a través de una mutación, y pueden resultar en polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (no hay cambio en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos que tienen secuencias alteradas de aminoácidos. “Variantes alélicas” también se refiere a los ADNc derivados de transcriptos de ARNm de variantes alélicas genéticas, así como las proteínas codificadas por ellas.

45 Esta invención proporciona métodos para diagnosticar endometriosis en un individuo por medio de la detección en una muestra del individuo de una cantidad diagnóstica de un anticuerpo que se enlaza específicamente con el polipéptido ME-5, ME-2 o EPP2. Las muestras apropiadas de un paciente incluyen, sin limitación, saliva, sangre o un producto de la sangre (por ejemplo, suero), fluido peritoneal, orina, fluido menstrual, secreción vaginal. Los anticuerpos se pueden detectar por medio de cualquiera de los métodos para detectar proteínas descritos aquí. Sin embargo, los ensayos tipo sándwich son particularmente útiles. En una versión, todos los anticuerpos son capturados sobre una fase sólida, por ejemplo utilizando proteína A, y se detectan anticuerpos específicos para ME-2, ME-5 o EPP2 utilizando un polipéptido ME-2, ME-5 o EPP2 o fragmento de polipéptido directa o indirectamente marcado o teniendo un epítopo de ME-2, ME-5 o EPP2. En otra versión del ensayo, se puede utilizar ME-2, ME-5 o EPP2 o un fragmento antigénico de los mismos como la molécula de captura y se pueden detectar los anticuerpos capturados.

55 ME-2, ME-5 o EPP2 que son vertidos en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis son útiles en métodos de diagnóstico de endometriosis. Estos métodos incluyen la detección de ME-2, ME-5 o EPP2 en una muestra biológica de un individuo. Las muestras apropiadas incluyen, sin limitación, saliva, sangre o un producto de la sangre (por ejemplo, suero), orina, fluido menstrual, secreción vaginal y, en particular, fluido peritoneal. ME-2, ME-5 o EPP2 se pueden detectar por medio de cualquiera de los métodos descritos aquí. Cualquier detección de ME-2, ME-5 o EPP2 por encima del rango normal es un signo positivo en el diagnóstico de endometriosis.

60 La frase “sustancialmente idéntico”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60%, 80%, 90%, 95% ó 98% de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se los compara y alinea para correspondencia máxima, cuando se mide utilizando una de las siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por medio de inspección visual. Preferiblemente, existe identidad sustancial sobre una región de las secuencias que es al menos aproximadamente de 50 residuos de longitud, más preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y lo más preferible, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 residuos. En una modalidad más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre toda la longitud de las regiones de codificación.

ES 2 326 324 T3

Se describe aquí adicionalmente el aislamiento de moléculas de ADNc humano que codifican tres proteínas endometriales distintas y la caracterización de los correspondientes antígenos. Estos ADNc y los correspondientes antígenos han sido designados ME-2, ME-5 y EPP2 y las proteínas expresadas a partir de ellos son los objetivos de autoanticuerpos presentes en el suero de mujeres que sufren de endometriosis. Estas características de las proteínas ME-2, ME-5 y EPP2 las convierten en marcadores útiles para diagnóstico de enfermedad endometrial y esto se muestra en detalle en los Ejemplos que vienen a continuación.

Ejemplo 1

Identificación y Clonación de los ADNc de ME-5, ME-2 y EPP2

Se generó una biblioteca de ADNc de tejido de endometriosis utilizando ARN poli A⁺ aislado de un espécimen de tejido de endometriosis embebido profundamente donado por el Profesor Philip Koninckx de la Universidad católica de Leuven. Se aisló el ARN total del tejido utilizando reactivo Trizol (BioRad Laboratories; Hercules, CA), y se preparó ARN poli A⁺ por hibridación con partículas magnéticas acopladas a oligo poli T utilizando un kit comercial (PolyATract; Promega; Madison, WI). Se llevó a cabo la construcción de la biblioteca utilizando el sistema del vector Lambda ZAP® II siguiendo las instrucciones obtenidas del proveedor (Stratagene; San Diego, CA). Se identificaron los clones iniciales de ADNc de ME-5 y ME-2 por medio de inmunoselección utilizando, como anticuerpo primario, un solo espécimen de suero de paciente con endometriosis obtenido de una mujer diagnosticada con enfermedad leve. Este suero fue adsorbido de anticuerpos no específicos anti-*E. coli*/fago lambda por dilución de los sueros 1: 50 en un lisado comercial de fago *E. coli* (Stratagene; San Diego, CA) de acuerdo con el protocolo suministrado por el proveedor. En una serie separada de experimentos, se identificó el clon inicial de ADNc de EPP2 en un protocolo similar de inmunoselección excepto porque, como anticuerpo primario, se utilizó una combinación de diez especímenes en suero de pacientes con endometriosis. Los sueros en esta combinación fueron de mujeres con diferentes fases de enfermedad endometrial. Nuevamente se adsorbió el suero de anticuerpos no específicos anti-*E. coli*/fago lambda por dilución con un lisado comercial de fago *E. coli* (Stratagene; San Diego, CA) como se describió anteriormente. El segundo anticuerpo para todos los experimentos de selección fue anticuerpo monoclonal marcado con ¹²⁵I reactivo con immunoglobulina humana. Se utilizó suero humano negativo de control para seleccionar los clones en paralelo para verificar la reactividad. Los clones inmunoreactivos fueron purificados tres veces en placa y rescatados por medio de escisión *in vivo* dentro del vector fágimido pBluescript® SK(-) utilizando métodos suministrados por el fabricante (Stratagene; San Diego, CA).

Ejemplo 2

Caracterización del ADNc de ME-5, ME-2 y EPP2 y Proteína

El análisis de secuencia de ambas hebras de cada uno de los clones originales aislados de ME-5, ME-2 y EPP2 se llevó a cabo en un Secuenciador de ADN ABI Biosystems 373 (PE Applied Biosystems; Foster City, CA). Las secuencias de ácido nucleico así generadas fueron analizadas utilizando el software Bionet para identificar características del ácido nucleico y la proteína y para comparaciones de homología con secuencias de ácido nucleico y proteína presentes en la base de datos.

La secuencia de ADNc de ME-5 se presenta en la figura 1A (SEQ ID NO: 1) y tiene un tamaño de 1.279 pares de bases excluyendo la pista poli dA. Se identificó una secuencia 5' no codificadora de 112 pares de bases justo secuencia arriba del codón de inicio ATG sospechoso. Existe una secuencia 3' no codificadora de 254 pares de bases secuencia abajo del codón de detención TGA y esta es seguida por un tramo de residuos dA que corresponderían a la cola poli A en el extremo 3' del ARNm. Tanto el codón de inicio como el de detención están destacados en negrita en las Figuras 1A y 1B. La secuencia de codificación de ME-5 se muestra en la Figura 1B (SEQ ID NO: 2) como la predicha a partir de la secuencia completa aislada de ADNc (Figura 1A). La región de codificación tiene un tamaño de 912 pares de bases, incluidos los codones de inicio y detención. El ADNc codifica para una proteína predicha de 303 aminoácidos mostrada en la Figura 1C (SEQ ID NO: 3) y el peso molecular calculado fue aproximadamente de 35.000 Daltons. El producto de traducción es ligeramente ácido con un valor isoeléctrico calculado de 5,7.

Se utilizaron búsquedas en las bases de datos asistidas por computador (National Center for Biotechnology Information [NCBI] Basic Local Alignment Search Tool [BLAST]) para llevar a cabo comparaciones de homología con secuencias contenidas en la base de datos de ácido nucleico del GenBank. Se descubrió que otros dos laboratorios trabajando sobre diferentes proyectos aislaron independientemente una molécula de ADNc esencialmente idéntica.

Scanlan y colaboradores aislaron primero el ADNc idéntico de 1-NY-CO-7 utilizando un proceso descrito en un artículo: "Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies" publicado por Scanlan y colaboradores [Int. J. Cancer 76, 652-658 (1998)]. La aproximación utilizada por estas personas fue similar a aquella empleada para el descubrimiento del ADNc de ME-5 en que estos investigadores seleccionaron bibliotecas de ADNc de cáncer colorectal con suero de pacientes con cáncer colorectal. La comparación de la secuencia de ME-5 con aquella de 1-NY-CO-7 reveló un número sustancial de diferencias entre las dos. Primero, en el manuscrito de la secuencia del ARNm de 1-NY-CO-7 se reportó que era quizás 1,22 kb ligeramente más pequeña que la secuencia de ME-5 de esta invención. Segundo, se reportó que la proteína de 1-NY-CO-7 era de un tamaño 356 aminoácidos que

ES 2 326 324 T3

es considerablemente más larga que la proteína ME-5 predicha. Finalmente, hubo tres faltas de correspondencia en las bases de la porción carboxi terminal de las dos secuencias y dos de estas resultaron en cambios de aminoácidos. Los cambios de nucleótidos fueron en el nucleótido 807 (C -> G [ocurre en la tercera posición del codón sin cambio del aminoácido -> prolina]), 814 (C -> G [arginina -> glicina]), y 838 (C -> T [leucina -> fenilalanina]) con relación al dominio de codificación de ME-5. Los autores comentaron que la secuencia de 1-NY-CO-7 era nueva (poca o ninguna homología con las secuencias de ADN enlistadas en las bases de datos del GenBank/EMBO con la excepción de las etiquetas de la secuencia expresada), y teniendo la proteína repeticiones tetratricopéptido (TPR, ver más adelante). La secuencia de 1-NY-CO-7 no apareció entre estas secuencias específicas de colon que fueron caracterizadas en el artículo, en vez de eso, fue enviada directamente al GenBank sin una caracterización adicional del ácido nucleico o la proteína. Cuando se compararon las secuencias de 1-NY-CO-7 en el GenBank con aquellas de ME-5, fueron idénticas excepto por las tres faltas de correspondencia de los nucleótidos descritas anteriormente.

Segundo, Ballinger y colaboradores identificaron el terminal carboxilo idéntico de la proteína que interactúa con Hsp70 (CHIP) utilizando un proceso drásticamente diferente descrito en un artículo publicado: "Identification of CHIP, a novel tetratricopéptido repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions" Ballinger y colaboradores [Mol. Cell. Biol. 19, 4535-4545 (1999)]. En este artículo los autores se interesaron en el aislamiento de nuevas proteínas que contienen repeticiones de tetratricopéptido. Se identificó la secuencia de CHIP por medio de la selección de una biblioteca de ADNc cardiaco con la secuencia de ADNc para la proteína humana CyP-40 con condiciones de rigurosidad diferentes. Una hibridación de baja rigurosidad (42°C) produjo 12 clones que no hibridaron con mayor rigurosidad (55°C). La caracterización de los clones reveló que 8 de ellos correspondieron a CyP-40 humana, y 4 clones que codificaron CHIP que fue una secuencia sin homología con genes conocidos. La caracterización de CHIP reveló que interactúa tanto con Hsc70 como con Hsp70 por medio de enlazamiento con el terminal carboxilo de estas proteínas a través de secuencias dentro del terminal amino de CHIP. En forma muy interesante CHIP recombinante inhibió la actividad de la ATPasa estimulada con Hsp40 de Hsc70 y Hsp70 sugiriendo que reguló la reacción más adelante del ciclo de enlazamiento del sustrato.

Ambas secuencias tienen una homología casi perfecta con las secuencias del ácido nucleico y la proteína de ME-5 de esta invención. Sin embargo, la utilidad anticipada de ME-5 en el diagnóstico de la endometriosis no fue contemplada por los artículos anteriormente mencionados.

Se presenta la secuencia de ADNc de ME-2 en la Figura 2A (SEQ ID NO: 4) y tiene un tamaño de 1.332 pares de bases excluyendo la pista poli dA. Se identificó una secuencia 5' no codificadora de 54 pares de bases justo secuencia arriba del codón de inicio ATG sospechoso. Existe una secuencia 3' no codificadora de 95 pares de bases secuencia abajo del codón de detención TAG y esta es seguida por un tramo de residuos dA que corresponderían a la cola poli A en el extremo 3' del ARNm. Tanto el codón de inicio como el de detención están destacados en negrilla en las Figuras 2A y 2B. La secuencia de codificación de ME-2 se muestra en la Figura 2B (SEQ ID NO: 5) como la predicha a partir de la secuencia completa aislada de ADNc (Figura 2A). La región de codificación tiene un tamaño de 1182 pares de bases, incluidos los codones de inicio y detención. El ADNc codifica para una proteína predicha de 393 aminoácidos mostrada en la Figura 2C (SEQ ID NO: 6) y el peso molecular calculado fue aproximadamente de 45.000 Daltons. El producto de traducción es ligeramente ácido con un valor isoeléctrico calculado de 8,8.

Se utilizaron búsquedas en las bases de datos asistidas por computador (National Center for Biotechnology Information [NCBI] Basic Local Alignment Search Tool [BLAST]) para llevar a cabo comparaciones de homología con el ADNc de ME-2 con secuencias contenidas en la base de datos de ácido nucleico del GenBank. Se descubrió que mientras existan varias dependencias por grupos involucrados con análisis de la secuencia de genoma humano todos los documentos son dependencias directas. Además, ninguna de estas dependencias ha sido publicada en la literatura científica y todas se refieren a "proteína desconocida" o a "proteína hipotética" o a "producto proteínico no identificado" y no a un producto definido o función. Estas pueden encontrarse en los números de acceso GI: 12652526, GI: 22761484, y GI: 24431994 por ejemplo. Por lo tanto, aunque las secuencias correspondientes al ADNc de ME-2 y a la proteína están presentes en el dominio público, no se conoce la naturaleza y la intervención de la proteína en la endometriosis ciertamente no es anticipada por esta información pública. En consecuencia, las secuencias de la proteína y del ADNc de ME-2 son únicas y están implicadas en forma exclusiva en la enfermedad humana de la endometriosis por las descripciones contenidas en esta invención.

Se presenta la secuencia de ADNc de EPP2 en la Figura 3A (SEQ ID NO: 7) y tiene un tamaño de 868 pares de bases excluyendo la pista poli dA. Se identificó una secuencia 5' no codificadora de 45 pares de bases justo secuencia arriba del codón de inicio ATG sospechoso. Existe una secuencia 3' no codificadora de 522 pares de bases secuencia abajo del codón de detención TAA y esta es seguida por un tramo de residuos dA que corresponderían a la cola poli A en el extremo 3' del ARNm. Tanto el codón de inicio como el de detención están destacados en negrilla en las Figuras 3A y 3B. La secuencia de codificación de EPP2 se muestra en la Figura 3B (SEQ ID NO: 8) como la predicha a partir de la secuencia completa aislada de ADNc (Figura 3A). La región de codificación tiene un tamaño de 300 pares de bases, incluidos los codones de inicio y detención. El ADNc codifica para una proteína predicha de 99 aminoácidos mostrada en la Figura 3C (SEQ ID NO: 9) y el peso molecular calculado fue aproximadamente de 9.300 Daltons. En forma muy interesante, 18 de los aminoácidos son residuos de arginina, por lo tanto el producto de traducción es muy básico con un valor isoeléctrico calculado de 12,5.

Se utilizaron búsquedas en las bases de datos asistidas por computador (National Center for Biotechnology Information [NCBI] Basic Local Alignment Search Tool [BLAST]) para llevar a cabo comparaciones de homología con el

ES 2 326 324 T3

ADNc de EPP2 con secuencias contenidas en la base de datos de ácido nucleico del GenBank. En la forma descrita anteriormente para ME-2, se descubrió que EPP2 estaba también representado por varias dependencias directas de grupos involucrados con análisis de la secuencia de genoma humano. Además, como se describió anteriormente, ninguna de estas dependencias ha sido publicada en la literatura científica y todas se refieren a “proteína desconocida” o

- 5 a “proteína hipotética” o a “producto proteínico no identificado” y no a un producto definido o función. Estas pueden encontrarse en los números de acceso GI: 12652993, GI: 24308450, y GI: 20892293 por ejemplo. Por lo tanto, aunque las secuencias correspondientes al ADNc de EPP2 y a la proteína están presentes en el dominio público, no se conoce la naturaleza y la intervención de la proteína en la endometriosis ciertamente no es anticipada por esta información pública. En consecuencia, las secuencias de la proteína y del ADNc de EPP2 son únicas y están implicadas en forma

10 exclusiva en la enfermedad humana de la endometriosis por las descripciones contenidas en esta invención.

Ejemplo 3

15 *Transferencias tipo Northern con Sondas Marcadas en Forma Radioactiva de ME-5, ME-2 y EPP2: Patrón del Carácter y Expresión del ARNm*

El perfil de expresión génica de ME-5 de tejidos humanos normales se hizo llevando a cabo el análisis de transferencias tipo Northern con un Multiple Tissue Northern Blot comercial (BD Biosciences; San Diego, CA), cuyos resultados se presentan en la Figura 4. La transferencia comercial tipo Northern contenía ARN de los siguientes tejidos: bazo, timo, próstata, testículo, útero, intestino delgado, colon (sin mucosa), y leucocitos de sangre periférica. Se aisló la secuencia completa de codificación de 912 pares de bases por medio de electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y marcado con ^{32}P por medio de imprimación aleatoria. Se utilizó una sonda de ME-5 marcada con ^{32}P para hibridación con la transferencia tipo Northern utilizando el procedimiento suministrado por el fabricante.

20 25 Después de lavar la transferencia se la expuso a una película de rayos X. Después del revelado de la película, una banda de aproximadamente 1,4 kb sobre la transferencia de Northern corresponde al transcripto de ME-5 del tamaño esperado (Figura 4). El transcripto puede ser observado en todos los tejidos y es particularmente abundante en tejidos de próstata, testículo y útero.

30 35 El perfil de expresión génica de ME-2 de tejidos humanos normales se hizo llevando a cabo el análisis de transferencias tipo Northern con un Multiple Tissue Northern Blot comercial (BD Biosciences; San Diego, CA), cuyos resultados se presentan en la Figura 5. La transferencia comercial tipo Northern contenía ARN de los siguientes tejidos: bazo, timo, próstata, testículo, útero, intestino delgado, colon (sin mucosa), y leucocitos de sangre periférica. Se aisló la secuencia completa de codificación de 1182 pares de bases por medio de electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y marcado con ^{32}P por medio de imprimación aleatoria. Se utilizó una sonda de ME-2 marcada con ^{32}P para hibridación con la transferencia tipo Northern utilizando el procedimiento suministrado por el fabricante. Despues de lavar la transferencia se la expuso a una película de rayos X. Despues del revelado de la película, una banda de aproximadamente 2,0 kb sobre la transferencia de Northern corresponde al transcripto de ME-2 que hibrida con la sonda marcada (Figura 5). El transcripto puede ser observado en todos los tejidos y es particularmente abundante en próstata y testículo. Además, se observaron buenos niveles de hibridación entre los ARN expresados en tejidos de bazo, útero, intestino delgado, colon, y linfocitos de sangre periférica. En forma muy interesante, a pesar del patrón observado con los linfocitos de sangre periférica, se podía detectar relativamente poca señal en tejido de timo.

40 45 50 55 El perfil de expresión génica de EPP2 de tejidos humanos normales se hizo llevando a cabo el análisis de transferencias tipo Northern con un Multiple Tissue Northern Blot comercial (BD Biosciences; San Diego, CA), cuyos resultados se presentan en la Figura 6. La transferencia comercial tipo Northern contenía ARN de los siguientes tejidos: bazo, timo, próstata, testículo, útero, intestino delgado, colon (sin mucosa), y leucocitos de sangre periférica. Se aisló la secuencia completa de 300 pares de bases que codifica a EPP2 por medio de electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y marcado con ^{32}P por medio de imprimación aleatoria. Se utilizó una sonda de EPP2 marcada con ^{32}P para hibridación con la transferencia tipo Northern utilizando el procedimiento suministrado por el fabricante. Despues de lavar la transferencia se la expuso a una película de rayos X. Despues del revelado de la película, una banda de aproximadamente 1,0 kb sobre la transferencia de Northern corresponde al transcripto de EPP2 que hibrida con la sonda marcada (Figura 6). El transcripto puede ser observado en todos los tejidos y es más abundante en tejidos de próstata, testículo, colon y linfocitos de sangre periférica. Además, está presente el transcripto pero los niveles relativos de hibridación son menores entre los ARN expresados en tejidos de bazo, timo, útero e intestino delgado.

Ejemplo 4

60 *Expresión de Proteínas Recombinantes ME-5, ME-2 y EPP2 en una Célula Huésped de Insecto*

El antígeno ME-5 fue clonado para expresión como una proteína de fusión etiquetada con histidina 6X en células de insecto. La secuencia del inserto de ADNc de ME-5 fue generada por medio de amplificación con PCR utilizando iniciadores específicos que flanquearon la región de codificación de 912 pb. Los sitios únicos para las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI fueron incorporados dentro de los iniciadores para mantener el marco de lectura de ME-5 con las secuencias del vector. Se digirieron los amplicones de la PCR con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI (Stratagene; San Diego, CA) y se purificó por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se digirió también el vector de transferencia de la célula de insecto Blue Bac His2a (Stratagene; San Diego, CA) con las enzimas de restricción

ES 2 326 324 T3

Bam HI y Eco RI y se las trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Se ligó el inserto de ADNc de ME-5 con el vector y se transformaron las bacterias competentes. Se cultivaron los clones aislados individuales, se aisló el ADN del plásmido, y se digirió con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI. Se escogieron los clones que producen una banda de aproximadamente 900 pb además del vector lineal. Varios candidatos fueron caracterizados adicionalmente por medio del análisis de la secuencia de ADN para verificar que no se presentaron cambios durante el proceso de amplificación por PCR y clonación. Se confirmó un clon para no tener mutaciones y este fue utilizado para el desarrollo de vectores recombinantes de baculovirus. Se generaron baculovirus recombinantes por medio de cotransfección de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus y el vector de transferencia de ME-5. Los baculovirus fueron aislados por medio de purificación en placa y utilizados para evaluar patrones de expresión en cultivos piloto. El virus baculovirus recombinante y los cultivos a escala piloto fueron evaluados por patrones de expresión. Se identificó un clon de baculovirus recombinante que expresó un antígeno de aproximadamente 38 kD, que fue detectado tanto en la fracción soluble como en la insoluble de los lisados de células de insecto. Se expandió el clon en existencias a gran escala del virus para expresión de proteína recombinante ME-5. Esto fue utilizado para infectar un cultivo a gran escala de células de insecto Sf9. El patrón de expresión se ilustra en la Figura 7, y se visualiza mejor por medio del análisis de transferencias tipo Western (Figura 7). Se confirmó la presencia de ME-5 recombinante con un anticuerpo monoclonal comercial anti-HisG (Invitrogen; Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario de IgG antiratón de conejo marcado con ¹²⁵I. Esto confirma la presencia de una proteína etiquetada con histidina 6X de aproximadamente 38 kD que es el peso molecular esperado para ME-5. La proteína recombinante fue detectada tanto en la fracción soluble como en la insoluble de los lisados de célula de insecto, pero parece que se localiza ligeramente más antígeno en la fracción soluble. Además, algo de antígeno estaba presente en el PBS utilizado para lavar las células infectadas antes de la lisis.

Se clonó el antígeno ME-2 para expresión como una proteína de fusión etiquetada con histidina 6X en células de insecto como se describió anteriormente para la actividad de ME-5. La secuencia del inserto de ADNc de ME-2 fue generada por medio de amplificación por PCR utilizando iniciadores específicos que flanqueaban la región de codificación de 1182 pb. Los sitios únicos para las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI fueron incorporados dentro de los iniciadores para mantener el marco de lectura de ME-2 con las secuencias del vector. Se digirieron los amplicones de la PCR con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI (Stratagene; San Diego, CA) y se purificó por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se digirió también el vector de transferencia de la célula de insecto Blue Bac His2a (Stratagene; San Diego, CA) con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI y se las trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Se ligó el inserto de ADNc de ME-2 con el vector y se transformaron las bacterias competentes. Se cultivaron los clones aislados individuales, se aisló el ADN del plásmido, y se digirió con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI. Se escogieron los clones que producen una banda de aproximadamente 1100 pb además del vector lineal. Varios candidatos fueron caracterizados adicionalmente por medio del análisis de la secuencia de ADN para verificar que no se presentaron cambios durante el proceso de amplificación por PCR y clonación. Se confirmó un clon para no tener mutaciones y este fue utilizado para el desarrollo de vectores recombinantes de baculovirus. Se generaron baculovirus recombinantes por medio de cotransfección de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus y el vector de transferencia de ME-2. Los baculovirus fueron aislados por medio de purificación en placa y utilizados para evaluar patrones de expresión en cultivos piloto. El virus baculovirus recombinante y los cultivos a escala piloto fueron evaluados por patrones de expresión. Se identificó un clon de baculovirus recombinante que expresó un antígeno de aproximadamente 49 kD, que fue detectado tanto en la fracción soluble como en la insoluble de los lisados de células de insecto. Se expandió el clon en existencias a gran escala del virus para expresión de proteína recombinante ME-2. Esto fue utilizado para infectar un cultivo a gran escala de células de insecto Sf9. El patrón de expresión se ilustra en la Figura 8, y se visualiza mejor por medio del análisis de transferencias tipo Western (Figura 8). Se confirmó la presencia de ME-2 recombinante con un anticuerpo monoclonal comercial anti-HisG (Invitrogen; Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario de IgG antiratón de conejo marcado con ¹²⁵I. Esto confirma la presencia de una proteína etiquetada con histidina 6X de aproximadamente 49 kD que es el peso molecular esperado para ME-2. La proteína recombinante fue detectada tanto en la fracción soluble como en la insoluble de los lisados de célula de insecto, pero parece que se localiza ligeramente más antígeno en la fracción soluble. Además, algo de antígeno estaba presente en el PBS utilizado para lavar las células infectadas antes de la lisis.

Se clonó el antígeno EPP2 para expresión como una proteína de fusión etiquetada con histidina 6X en células de insecto como se describió anteriormente. La secuencia del inserto de ADNc de EPP2 fue generada por medio de amplificación por PCR utilizando iniciadores específicos que flanqueaban la región de codificación de 300 pb. Los sitios únicos para las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI fueron incorporados dentro de los iniciadores para mantener el marco de lectura de EPP2 con las secuencias del vector. Se digirieron los amplicones de la PCR con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI (Stratagene; San Diego, CA) y se purificó por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se digirió también el vector de transferencia de la célula de insecto Blue Bac His2a (Stratagene; San Diego, CA) con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI y se las trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Se ligó el inserto de ADNc de EPP2 con el vector y se transformaron las bacterias competentes. Se cultivaron los clones aislados individuales, se aisló el ADN del plásmido, y se digirió con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI. Se escogieron los clones que producen una banda de aproximadamente 300 pb además del vector lineal. Varios candidatos fueron caracterizados adicionalmente por medio del análisis de la secuencia de ADN para verificar que no se presentaron cambios durante el proceso de amplificación por PCR y clonación. Se confirmó un clon para no tener mutaciones y este fue utilizado para el desarrollo de vectores recombinantes de baculovirus. Se generaron baculovirus recombinantes por medio de cotransfección de células de insecto Sf9 con ADN de baculovirus y el vector de transferencia de EPP2. Los baculovirus fueron aislados por medio de purificación en placa y utilizados para evaluar patrones de expresión en cultivos piloto. El virus baculovirus recombinante y los cultivos a escala piloto fueron evaluados por patrones de expresión.

expresión. Se identificó un clon de baculovirus recombinante que expresó un antígeno de aproximadamente 9 kD, que fue detectado tanto en la fracción soluble como en la insoluble de los lisados de células de insecto. Se expandió el clon en existencias a gran escala del virus para expresión de proteína recombinante EPP2. Esto fue utilizado para infectar un cultivo a gran escala de células de insecto Sf9. El patrón de expresión se ilustra en la Figura 9, y se visualiza mejor

- 5 por medio del análisis de transferencias tipo Western (Figura 9). Se confirmó la presencia de EPP2 recombinante con un anticuerpo monoclonal comercial anti-HisG (Invitrogen; Carlsbad, CA) seguido por un anticuerpo secundario de IgG antiratón de conejo marcado con ^{125}I . Esto confirma la presencia de una proteína etiquetada con histidina 6X de 10 aproximadamente 9 kD que es el peso molecular esperado para EPP2. La proteína recombinante fue detectada tanto más antígeno en la fracción soluble. En contraste con los patrones observados con la expresión de la proteína ME-5 y

ME-2, no estaba presente antígeno EPP2 en el PBS utilizado para lavar las células infectadas antes de la lisis.

Ejemplo 5

15 *Purificación de Proteína Recombinante ME-5, ME-2 y EPP2 a partir de Células de Insecto*

Los estudios adicionales de los antígenos ME-5, ME-2 y EPP2 requieren de cantidades sustanciales de proteína 20 aislada. Específicamente, se las requiere para evaluar la reactividad de las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 con especímenes de suero de una paciente con endometriosis para establecer relevancia clínica. Se aislaron los antígenos recombinantes ME-5, ME-2 y EPP2 de la fracción soluble o del lisado celular completo por medio de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC).

25 Se aisló el antígeno recombinante ME-5 de la fracción soluble del lisado de células de insecto. En resumen, se recolectaron las células de insecto infectadas con baculovirus recombinante ME-5 después de tres días de infección por centrifugación. Se lavaron las células dos veces con PBS y se congeló el precipitado celular durante una hora a -70°C. Despues de descongelar el precipitado celular se lo suspendió en amortiguador de enlazamiento (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa para tejidos de mamífero (Sigma; St. Louis, MO). Se sonicó el lisado, y se lo centrifugó a 18.000 rpm, 4°C durante 20 minutos para separar las fracciones 30 soluble e insoluble. Se dializó la fracción soluble contra amortiguador de enlazamiento, y se centrifugó a 18.000 rpm, 4°C para remover impurezas que podrían afectar el desempeño de la columna. Se equilibró la resina de Sefarosa de quelación cargada con níquel (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) dos veces con un volumen de columna 2X de amortiguador de enlazamiento. Se incubó la resina con el lisado de células de insecto de ME-5 durante 20 minutos sobre un balancín a temperatura ambiente. Se cargó la mezcla de resina/lisado sobre una columna y se lavó con 40 35 volúmenes de columna del amortiguador de Lavado de Columna A20 (imidazol 20 mM; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Se eluyó la proteína enlazada ME-5 de la columna con amortiguador de elución (imidazol 500 mM; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). Se añadió un cóctel inhibidor de proteasa a las fracciones de elución reunidas y se midió la concentración de proteína por medio del ensayo BCA (Pierce; Rockford, IL) utilizando una curva estándar de BSA. Se analizaron las muestras de proteína eluida por SDS PAGE seguido por coloración con azul de Coomassie o transferencia a nitrocelulosa y transferencia tipo Western como se muestra en la Figura 10. Se dividieron tales preparaciones aisladas de proteína ME-5 en alícuotas y se almacenó a -20°C con glicerol al 30%.

45 Se aisló también el antígeno recombinante ME-2 de la fracción soluble del lisado de células de insecto. En resumen, se recolectaron las células de insecto infectadas con baculovirus recombinante ME-2 después de tres días de infección por centrifugación. Se lavaron las células con PBS y se lisaron las células como se describió anteriormente. Después de diálisis de la fracción soluble se permitió el enlazamiento con la resina de Sefarosa de quelación cargada con níquel (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se cargó la mezcla de resina/lisado sobre una columna y se lavó secuencialmente con amortiguador de enlazamiento desnaturizante A10 50 (imidazol 10 mM; NaCl 1M; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol al 10%, urea 6M), A15 (amortiguador A10 que contiene imidazol 15 mM), y A20 (amortiguador A10 con imidazol 20 mM). Se eluyó la proteína enlazada ME-2 de la columna con amortiguador de elución (imidazol 500 mM; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). Se añadió un cóctel inhibidor de proteasa a las fracciones de elución reunidas y se midió la concentración de proteína por medio del ensayo BCA (Pierce; Rockford, IL) utilizando una curva estándar de BSA. Se analizaron las muestras de proteína eluida por SDS PAGE seguido por coloración con azul de Coomassie o transferencia a nitrocelulosa y transferencia 55 tipo Western como se muestra en la Figura 11. Se dividieron tales preparaciones aisladas de proteína ME-2 en alícuotas y se almacenó a -20°C con glicerol al 30%.

60 Se aisló el antígeno recombinante EPP2 del lisado completo de células de insecto. Se recolectaron las células de insecto infectadas con baculovirus recombinante EPP2 después de tres días de infección por centrifugación. Se lavaron las células dos veces con PBS y se congeló el precipitado celular durante una hora a -70°C. Despues de descongelar el precipitado celular se lo suspendió en amortiguador de enlazamiento desnaturizante (NaCl 750 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol al 10%, clorhidrato de guanidina 6M) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa para tejidos de mamífero (Sigma; St. Louis, MO). Se sonicó el lisado, y se centrifugó para separar las fracciones soluble 65 e insoluble. Se le permitió a la fracción soluble enlazarse con resina de Sefarosa de quelación cargada con níquel (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se cargó la resina sobre una columna y se lavó secuencialmente con amortiguador de enlazamiento desnaturizante A10 (imidazol 10 mM; NaCl 1M; Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol al 10%, urea 6M), A15 (amortiguador A10 que contiene imidazol 15 mM), y A20 (amortiguador A10 con imidazol 20 mM), A25 (amortiguador A10 con imidazol 25 mM), y A30 (lo mismo

ES 2 326 324 T3

que el amortiguador A10 pero con imidazol 30 mM). Se eluyó la proteína aislada EPP2 con amortiguador de elusión desnaturizante (imidazol 250 mM; NaCl 1M; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, glicerol al 10%, urea 6M). Se añadió un cóctel inhibidor de proteasa a las fracciones de elusión reunidas y se dializó la proteína EPP2 contra amortiguador d bicarbonato 0,2M con NaCl 0,5M y cisteína/cistina para remover la urea. Después de la diáisis se concentran las

- 5 muestras si es necesario sobre Aquacide y se midió la concentración de proteína por medio del ensayo BCA (Pierce; Rockford, IL) utilizando una curva estándar de BSA. Se analizaron las muestras de proteína aislada EPP2 por SDS PAGE seguido por Coomassie y transferencia tipo Western como se muestra en la Figura 12. Las muestras de proteína se almacenan a -20°C con glicerol al 30%. Tales preparaciones aisladas de proteína EPP2 se dividen en alícuotas y se almacena a -20°C con glicerol al 30%.

10

Ejemplo 6

Desarrollo de Anticuerpos

15

- Los anticuerpos monoclonales para la proteína ME-5 fueron producidos utilizando métodos estándar (G. Galfre y colaboradores [1977] Nature 266: 550) con modificaciones (V. T. Oi y L. A. Herzenberg [1980] En B. B. Mishell y S.M. Shiigi [eds.] Selected Method in Cellular Immunology [San Francisco: W. H. Freeman]). Tales anticuerpos monoclonales reactivos son valiosos para estudios adicionales del carácter de la proteína ME-5, y para ayudar al desarrollo de inmunoensayos para determinar el significado clínico de la proteína en pacientes con endometriosis. Se inmunizaron ratones (BALB/c) con antígeno recombinante ME-5 aislado y la respuesta del anticuerpo al antígeno monitoreado en estos animales por medio de técnicas de ELISA y transferencias tipo Western con el suero de los animales. Cuando la respuesta del anticuerpo fue significativa, los animales recibieron un refuerzo con otra inmunización con el antígeno ME-5. Tres días después se removió el bazo de un animal y se aislaron las células inmunes del órgano. Se fusionaron las células aisladas de bazo con la línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 que no produce immunoglobulina (M. Shulman y colaboradores [1978] Nature 276: 269). Se seleccionaron las células de hibridoma resultantes en medio de cultivo que contenía reactivos HAT. Se clonaron las células candidatas de hibridoma un mínimo de dos veces limitando la dilución y se seleccionaron los clones por medio de ELISA utilizando antígeno aislado ME-5. Se encontró que una línea celular de hibridoma denominada 2D1 reacciona particularmente bien con el antígeno aislado ME-5 y fue seleccionada para experimentos adicionales.

20

Ejemplo 7

Identificación de Antígeno Nativo ME-5 y Distribución en el Tejido

25

- Inicialmente el 2D1 monoclonal fue utilizado en experimentos de transferencias tipo Western sobre extractos de proteína obtenidos de células cultivadas de carcinoma endometrial RL95-2. Las células cultivadas RL95-2 fueron lisadas por medio de sonicación, y se removieron los residuos insolubles por centrifugación. Se analizó una porción de la fracción soluble sobre geles SDS PAGE adyacentes a una muestra de proteína recombinante ME-5 aislada. La Figura 13 muestra el patrón de análisis de transferencias tipo Western obtenido con el anticuerpo monoclonal 2D1 anti-ME-5. El monoclonal reaccionó bien con el antígeno recombinante aislado y se observó la reactividad de 2D1 con un peso molecular estimado de 38 kD. En el extracto de proteína RL95-2 existía una banda clara de reactividad con la proteína natural ME-5 que parecía ser ligeramente mayor que la recombinante aislada.

30

- Estos estudios del antígeno natural ME-5 fueron ampliados para incluir extractos de tejido obtenidos a partir de diferentes órganos humanos. En estos experimentos de transferencia tipo Western se estudiaron diferentes tejidos incluidos los de bazo, cerebro, pulmón, corazón, hígado, ovario, placenta, testículo, músculo esquelético y riñón humanos. Se separaron extractos de proteína de tejido humano comercialmente disponibles (Protein Medleys: BD Biosciences; San Diego, CA) por medio de electroforesis sobre geles SDS PAGE utilizando las instrucciones suministradas por el fabricante. Se evaluaron los extractos de proteína por medio de transferencias tipo Western utilizando el monoclonal 2D1 anti-ME-5 como anticuerpo primario y se detectaron los complejos inmunes con un anticuerpo antiratón marcado con ¹²⁵I. Los resultados se muestran en la Figura 14 y había una banda fuerte de reactividad con la proteína recombinante ME-5 aislada incluida como control. Además, la proteína natural ME-5 parece estar presente en casi todos los tejidos examinados, y apropiadamente la proteína parece estar presente en las concentraciones más altas en tejido de ovario. La presencia de la proteína ME-5 en otro tejido reproductivo lleva a suponer que el antígeno puede ser expresado naturalmente en niveles altos en esta clase de órganos. Por lo tanto, es probable que ME-5 pueda jugar un papel principal en la regulación de las funciones que se presentan en el sistema reproductivo. Por consiguiente, sería más probable que ME-5 sea el objetivo de anticuerpos anti-endometriales generados durante la endometriosis. Se registraron también buenos niveles de expresión en extractos de tejido de corazón, hígado y riñón. Esta es alentadora también debido a que la proteína CHIP discutida en el Ejemplo 2 fue aislada de una biblioteca de ADNc cardíaco. Se encontraron niveles algo menores pero detectables de ME-5 natural en la mayoría de los extractos restantes de tejido.

35

ES 2 326 324 T3

Ejemplo 8

Hallazgos Clínicos: Reactividad de los Antígenos ME-5, ME-2 y EPP2 con Sueros de Pacientes con Endometriosis

- 5 Se evaluó el significado clínico de las proteínas ME-5, ME-2 y EPP2 utilizando los estudios de inmunotransferencias para medir la reactividad con los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con endometriosis. Estos experimentos de transferencias en línea fueron diseñados para identificar anticuerpos IgG en suero humano reactivos con las proteínas recombinantes. En resumen, la transferencia en línea utiliza los antígenos de las proteína recombinantes ME-5, ME-2 y EPP2 que están inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa en una ubicación discreta y en la forma de una línea que abarca la superficie. Además, se incluye una línea de control de reactivo para verificar que se hayan seguido las condiciones específicas del ensayo. Después de cortar las membranas en una cantidad de tiras individuales, estas fueron incubadas con suero de un paciente individual, y la IgG del paciente se enlaza con antígenos inmovilizados en las líneas discretas. Se observan complejos inmunes por medio de la incubación de las tiras con anticuerpos IgG antihumanos marcados con enzima y la posterior reacción del sustrato. Cuando se evalúan estos experimentos, se compararon las tiras tratadas con sueros de control con las tiras incubadas con sueros de pacientes con endometriosis para facilitar el análisis de la intensidad de coloración de cada banda. El espécimen de suero del paciente que muestra reactividad con los antígenos ME-5, ME-2 y EPP2 es considerado positivo si la intensidad de la señal es más fuerte que la obtenida con la proteína sobre las tiras del paciente de control.
- 10 20 25 30 35 40 Algunas tiras representativas de transferencias en línea que contienen antígeno ME-5 tratadas con suero de paciente normal de control se muestran en la Figura 15A. En contraste, el patrón de reactividad de pacientes representativos con endometriosis con tiras similares es mostrado en la Figura 15B. Los sueros de pacientes con endometriosis reaccionaron consistentemente mucho más fuertemente con la proteína ME-5 cuando se los comparó con sueros de control (comparar los patrones de 15A y 15B). Generalmente se señala una concentración particular de la proteína recombinante ME-5 que ofrece la mejor discriminación de reactividad para anticuerpos en pacientes con endometriosis con relación a los controles. En estos experimentos y en otros que se resumen más adelante, esta concentración fue de 0,036 miligramos de ME-5 por mililitro. Con este valor, muy pocos o ninguno de los pacientes de control reaccionaron, pero la reactividad de estos pacientes con endometriosis fue sustancial.
- 45 50 En este experimento se evaluaron un total de 47 sueros de pacientes con endometriosis (Diagnostic Support; Boston, MA) junto con 24 controles negativos. Se muestran algunos datos representativos en las figuras discutidas anteriormente, y se resume en la Tabla 1 la reactividad de todos los sueros de pacientes con endometriosis con el antígeno recombinante ME-5. La reactividad de control es presentada en la Tabla 2. Un total de 27 de los pacientes con endometriosis fueron fuertemente positivos en este experimento. Además, la mayor parte de estos sueros de pacientes que parecieron estar por debajo de los 0,036 miligramos de ME-5 por mililitro de corte reaccionaron definitivamente mejor con concentraciones mayores de antígeno comparados con los sueros de control negativo como se observó anteriormente. Ninguno de los especímenes de control había tenido mucha reactividad del anticuerpo con el antígeno ME-5 como la medida por medio de la transferencia en línea. Por lo tanto, el marcador ME-5 reaccionó al menos con el 57% de los sueros de pacientes con endometriosis evaluados en este experimento, y todo el patrón de reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis fue considerablemente más fuerte con la proteína ME-5 cuando se lo comparó con los patrones observados con los sueros de control.
- 55 60 65 Algunas tiras representativas de transferencias en línea que contenían al antígeno ME-2 y tratadas con suero normal de paciente de control se muestran en la Figura 16A. En contraste, el patrón de reactividad de pacientes representativos con endometriosis con tiras similares es mostrado en la Figura 16B. Los sueros de pacientes con endometriosis reaccionan consistentemente mucho más fuertemente con la proteína ME-2 cuando se los compara con sueros de control (comparar los patrones de 16A y 16B). Generalmente se señala una concentración particular de la proteína recombinante ME-2 que ofrece la mejor discriminación de reactividad para anticuerpos en pacientes con endometriosis con relación a los controles. En estos experimentos y en otros que se resumen más adelante, esta concentración fue de 0,018 miligramos de ME-2 por mililitro. Con este valor, muy pocos o ninguno de los pacientes de control reaccionaron, pero la reactividad de los pacientes con endometriosis fue sustancial.
- 70 En este experimento se evaluaron un total de 47 sueros de pacientes con endometriosis (Diagnostic Support; Boston, MA) para reactividad con el antígeno ME-2 junto con 24 controles negativos. Se muestran algunos datos representativos en las figuras discutidas anteriormente, y se resume en la Tabla 3 la reactividad de todos los sueros de pacientes con endometriosis con el antígeno recombinante ME-2. La reactividad del paciente de control es presentada en la Tabla 4. Un total de 25 de los pacientes con endometriosis fueron fuertemente positivos en este experimento. Además, la mayor parte de estos sueros de pacientes que parecieron estar por debajo de los 0,018 miligramos de ME-2 por mililitro de corte reaccionaron definitivamente mejor con concentraciones mayores de antígeno comparados con los sueros de control negativo como se observó anteriormente. Ninguno de los especímenes de control tuvieron mucha reactividad del anticuerpo con el antígeno ME-2 como la medida por medio de la transferencia en línea. Por lo tanto, el marcador ME-2 reaccionó al menos con el 53% de los sueros de pacientes con endometriosis evaluados en este experimento, y todo el patrón de reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis fue considerablemente más fuerte con la proteína ME-2 cuando se lo comparó con los patrones observados con los sueros de control. Esto se ejemplifica adicionalmente por el hecho de que se evaluó una concentración dos veces mayor (0,144 mg/ml) del antígeno ME-2 para reactividad con sueros de control, y la intensidad de la señal observada para este fue considerablemente menor que aquella generada con sueros de endometriosis con niveles menores de proteína.

ES 2 326 324 T3

Como se observó para las actividades descritas anteriormente, el espécimen de suero de paciente que muestra reactividad con el antígeno EPP2 es considerado positivo si la intensidad de la señal es más fuerte que aquella obtenida con la proteína sobre las tiras del paciente de control. También se observó anteriormente que cuando se evaluaron estos experimentos, las tiras tratadas con sueros de control fueron comparadas con las tiras incubadas con sueros de pacientes

- 5 con endometriosis para facilitar el análisis de la intensidad de coloración de cada banda. Algunas tiras representativas
10 de transferencias en línea que muestran la reactividad de EPP2 recombinante con suero normal de paciente de control se muestran en la Figura 17A. En contraste, el patrón de reactividad de pacientes representativos con endometriosis con tiras similares es mostrado en la Figura 17B. Generalmente los sueros de pacientes con endometriosis reaccionan
15 mucho más fuertemente con la proteína EPP2 cuando se los compara con sueros de control (comparar los patrones de 17A y 17B). Generalmente se señala una concentración particular de la proteína recombinante EPP2 que ofrece la mejor discriminación de reactividad para anticuerpos en pacientes con endometriosis con relación a los controles. En estos experimentos y en otros que se resumen más adelante, esta concentración fue de 0,05 miligramos de EPP2 por mililitro. Con este valor, muy pocos o ninguno de los pacientes de control reaccionaron, pero la reactividad de los pacientes con endometriosis fue sustancial.

- 15
- En este experimento se evaluaron un total de 90 sueros de pacientes con endometriosis (Diagnostic Support; Boston, MA y Boston Biomedica; Boston) junto con 24 controles negativos. Se muestran algunos datos representativos en las figuras discutidas anteriormente, y se resume en la Tabla 5 la reactividad de todos los sueros de pacientes con endometriosis con el antígeno recombinante EPP2. La reactividad del paciente de control es presentada en la Tabla 20 6. Un total de 55 de los pacientes con endometriosis fueron fuertemente positivos en este experimento. Además, la mayor parte de estos sueros de pacientes que parecieron estar por debajo de los 0,05 miligramos de EPP2 por mililitro de corte reaccionaron definitivamente mejor con concentraciones mayores de antígeno comparados con los sueros de control negativo como se observó anteriormente. Ninguno de los especímenes de control tuvieron mucha reactividad 25 del anticuerpo con el antígeno EPP2 como la medida por medio de la transferencia en línea. Por lo tanto, el marcador EPP2 reaccionó al menos con el 61% de los sueros de pacientes con endometriosis evaluados en este experimento, y todo el patrón de reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis fue considerablemente más fuerte con la proteína EPP2 cuando se lo comparó con los patrones observados con los sueros de control.

- 30 Todo el patrón de reactividad para los antígenos individuales ME-5, ME-2 y EPP2 estaba entre 53% y 61% y esto parece ser suficientemente útil como marcador de diagnóstico para endometriosis. Sin embargo, por el examen de los resultados resumidos en las Tablas 1, 3 y 5 es claro que diferentes pacientes con endometriosis no reaccionan en la misma forma con cada uno de los 3 antígenos. Por lo tanto, si se considera el patrón de reactividad del suero de pacientes con endometriosis para cada uno de los 3 antígenos, entonces este panel de marcadores hace aún más convincente la utilidad como análisis de diagnóstico. Por ejemplo, se evaluaron 47 pacientes con cada uno de los 35 antígenos ME-5, ME-2 y EPP2 y el patrón de reactividad con anticuerpos en uno o más especímenes se resume en la Tabla 7. Tomados juntos, más del 83% de los sueros analizados contenían anticuerpos que reaccionan al menos con uno de los antígenos ME-5, ME-2 o EPP2. En consecuencia, si se consideran los tres antígenos juntos como un panel para análisis de diagnóstico entonces la frecuencia de los anticuerpos en pacientes con endometriosis que reaccionan con ellos es considerable.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 326 324 T3

TABLA 1

Patrón completo de la reactividad de ME-5 con 47 pacientes con endometriosis

5 Los especímenes en suero de pacientes con endometriosis se obtuvieron a partir de un proveedor comercial (Diagnostic Support, Boston, MA) y se evaluó su reactividad con antígeno recombinante ME-5 por medio de transferencias en línea.

	Suero	Reactividad con ME-5	Suero	Reactividad con ME-5
10	DS01	+	DS28	+
15	DS02	-	DS29	+
20	DS03	+	DS30	+
25	DS04	-	DS31	+
30	DS05	+	DS32	+
35	DS06	+	DS33	+
40	DS07	-	DS34	+
45	DS08	-	DS35	-
50	DS09	+	DS36	+
55	DS10	+	DS37	-
60	DS11	+	DS38	+
65	DS12	+	DS39	+
	DS13	-	DS40	+
	DS14	+	DS41	-
	DS15	-	DS42	+
	DS16	+	DS43	+
	DS17	+	DS44	+
	DS18	-	DS45	+
	DS19	-	DS46	-
	DS20	-	DS47	-
	DS21	-	DS48	-
	DS25	-	DS49	-
	DS26	-	DS50	-
	DS27	+		

ES 2 326 324 T3

TABLA 2

Patrón completo de reactividad de ME-5 con sueros de 24 pacientes de control

Los especímenes en suero de un paciente de control se obtuvieron a partir de sangre interna extraída y se evaluó la reactividad con antígeno recombinante ME-5 por medio de transferencias en línea	
Suero	Reactividad con ME-5
A1	-
A2	-
A3	±
A4	-
A5	-
A6	-
A7	-
A8	-
A9	±
A10	-
A11	-
A12	±
A13	±
A14	±
A15	-
A16	-
A17	-
A18	-
A19	-
A20	±
A21	-
A22	±
A23	±
A24	-

50

55

60

65

ES 2 326 324 T3

TABLA 3

Patrón completo de la reactividad de ME-2 con 47 pacientes con endometriosis

5 Los especímenes en suero de pacientes con endometriosis se obtuvieron a partir de un proveedor comercial (Diagnostic Support, Boston, MA) y se evaluó su reactividad con antígeno recombinante ME-2 por medio de transferencias en línea.

Suero	Reactividad con ME-2
DS01	-
DS02	-
DS03	-
DS04	-
DS05	-
DS06	+
DS07	-
DS08	-
DS09	-
DS10	-
DS11	-
DS12	+
DS13	-
DS14	-
DS15	-
DS16	-
DS17	+
DS18	-
DS19	+
DS20	+
DS21	+
DS25	+
DS26	+
DS27	+

Suero	Reactividad con ME-2
DS28	+
DS29	-
DS30	+
DS31	+
DS32	-
DS33	+
DS34	-
DS35	+
DS36	+
DS37	-
DS38	+
DS39	+
DS40	+
DS41	-
DS42	+
DS43	+
DS44	+
DS45	+
DS46	+
DS47	-
DS48	-
DS49	+
DS50	+

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 324 T3

TABLA 4

Patrón completo de reactividad de ME-2 con sueros de 24 pacientes de control

5 Los especímenes de suero de un paciente de control se obtuvieron a partir de sangre interna
10 extraída y se evaluó la reactividad con antígeno recombinante ME-2 por medio de
15 transferencias en línea

Suero	Reactividad con ME-2
A1	-
A2	-
A3	-
A4	±
A5	-
A6	-
A7	-
A8	-
A9	±
A10	-
A11	-
A12	-
A13	-
A14	±
A15	-
A16	-
A17	-
A18	±
A19	-
A20	+
A21	-
A22	-
A23	-
A24	-

50

55

60

65

ES 2 326 324 T3

TABLA 5

Patrón completo de la reactividad de EPP2 con 90 pacientes con endometriosis

5 Los especímenes en suero de pacientes con endometriosis se obtuvieron a partir de un proveedor comercial (Diagnostic Support, Boston, MA) y se evaluó su reactividad con antígeno recombinante EPP2 por medio de transferencias en línea.

	Suero	Reactividad con EPP2		Suero	Reactividad con EPP2
10	DS01	-		DS32	+
	DS02	-		DS33	+
15	DS03	+		DS34	-
	DS04	-		DS35	+
20	DS05	+		DS36	-
	DS06	+		DS37	-
25	DS07	-		DS38	-
	DS08	-		DS39	-
30	DS09	-		DS40	+
	DS10	-		DS41	-
35	DS11	-		DS42	+
	DS12	+		DS43	+
40	DS13	-		DS44	+
	DS14	-		DS45	+
45	DS15	+		DS46	+
	DS16	-		DS47	+
50	DS17	-		DS48	+
	DS18	-		DS49	-
55	DS19	+		DS50	-
	DS20	+		BBI01	-
60	DS21	+		BBI02	+
	DS22	+		BBI03	+
65	DS23	-		BBI04	+
	DS24	+		BBI05	-
70	DS25	-		BBI06	+
	DS26	-		BBI07	+
75	DS27	+		BBI08	+
	DS28	+		BBI09	+
80	DS29	+		BBI10	+
	DS30	+		BBI11	+
85	DS31	+		BBI12	+

ES 2 326 324 T3

TABLA 5 (continuación)

Suero	Reactividad con EPP2	Suero	Reactividad con EPP2
BBI13	+	BBI27	+
BBI14	-	BBI28	+
BBI15	+	BBI29	-
BBI16	+	BBI30	+
BBI17	-	BBI31	+
BBI18	-	BBI32	+
BBI19	-	BBI33	-
BBI20	+	BBI34	+
BBI21	-	BBI35	+
BBI22	+	BBI36	-
BBI23	+	BBI37	+
BBI24	-	BBI38	+
BBI25	+	BBI39	+
BBI26	+	BBI40	+

TABLA 6

Patrón completo de reactividad de EPP2 con sueros de 24 pacientes de control

Los especímenes en suero de un paciente de control se obtuvieron a partir de sangre interna extraída y se evaluó la reactividad con antígeno recombinante EPP2 por medio de transferencias en línea	
Suero	Reactividad con EPP2
A1	-
A2	-
A3	-
A4	-
A5	-
A6	-
A7	-
A8	-
A9	±
A10	-
A11	-
A12	-
A13	-
A14	-
A15	-
A16	-
A17	-
A18	-
A19	-
A20	±
A21	-
A22	-
A23	-
A24	±

ES 2 326 324 T3

TABLA 7

Resumen del patrón combinado del panel de reactividad de ME-5, ME-2 o EPP2 con 47 pacientes con endometriosis

5 Se evaluaron los especímenes en suero de un total de 47 de pacientes con endometriosis por la reactividad con cada uno de los tres antígenos como se muestra en las tablas 1, 3 y 5. Se resume la reactividad completa de cada uno de estos pacientes con uno o más de los marcadores.

Suero	Reactividad con ME-5	Suero	Reactividad con ME-5
DS01	+	DS28	+
DS02	-	DS29	+
DS03	+	DS30	+
DS04	-	DS31	+
DS05	+	DS32	+
DS06	+	DS33	+
DS07	-	DS34	+
DS08	-	DS35	+
DS09	+	DS36	+
DS10	+	DS37	-
DS11	+	DS38	+
DS12	+	DS39	+
DS13	-	DS40	+
DS14	+	DS41	-
DS15	+	DS42	+
DS16	+	DS43	+
DS17	+	DS44	+
DS18	-	DS45	+
DS19	+	DS46	-
DS20	+	DS47	+
DS21	+	DS48	+
DS25	+	DS49	+
DS26	+	DS50	+
DS27	+		

50 Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

60 Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030032044 A [0010] • EP 1191107 A [0010]
- US 20020192647 A [0010] • EP 0387027 A [0010] [0016]
- US 2001046713 A [0010] • WO 0063675 A [0010]
- US 2001044158 A [0010] • US 6531277 B [0011]

ES 2 326 324 T3

- US 6376201 B [0010]
- US 5618680 A [0010]
- 5 • WO 0043789 A [0010]
- US 6540980 B [0010]
- 10 • US 6525187 B [0010]
- US 6387629 B [0010]
- US 6294662 B [0010]
- 15 • US 5877284 A [0010]
- US 4489166 A [0010]
- US 20020009718 A [0011]
- US 5843673 A [0012]
- WO 0132920 A [0013] [0013] [0013]
- US 20020127555 A [0013]
- US 20030077589 A, H. Hess-Stumpp [0013]
- WO 9428021 A [0015] [0015] [0015]
- NZ 232801 [0016] [0016]
- WO 9218535 A [0017] [0017]

20 Literatura citada en la descripción que no es de patente

- D. **Gosselin** y colaboradores, *Curr. Opin. Onco. Endo. & Metabol. Invest. Drugs*, 1999, vol. 1, 31 [0001]
- D. B. **Redwine**. *Fert. Steril.*, 2002, vol. 78, 686 [0001]
- 25 • **Coxhead; Thomas**. *J. Obstet. Gynacol.*, 1993, vol. 13, 42 [0001]
- **Thomas; Campbell**. *Gynacol. Obstet. Invest.*, 2000, vol. 50, 2 [0001]
- 30 • G. K. **Husby**. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 2003, vol. 82, 649 [0002]
- T. P. **Canavan; L. Radosh**. *Postgrad. Med.*, 2000, vol. 107, 213 [0003] [0003] [0004]
- 35 • S. **Pillai** y colaboradores, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1996, vol. 35, 483 [0003]
- I. A. **Brosens; J. J. Brosens**. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2000, vol. 88, 117 [0003] [0003] [0003]
- 40 • P. R. **Koninckx**. *Hum. Reprod.*, 1994, vol. 9, 2202 [0003]
- B. **Mol** y colaboradores, *Fertil. Steril.*, 1998, vol. 70, 1101 [0004]
- **Sharpe-Timms** y colaboradores, *Biol. Reprod.*, 1998, vol. 58, 988 [0005]
- 45 • D. **Gosselin** y colaboradores, *Curr. Opin. Oncol. Endo. Metabol. Inv. Drugs*, 1999, vol. 1, 31 [0006]
- J. **Brosens** y colaboradores, *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2003, vol. 30, 95-114 [0006]
- 50 • P. **Vigano** y colaboradores, *Obstet. Gynecol.*, 2000, vol. 95, 115-118 [0007]
- J. **Mahnke** y colaboradores, *Fertil. Steril.*, 2000, vol. 73, 166-170 [0008]
- A. M. **Sharkey** y colaboradores, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, vol. 85, 402-409 [0008]
- 55 • **Matalliotakis**. *Obstet. Gynecol.*, 2000, vol. 95, 810-813 [0009]
- S. **Pillai** y colaboradores, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1998, vol. 39, 235 [0039] [0045]
- Van **Voorhis; Stovall**. *J. Reprod. Immunol.*, 1997, vol. 33, 239 [0039] [0045]
- 60 • J. **Brosens** y colaboradores, *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2003, vol. 30, 95 [0039] [0045]
- **Scanlan** y colaboradores, *Int. J. Cancer*, 1998, vol. 76, 652-658 [0076]
- **Ballinger** y colaboradores, Identification of CHIP, a novel tetratricopeptido repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, vol. 19, 4535-4545 [0077]

ES 2 326 324 T3

- G. Galfre y colaboradores *Nature*, 1977, vol. 266, 550 [0093]
- V. T. Oi; L. A. Herzenberg. Selected Method in Cellular Immunology. W. H. Freeman, 1980 [0093]
- 5 • M. Shulman y colaboradores, *Nature*, 1978, vol. 276, 269 [0093]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 324 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar endometriosis en un individuo humano que comprende las etapas de:

- 5 (a) detectar una cantidad de prueba de un anticuerpo que específicamente se enlaza con al menos un polipéptido ME-5 (SEQ ID NO: 3), un polipéptido ME-2 (SEQ ID NO: 6); y un polipéptido EPP2 (SEQ ID NO: 9) en una muestra del individuo; y
- 10 (b) comparar la cantidad de prueba con el rango normal del anticuerpo en una muestra de control de un individuo que no sufre de endometriosis, por lo cual una cantidad de prueba por encima del rango normal proporciona una indicación positiva en el diagnóstico de endometriosis.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra comprende suero sanguíneo.

20 3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la etapa de detección incluye la captura del anticuerpo de la muestra con un péptido inmovilizado donde dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste de ME-2 o un péptido que comprende un epítopo de ME-2, ME-5 o un péptido que comprende un epítopo de ME-5 y EPP2 o un péptido que comprende un epítopo de EPP2 y la detección del anticuerpo capturado.

25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polipéptido de enlazamiento incluye ME-2, ME-5 y EPP2.

30 5. Una composición que contiene todos los tres polipéptidos recombinantes ME-5, ME-2 y EPP2, cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 3, 6 y 9, respectivamente.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1. Secuencia aislada de ADNc de ME-5**LISTADO DE SECUENCIA****INFORMACIÓN GENERAL:****NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9****CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:****SEQ ID NO 1****LONGITUD: 1302****TIPO: ADN****ORGANISMO: Homo sapiens****CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 1**

```

CGGGGAATGAAAGGCCAAGGATCGCGGGCTCGGGCTGCGGGCTCCGGCTGGGGGGCTGGGCGCGAGGGGGGAGCTTGGGAGCGGAGCCCA 94
GGCCCTTACTTCCGGTTCTAGCGCCCAGCCCCACGCCCGAGGCCGACCCGGCTCCGGCTCGAACCTCGCTGGGT
GGCGGTGC CGGGCGGGCGCAATGAAAGGCAAGGAGGAGAGGAGGGGGCCACGGCTGGGGCTGGGGCGAGGCCCGAGAAGAGCCCGAGCG 188
CGGGCACGGCGCGCGCGTACTTCCGTTCTCTCTCCCTCCCGCGGTGCGGACCCGGACCGCCGCTTCGGGGCTCTCGGGCTCGC
CGCAGGAGCTCAAGGAGCAGGGCAATCGCTGTTGCGGGCGAAAGTACCCGGAGGCCGGCCCTGCTACGGCCCGCGATCACCCGGAAACCC 282
GGTCTCTGAGTTCTCGTCCCGTAGCAGACAAGCACCCGGTTCTCATGGGCTCCGCCCGGGAGGATGCCGGCGCTAGTGGGCCCTGGG
GCTGGTGGCGTGATTACCCAACCGGGCTTGTGCTACCTGAAGAGTCAGCAGCACGAGCAGGCCCTGGCGACTGCCGGCCGCGCTGGAG 376
CGACCACCGGACATAATGTGGTGGCCCGAACACGGATGGACTTCACGTCGTCGCTCCGGACCGCTGACGGCCGCGGGACCTC
CTGGACGGGCAGTCGTGAAAGGCCACTTCCTGGGGCAGTGCAGCTGGAGATGGAGAGCTATGATGAGGCCATGCCATCTGCAAGCGAG 470
GACCTGCCGTCAAGACACTTCCGGTGAAGAAGGACCCGTCACGGTCCACCTCTACCTCTCGATACTACTCCGGTAGCGGTAGCGGTAGACGTGCC
CTTACAGCTGGCCAAAGGAGCAGCGGTGAACCTCGGGGACGACATCCCAGCGCTTCTGAATCGGAAAGAAGCGCTGGAACAGCATTA 564
GAATGTCGGACGGGTTCTCTGTCGCCGACTTGAAGGCCCCGCTGTAGGGTCCGAGAGCTTACGGCTTCTCTCGGACCTCTCAGGTGGCT
GGAGCGGGCATCCACCAAGGAGGAGCGAGCTGCACCTCTCCAGGTCAATGCCGGGACCGTGAGAGGGAGCTGGAAAGAGTGCACCGGA 658
CCTCGCCCGTAACTCTCTCTCGCTCACGTGAGGATGGAGGGTCCGAGTAACGGCCCTCGCACCTCCCTCGACCTCTCACGGTCCG
AACCACGGAGGTGATGAGGACGACAGCCACGTCCGGGCCAGCAGGCCATGAGGCCAAGCACAGTACATGGGGACATGGACGAGC 752
TTGGTGTCCCACACTCTCTGTCGGTCAAGGCCGGGCGCTGCTCCGGACGTAACCTCCGGTCTGCTGTTCATGTACCGCCCTGACCTGCTCG
TTTTTCTCAGGTGGATGAGAGAGGAAGAGGAGACATCCCCGACTACCTGTGAGGCAAGATCAGCTTGAGCTGATGCCGGAGCCGTGCA 846
AAAAAAAGTCCACCTACTCTCTCTCTCGCTCTGAGGGCTGATGGACACACCGTTCTAGTCGAAACTCGACTACGCCCTCGCACGTA
CACGCCAGTGGCATCACCTACGACCGCAAGGACATCGAGGAGCCTGCACCGTGAGGTGATTTGACCCGTGACCCGGAGCCCCCTGACC 940
GTGCGGGTACCGTAGTGGATGCTGGCGTCTGAGCTCTCGTGGACGTCGCACACCCAGTAAACTGGGGCACTGGGCCCTGGGGACTGG

```

ES 2 326 324 T3

CAGGAACAGCTCATCCCCAACTTGGCTATGAAGGAGGTATTGACCCATTCTCGAGAATGGCTGGGGAGGACTACTGAGGTTCCCTGC
1034
GTCCCTTGTCGACTAGGGCTTGAAACCGATACTTCTCCAATAACTGGCTAAGTAGAGACTCTAACCGACCCACCTCCATGACTCCAAAGGGACG

CCTACCTGGCGTCTGGTCCAGGGAGCCCCTGGCAGAAGCCCCCGGCCCTATACATAGTTATGTTCTGGCCACCCGACCGCTTCCCCCA
1128
GGATGGACCCAGGACCAGGTCCCCCTCGGGACCCGTCTCGGGGGCCGGGATAATGTAATCAAATACAAGGACCCGTGGGCTGGGAAGGGGCT

AGTTCTGCTTGGACTCTGGACTGTCTTCCCTCTCAGCATGGTTTGCTGGCCGTGATCGTCCCCCTTGTGGCTGGAAAAGCAGGTGAG
1222
TCAGACCGACAACCTGAGACCTGACAAGGGGAGAGTCGTAGCGAAACGACCCGGCACTAGCAGGGGAAACACCCGACCTTTCGTCCACTC

GGTGGGCTGGGCTGAGGCCATTGGCCCACTATCTGTGAAATAAAAATCCGTGAGCACGAAA
1302
CCACCCGACCCGACTCCGTAAACGGGGTGTAGACACATTATTTAGCCACTCGTGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Figura 1B. Secuencia de codificación deducida de ME-5**LISTADO DE SECUENCIA****INFORMACIÓN GENERAL:****NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9****CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:****SEQ ID NO 2****LONGITUD: 912****TIPO: ADN****ORGANISMO: Homo sapiens****CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 2**

```

ATGAAGGCCAAGGAGGAGAAGGAGGGCGCCACGGCTGGGCCGTGGCGGCCAGCCCCAGAAGAGCCCCAGCGCAGGAGCTCAAGGAGC 94
TACTTCCCGTTCTCTCTTCTCCGCCCGTCCGACCCCGCGACCCCGCCTTCGGGCTCTCTCGGGCTCGCGCTCTCGAGTTCTCG

AGGGCAATCGCTGTTCGTGGCCGAAGTACCCGGAGGCCGGCGCTGCTACGGCCGCCGATCACCGGAACCCGCTGGTGGCCGTGTATT 188
TCCCGTTAACAGAACAGCACCCGGCTTTCATGGGCCTCCGCCCGGACGATGCCGGCGGCTAGTGGCCTTGGGACCCGGCACATAAT

CACCAACCGGGCCTGTGCTACCTGAAGATGCACAGCACGAGCAGGCCCTGGCGACTGCCGGCGCCCTGGAGCTGGACGGCAGTCGTG 282
GTGGTTGGCCCGGAACACGATGGACTCTACGTCGTGCTCGTCCGGGACCGGCTGACGGCCCGCGGGACCTCGACCTGCCGTCAAGACAC

AAGGGCCTTCTGGGAGCTGGCAGTGGAGAGCTATGATGAGGCCATGCCAATCTGCAGCGAGCTAACGCCCTGGCAAGG 376
TCCCGGTGAAGAAGGACCCCGTACGGTGACCTCTACCTCTCGATACTACTCCGGTAGCGGTTAGCGCTCGTAATGTCGGACCCGGTTCC

AGCAGCGGCTGAACCTCGGGGACGACATCCCAGCGCTTCGAATGCCAAGAAGAAGGCCCTGGACAGCATTGAGGAGCGGGCATCCACCA 470
TCGTGCCCCACTTGAAGCCCTGCTGTAGGGTCCGAGAAGCTTAGCGCTTCTCCGACCTTCTCGTAACCTCGCCCTGGCTCCACACTC

GGAGAGCGAGCTGCACTCTACCTCTCCAGGCTCATTGCCGGAGCGTGAAGAGGGAGCTGGAAAGACTGCCAGCGAAACCAACGAGGGTAG 564
CTCGTCTCGACGTGAGGGATGGAGGGTCCGAGTAACGGCGCTCGCACTCTCCCTCGACCTTCTCACGGTCCCTGGCTCCACACTC

GACCGACGCCACGTCCGGGCCCAGCAGGCCATGAGGCCAAGCACAGTACATGGGGACATGGACGAGCTTTTCTCAGGTGGATG 658
CTGCTGTCGGTGCAGGCCGGCTGTCGGACGTAACCTCGCTGTGCTGCTGCTGACCGCTGACCTGCTCGAAGAAAAGAGTCCACCTAC

AGAAGAGGAAGGAGACATCCCCACTACCTGTGTGCCAAGATCAGCTTGGAGCTGATGCCGGAGCCGTGCATCACGCCAGTGGCATCAC 752
TCTCTCCCTTCGCTGTAGGGTAGGGACACACCGCTAGTGCAGACTACGCCCTGGCACGTAGTGGGGTCAACCGTACTG

CTACGACCGCAAGGACATCGAGGAGCACCTGCAGCGTGTGGTCATTTGACCCCGTACCCGGAGCCCCCTGACCCAGGAACAGCTCATCCCC 846
GATGCTGGCGTCCGTAGCTCTCGGACGTCGCACACCCAGTAAAGCTGGGACTGGGCTCGGGGACTGGGTCTTGTGACTAGGGG

AACTGGCTATGAGGAGGTATTGACGCATTCACTCTGAGAATGGCTGGGTGGAGGACTACTG 912
TTGAAACCGATACTCCCTCCAAACTCGCTAAGTAGAGACTCTAACCGACCCACCTCTGATGACT

```

Figura 1C. Secuencia de aminoácidos deducida de ME-5

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 3

LONGITUD: 303

TIPO: PRT

ORGANISMO: *Homo sapiens*

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 3

MKGKEEKEGGARLGAGGGSPEKSPSAQELKEQGNRLFVGRKYPEAAACYG	50
RAITRNPLVAVYYTNRALCYLKMQQHEQALADCRRALELDGQSVKAHFFL	100
GQCQLEMESYDEAJANLQRAYSLAKEQQLNFGDDIPSALRIAKKKRWNSI	150
EERRIHQESELHSYLSRLIAERERELEECQRNHEGDEDDSHVRAQQACI	200
EAKHDKYMADMDELFSQVDEKRKKRDIPDYLCGKISFELMREPCITPSGI	250
TYDRKDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQEQLIPNLAMKEVIDAFISENGWV	300

EDY 303

Figura 2A. Secuencia aislada de ADNc de ME-2

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

LONGITUD: 1353

TIPO: ADN

ORGANISMO: *Homo sapiens*

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 4

ES 2 326 324 T3

AAA
--> 1353
TTT

Figura 2B. Secuencia de codificación deducida de ME-2**LISTADO DE SECUENCIA****INFORMACIÓN GENERAL:****NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9****CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:****SEQ ID NO 5****LONGITUD: 1182****TIPO: ADN****ORGANISMO: Homo sapiens****CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 5**

```

ATCGGGACACTTTAACCTCCTCTGGCTGCCCTGGCTGCAGCCCTGTTACACTACCCGTCAAAAGTCAGATGCCAAAAAGCCGCCPA 93
TACGCCCTGTGAGAAGTTPGGAGGAGACCGAACGGGACCCGACGTGGGACAAGTGTGATGGCACAGTTTCACTACGGTTTTTCCGGGAGT

AAGACGCTGCTGGAGAAAGACTCAGTTTCAAGATAAGCCGGTCAAGACCCGGGTTGGTGGTACGGACCTCAAAAGCTGAGAGTGTGTTCTT 186
TTCTGGCACGACCTTCTCAGTCAAAAGCTATTGGCCACGTTCTGGCCCCAACCAACCACTGCCCTGGAGTTCGACTCTCACACCAAGAA

GAGCATCCCAGCTACTCTCGCAAAGGCCGGACAGACACTTGTGGGATGTACTGGCTATGTCACCCATGGAACAGCCATGGCTAC 279
CTCGTAGCGTGTGATGACGAGCCGTTCCGGGCCCTGTGTGAAACGACCCCTACATGACCCGATACTGAGGTACCTTGTGGTACCGATG

GATGTCACCAAGGTCTTGGGAGCAAGTTCACACAGATCTCACCCGTCGGCTGCAGCTGAAGAGACGTGGCGTGAGATGTTGAGGTACG 372
CTACAGTGGTCCAGAACCCCTCGTTCAAGTGTGTCAGAGTGGCAAGCCGACGTCGACTCTCTGCACCCGACTCTACAAACTCCAGTGC

GGCCTCCACGACGTGGACCAAGGGTGGATGCCAGCTGTCAAGGAAGCATGCCAAGGGCCTGCACATAGTGCCTGGCTCTGTTGAGGACTGG 465
CCGGAGGTGCTGCCACCTGGTCCCCACCTACGCTCGACAGTCCTCGACGGTCCGGACCTGTATCACGGAGCCGAGGACAAACTCCGTGACC

ACTTACGATGATTCCGGACGTCTTAGACAGTGAGGATGAGATAGAGGAGCTGACCAAGACCGTGGTCCAGGTGGCAAGAACCCAGCATTC 558
TGAATGCTACTAAAGGCCTTCAGAACCTGTCACTCCACTCTATCTCTCGACTCTGTCTGGCACCCAGGTTCTGGTCTGGTAAAG

GACGGCTTCTGGTGGAGGTGGAAACCGAGCTGCTAAGCCAGAAGCCGTGGCCTCATCCACATGCTCACCCACTTGGCGAGGCTCTGCAC 651
CTGCCGAGCACCACTCCAGACCTGGTCGACGATTGGCTTCCGGCACCCGGAGTAGGTGTACGGTGGTGAACCCGCTCCGAGACGTG

CAGGCCCGGTGCTGGCCCTCTGGTCACTCCGCTGCCATCACCCCGGGACCGACCGAGCTGGCATGTCACGCACAGGAGTTGAGCAG 744
GTCCGGCCGACGACCCGGAGCACCAGTAGGGCGGACGGTAGCTGGGGCCCTGGCTGGTACCCGTACAAGTCCGTCTCCCTAAACTCGTC

CTGGCCCCCGTGTGGATGGTTTCACTGACCTACGACTACTCTACAGCGCATCACCTGGCCATAATGCAACCCCTGTCTGGTTCGA 837
GACCGGGGGCACGACCTACCAAGTCGGAGTAGCTGGATGATGAGATGTCGCGTAGTCGGACCCGGATTACGTGGGGACAGGACCCAAAGCT

```

ES 2 326 324 T3

CCCTGGTCCAGGTCTGGACCCGAAGTCCAAGTGGCAAGCAAAATCCTCTGGGCTCAACTCTAAGTATGGACTACGGACCTCCAG
→ 930
CGGACCCAGGTCCAGGACCTGGCTTCAGTTTACCGCTTCTTCTTCTAGGAGGAACTCCAGTTGAAGATAACCATACCTGATCCCTGGAGGTT

GATCCCCGTGAGCCCTGTTGTCGGGCCAGGTACATCCAGACACTGAAGGACCAACAGGCCCCGGATGGTGCGGACAGCCAGGCCTCGAGCAC
→ 1023
CTACGGGCACTCGGACAAACAGCCCCGTCCATGTAAGGTGTGACTTCCCTGGTGTCCGGGCTTACCAACCCCTGTCGGTCCGGAGTCCTG

TCTTCGAGTACAAGAAGAGCCCACTGGGAGGCACGTGGCTTCTACCCAAACCTGAACTGCCCCTGCAGGTGGCCTGGACCTGGCCGGAG
→ 1116
AAGAAGCTCATGTTCTCTCGGGTCAACCTCCGTCCAGCAAGATGGCTGGACTTCAGGGACGTCACGCCACCTGGACCCGGCCCTC

CTGGGCGTGGGTCTCTATCTGGGACCTGGCCAGGGCTGAACCTACTTCTACGACCTGCTCAG
→ 1182
GACCCGCAACCCAGAGATAAACCTCGACCCGGTCCGGACTGATGAAGATGGTGACCGAGATC

Figura 2C. Secuencia deducida de aminoácidos de ME-2

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 6

LONGITUD: 393

TIPO: PRT

ORGANISMO: Homo sapiens

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 6

MRTLFNLLWLALACSPVHTTLSKSDAKKAASKTLLEKSQF	40
SDKPVQDRGLVVTDLKAESVVLEHRSYCSAKARDRHFAGD	80
VLGYVTPWNSHGYDVTKVFGSKFTQISPVWLQLKRRGREM	120
FEVTGLHDVDQGWMRAVRKHAKGLHIVPRLLFEDWTYDDF	160
RNVLDSEDEIEELSKTVVQVAKNQHFDGFVVEVNQLLSQ	200
KRVGLIHMLTHLAEALHQARLLALLVIPPAITPGTDQLGM	240
FTHKEFEQLAPVLDGFSLMTYDYSTAHQPGPNAPLSWVRA	280
CVQVLDPKSKWRSKILLGLNFYGM DYATSKDAREPVVGAR	320
YIQLKDHRPRMVWDSQASEHFFEYKKSRSGRHHVFYPTL	360
KSLQVRLELARELGVGVSIWELGQGLNYFYDLL	393

Figura 3A. Secuencia aislada de ADN de EPP-2

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 7

LONGITUD: 891

TIPO: ADN

ORGANISMO: Homo sapiens

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 7

CGGAAGACGAGGCCGGAGGCTGGTTCGGCGCTTGGAGAAAGATGGTGTGCGGGCGCTGCTGGCCGCCCTGTCACAGCCCCAG-----
GCCTCTGCTCCCGCCGCTCAGCCCAAGGCCGAACTCTTCTACCAAGACGCCGCGACGACCCGGGGACGACGTGCGGCCGTC----- 90

CTGGTGGAACGCTGTCAAGACTGCCGGCTATCCGACGTCGGCGCCAGCTACGGCCCTTGCACTGCTGCAGGCCAGCTGGGGGCCAG-----
GACCACTTGCAGACAGTCTCACCGCCGGATAGGCTGCAAGCCGGCTGAGTGGCGAGCGTGAACGACGCCGGTCAACGCCCCGGTC----- 180

GACCGGGCCCGCCCTCAGGACTCGCGGCTGGCCCGTGGGCTCCCTGTGCGCCGGCTGAGCATTAGAGACGCCCTCACCCAG-----
CTGGCGCGGGCGGGCGACGTCCTGAGCGCCGACCCGGGACCCGAGGGACACGGCCGGCGACTCGCTAAATCTGCGGAAGTGGGTC----- 270

GAGCTACGCGCGCCCTCGAGGCCGCTCGGGCCACACCAGGTAGCCAGGGGCCCTGGCGCAAACATTAACTCTGGCTGTGCGG-----
CTGGATGCGGCGCCGGAGGCTCGGGAGCCGGTGGTCCATGGCTCCCCGGACCGCGTTGTAAATTAGGACCCGACACGCC----- 360

GGCGGAACCGCTTGTCTTCTCCGGCTCTACAGTGGCATCAATGTGGAGGGTCATTCCGGCACTGGCGGGCTTCGAATCCCG-----
CCGGCTTOGGCGAACGAAAAGGAGGCCGAGATGTCACCGTAGTTACACCTCCCCAGTAAGGCCGTGAACGCCGGAAAGCTAGGCC----- 450

ACTGGATTGGCTGCTGAGACATCCCACGCATAAGAGCTAGGCCAGCCGCCGCTGGTGAAGTCTTGATGGACAAGACACA-----
TGACCCCTAACACCGGACGTCGTAGGGTGCCTATTCGGATCCGGCTGGCGAGGCAACTTCAGAACACTAACCTGTCTGTGT----- 540

GTGTGGAGAAAGACCCCTAACGCTAACAGAGATGAAGGTAGGCTGGTCCAGACACGGCAGCTACGGAGGCCACGGACCGAACGCCAGAG-----
CACACCTCTTCTGGGGATTCGGATGGTCTCTACTTCCATCCGACCCAGGTCTGCGCTGGATGCCCTCGGTGCGCTGGCTCCGGCTC----- 630

AGCCTTCTCTGCAAGTGGACTGAAACTCTTGACAGATGCTGCTCAATCTGACTGGTATGCCAGGACAGTTAACCCAGGGACGATAT-----
TCGAAAGGAGACGTTACCCCTGACTTGAAGACTGCTACGACAGTTAGACTGACCATATGTCCTGTCATTAAAGGTCCCTGCTATA----- 720

ES 2 326 324 T3

GGATGAAAAAGACAACCTACAGCTGCCAAATTCTTGTGATTAATCTGTGAGCTGGTTGATAGGCATGAGTGTGATACTTCTCAGGAAG
CCTACTTTCTGTGGGATGCGACGGTTAAGGAACTAATTACACACTCGACCAACTATCCGTACTCACACTATGAAGAGTCGGTTC

ATCTGTTAACAAATACCGGGGACTCTAGGCCTATGGTAATAATAAACACGTATTTATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TACACATTCTATGGCCCCCTGACATCCGGATACCATTATATTCTGTGATTAATAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
891

Figura 3B. Secuencia deducida de ADN de EPP-2

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 8

LONGITUD: 300

TIPO: ADN

ORGANISMO: Homo sapiens

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 8

AAGGTGCTGGGGCGGCTGCTGGCCGCCCTGCTGCACAGCCCCGAGCTGGTGGAACGTCGTGTCAGAGTCGGGGCCTATCCGACGTGGGGCGCAGC
----- 94
TACCAAGCACGGCGCCGACGACCGGGGGACGACGTGTCGGGCGTCGACCACTTGCAAGACAGTCAGCGCCGGATAAGGCTGACGCCGCGTCG

TCACGGCCTTCGCACTGCTGCAGGGCCAGCTGCGGGGCCAGGAACGGCGGCCCCGGCCCTGCAGGACCTGGCCCTGGGCCCTGGGCTCCCTGTG
----- 188
AGTGCCGGAAGCGTGACGACGTCCGGTCGACGCCCGGCTCTGGCCGGGGCGGACGTCTGGAGGCCGACCCGGGACCCGAGGGACAC

CCGGCCGGCTGAGGGATTAGAGACGCCCTCACCCAGGGAGCTACGCCGCCCTCCGAGGCCGCTGGGGCCACCACCAAGGTAGCCAGAGGGGC
----- 202
'GGCGGGCGCAGTCGCTAAATCTCTGCGGAAGTGGGTCTCGATGCGGCCGGAGGCTCCGGGAGGCCGGGTGGTGGTCCATCGGTCTCCCCG

CCTGGGCCAAGCAATTAA
----- 300
GGACCCGGTTTGTAAATT

Figura 3C. Secuencia deducida de aminoácidos de EPP-2

LISTADO DE SECUENCIA

INFORMACIÓN GENERAL:

NÚMERO DE SEQ ID NOS: 9

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 9

LONGITUD: 99

TIPO: PRT

ORGANISMO: Homo sapiens

CARACTERÍSTICA: SECUENCIA: 9

MVLRRLLAALLHSPQLVERLSESRPIRRAAQLTAFALLQAQLRGQDAARR 50

LQDLAAGPVGSLCRRAYERFRDAFTQELRRGLRGRSGPPPGSQRGPGANI 99

Figura 4: Transferencia tipo Northern de ME-5

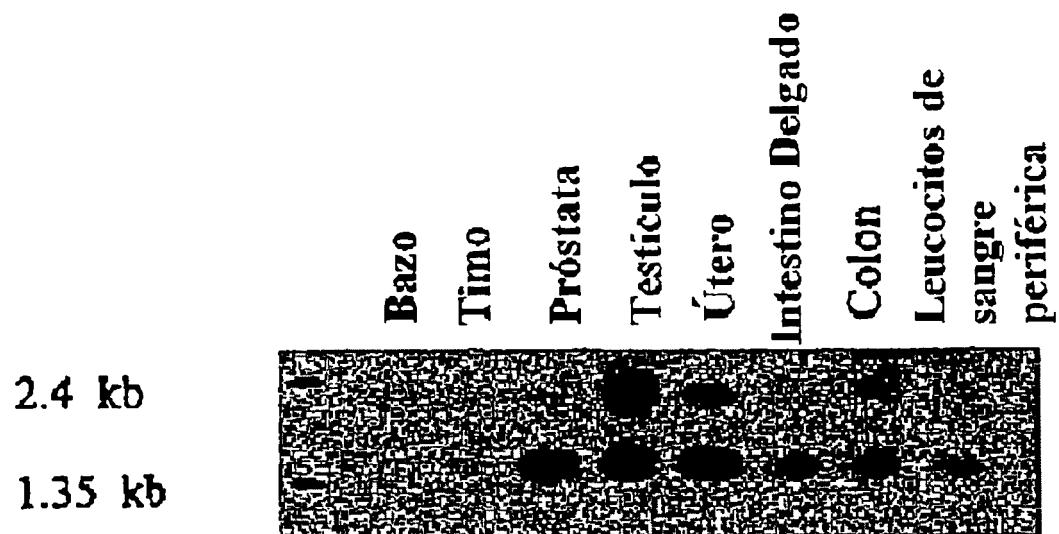
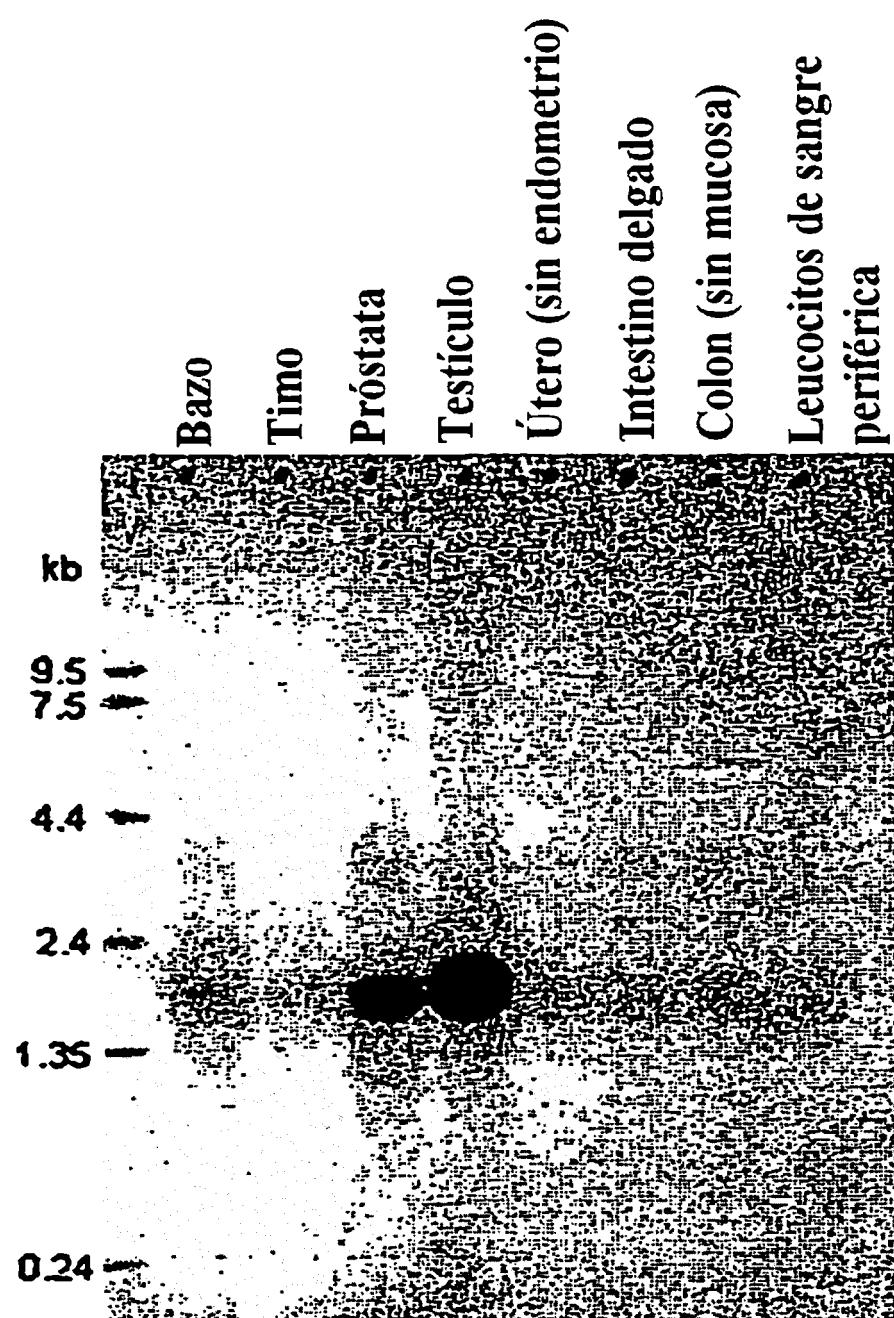


Figura 5. Transferencia tipo Northern de ME-2



ES 2 326 324 T3

Figura 6. Transferencia tipo Northern de EPP-2

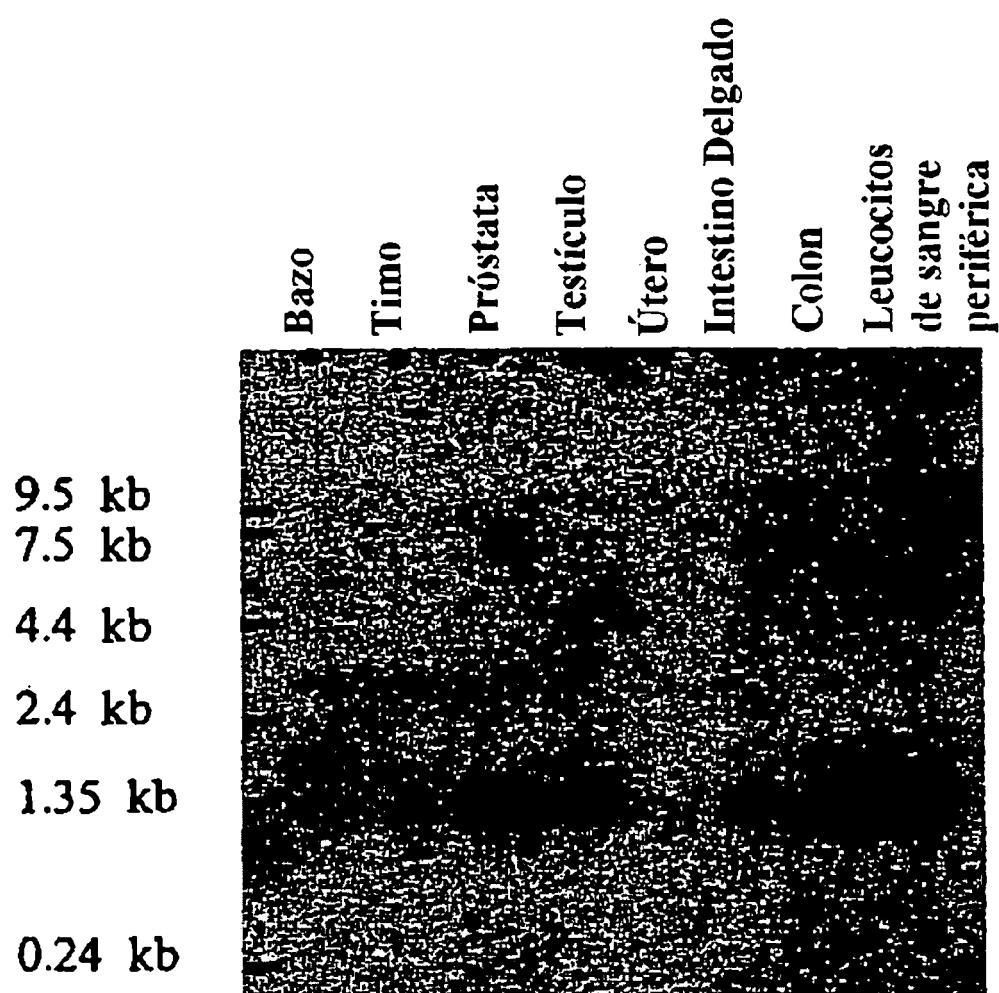
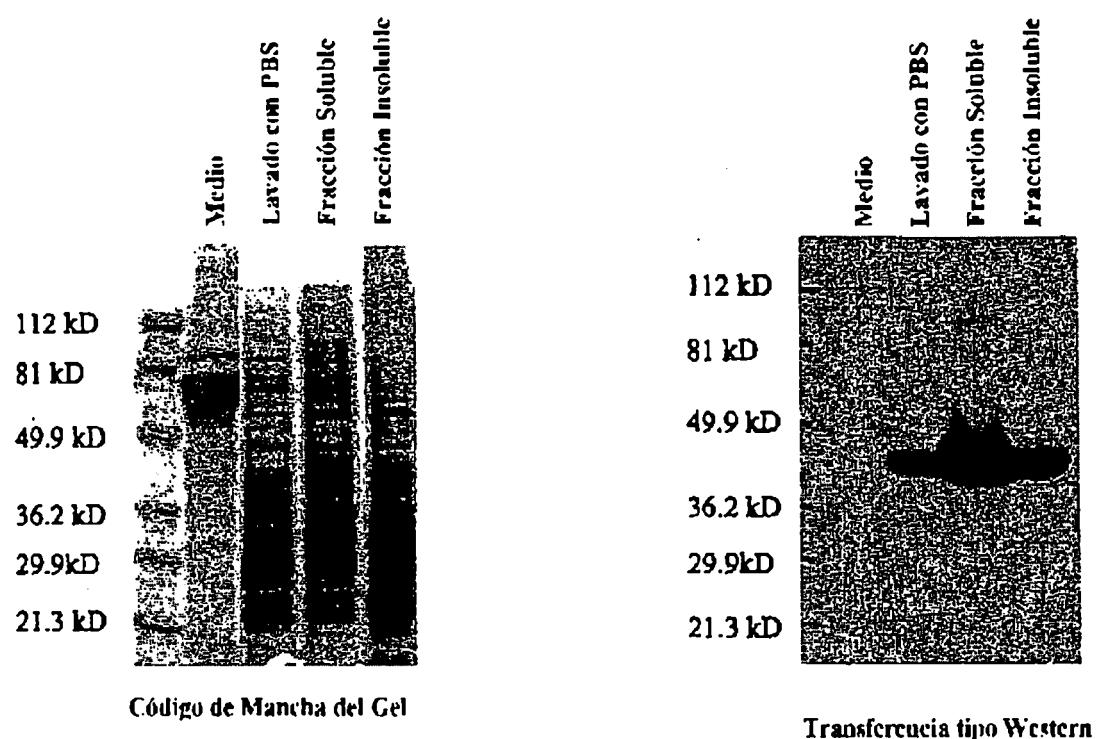


Figura 7. Expresión recombinante de ME-5 en células de insecto



ES 2 326 324 T3

Figura 8. Expresión recombinante de ME-2 en células de insecto

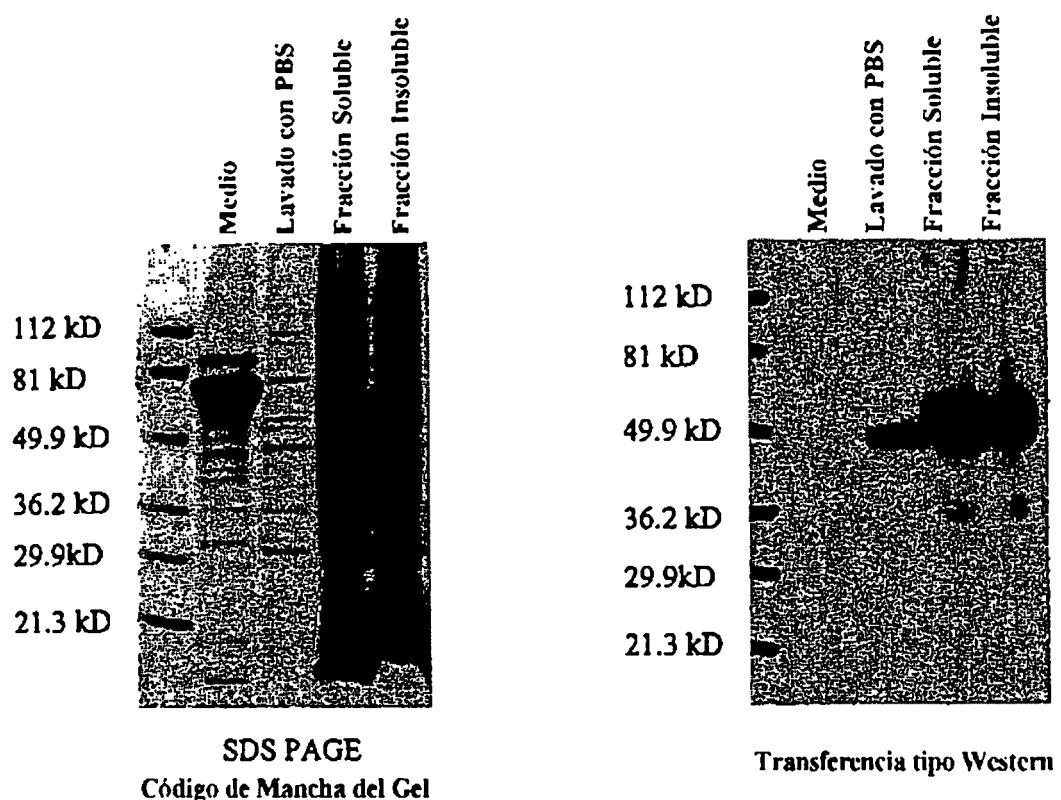


Figura 9. Expresión recombinante de EPP-2 en células de insecto

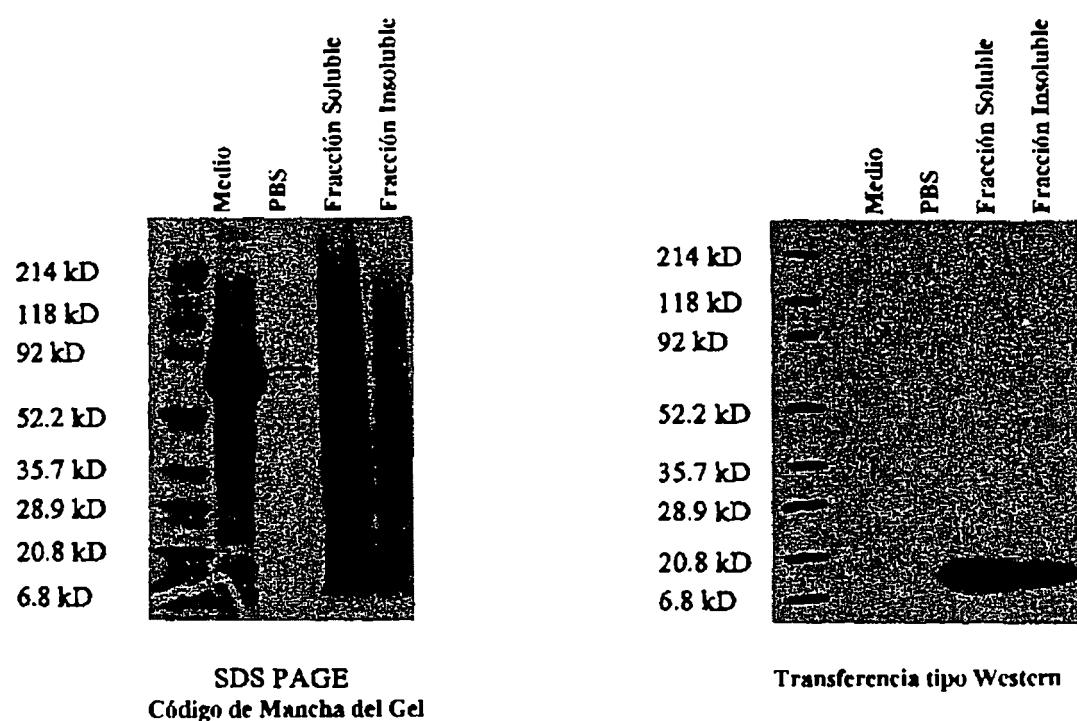


Figura 10. Purificación de ME-5 recombinante a partir de células de insecto

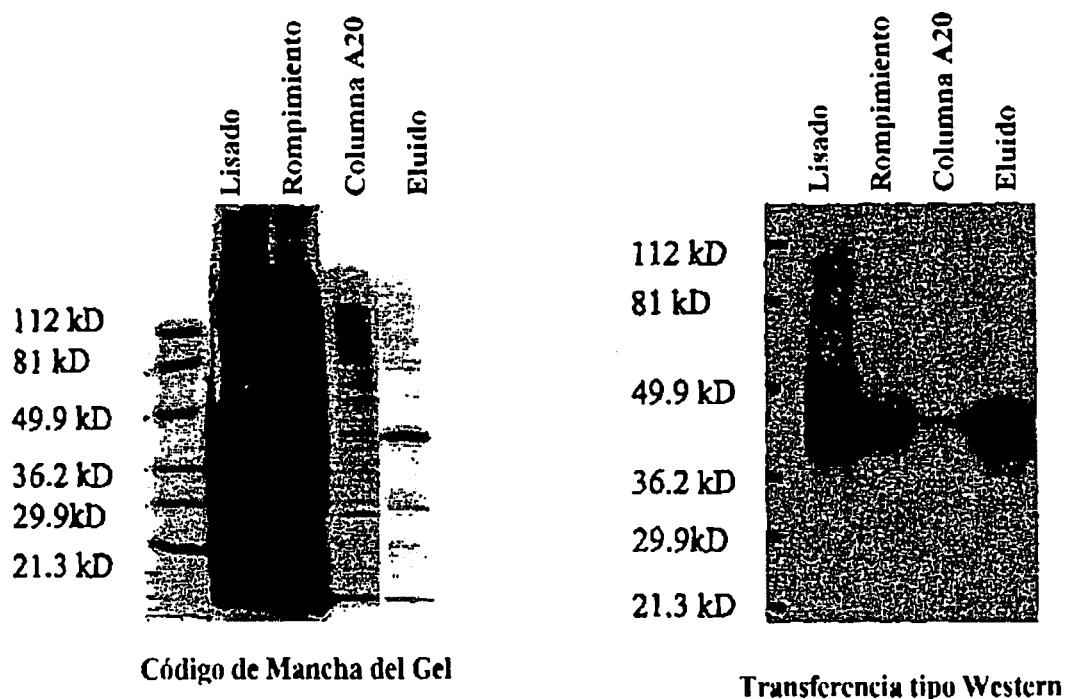
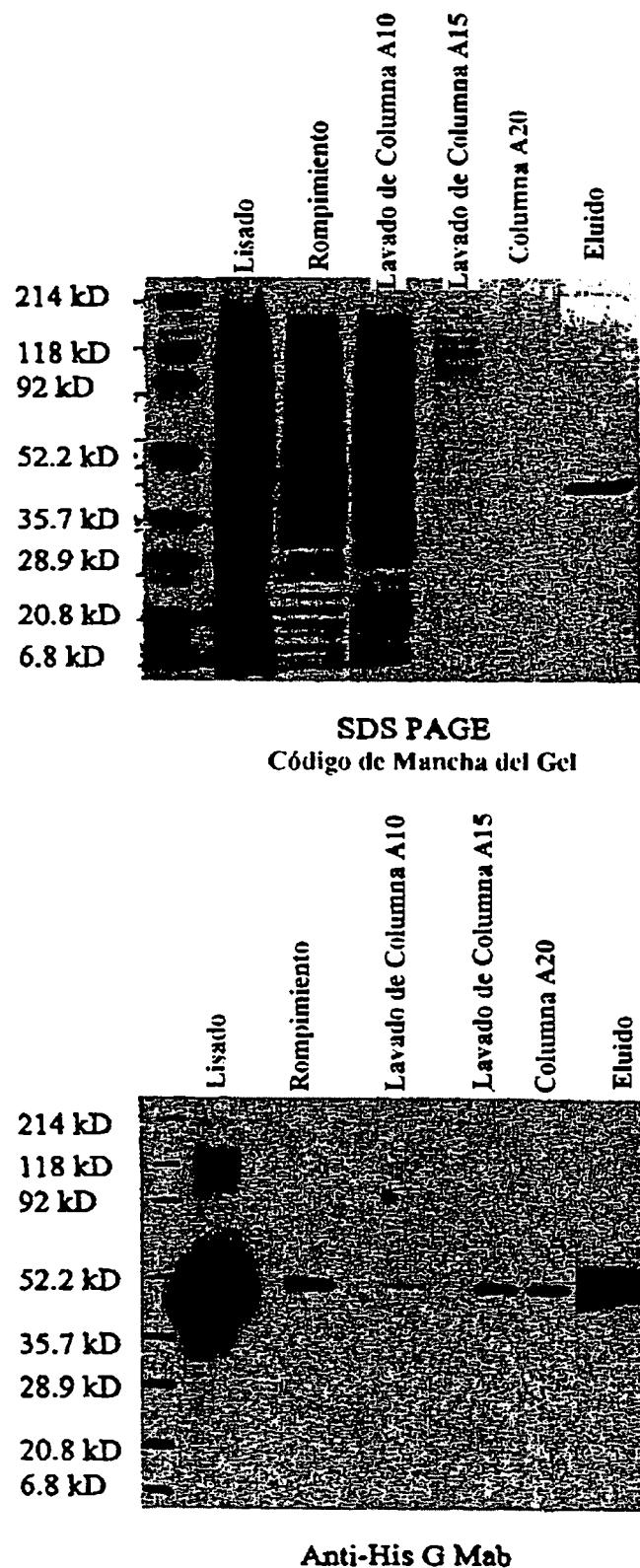
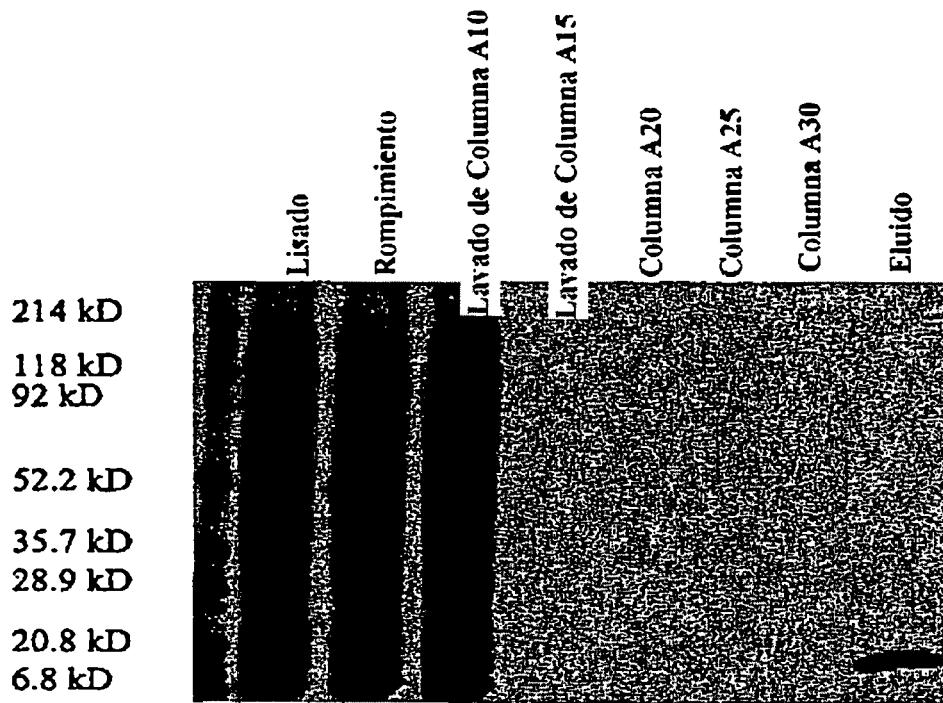


Figura 11. Purificación de ME-2 recombinante a partir de células de insecto

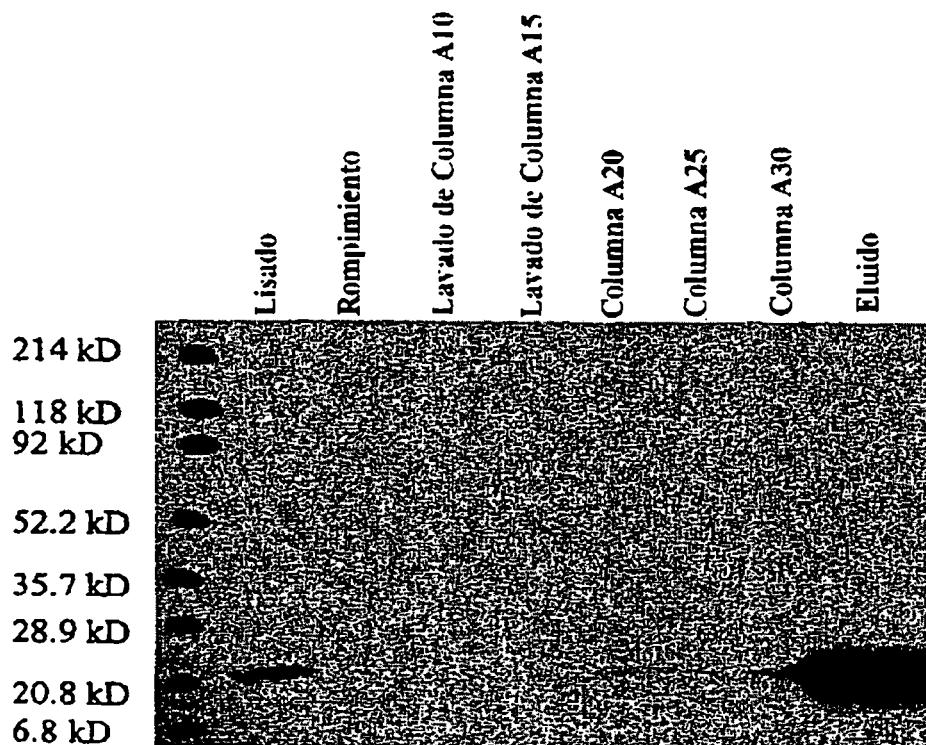


ES 2 326 324 T3

Figura 12. Purificación de EPP-2 recombinante a partir de células de insecto

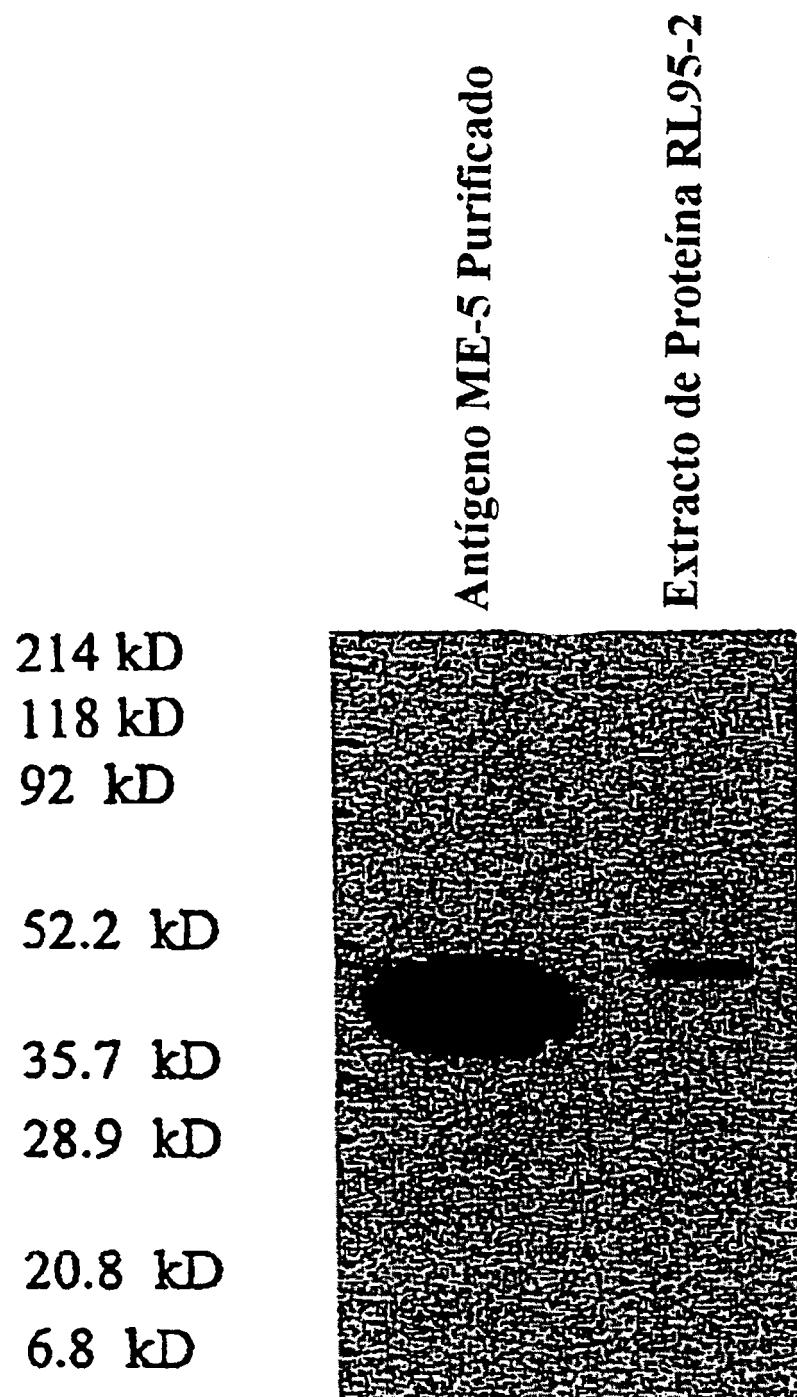


SDS PAGE
Código de Mancha del Gel



Anti-His G Mab

Figura 13. Identificación del antígeno ME-5 nativo



ES 2 326 324 T3

Figura 14. Distribución en el tejido de proteína nativa ME-5

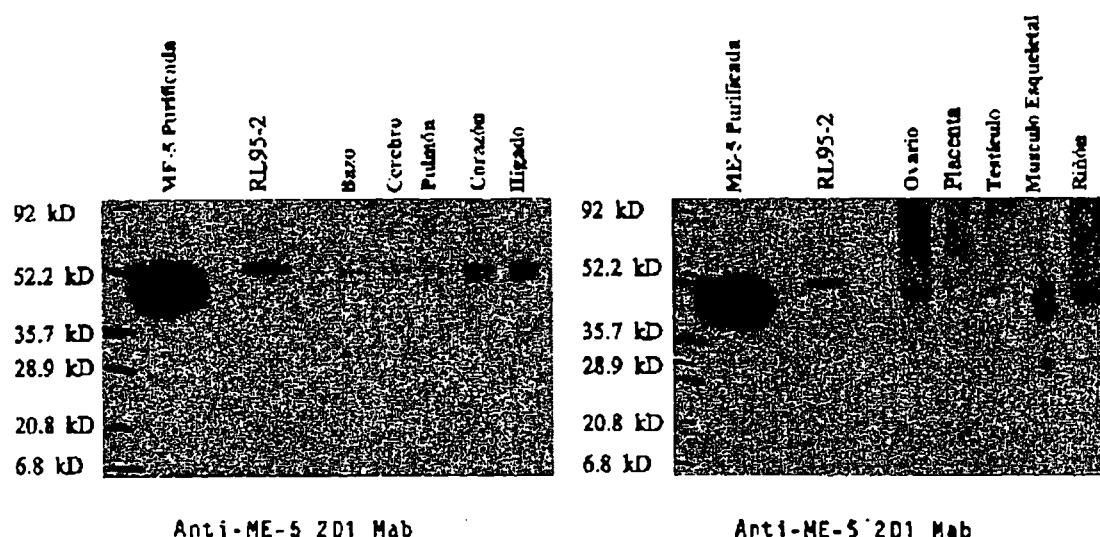


Figura 15A. Reactividad de los sueros de control con ME-5 recombinante sobre transferencias en línea

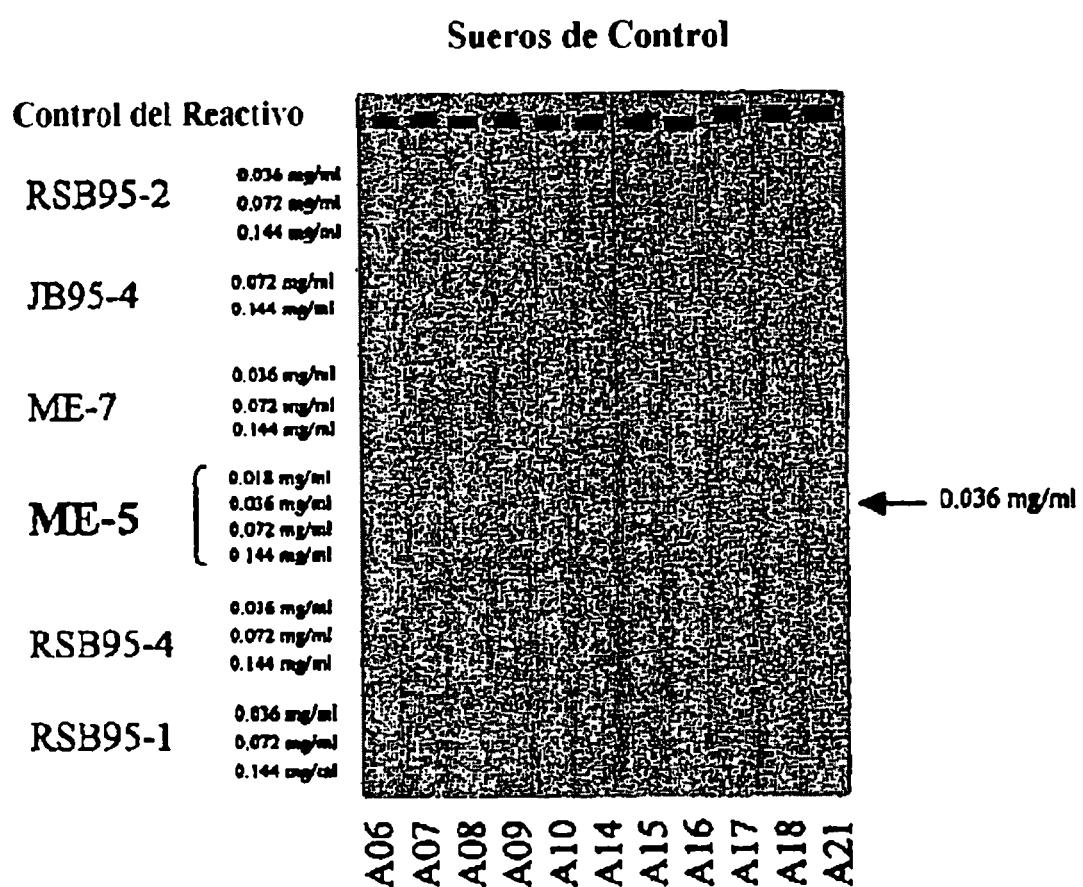


Figura 15B. Reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis con antígeno recombinante ME-5 sobre transferencias en línea

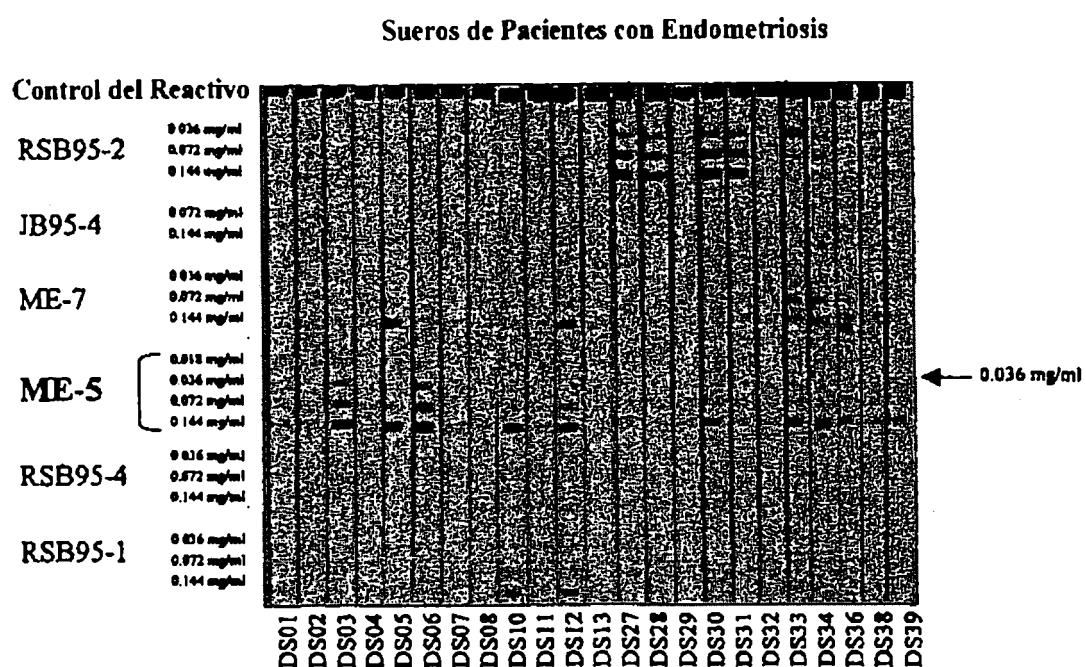


Figura 16A. Reactividad de los sueros de control con ME-2 recombinante sobre transferencias en línea

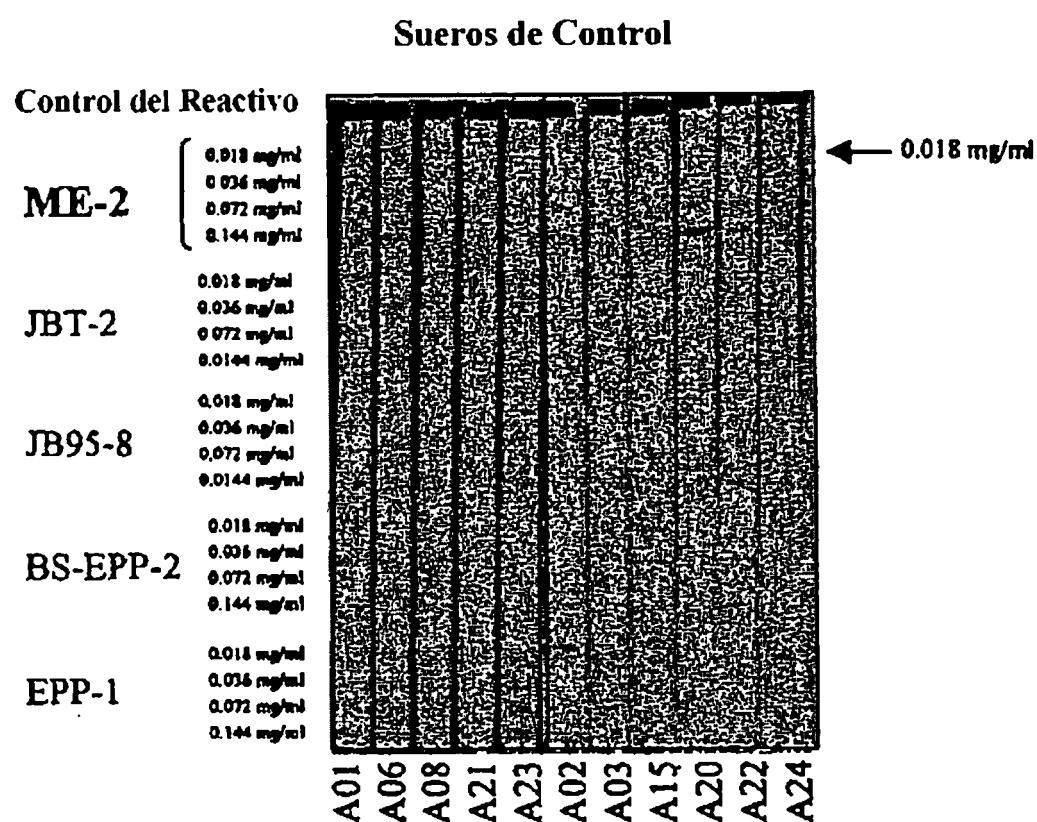


Figura 16B. Reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis con ME-2 recombinante sobre transferencias en línea

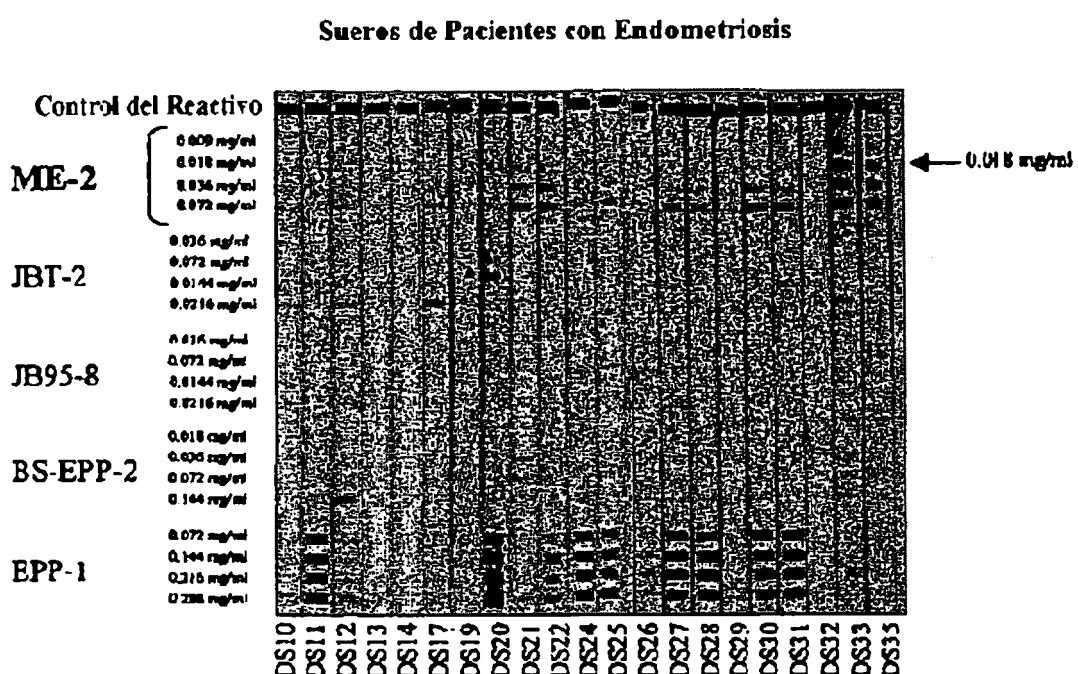
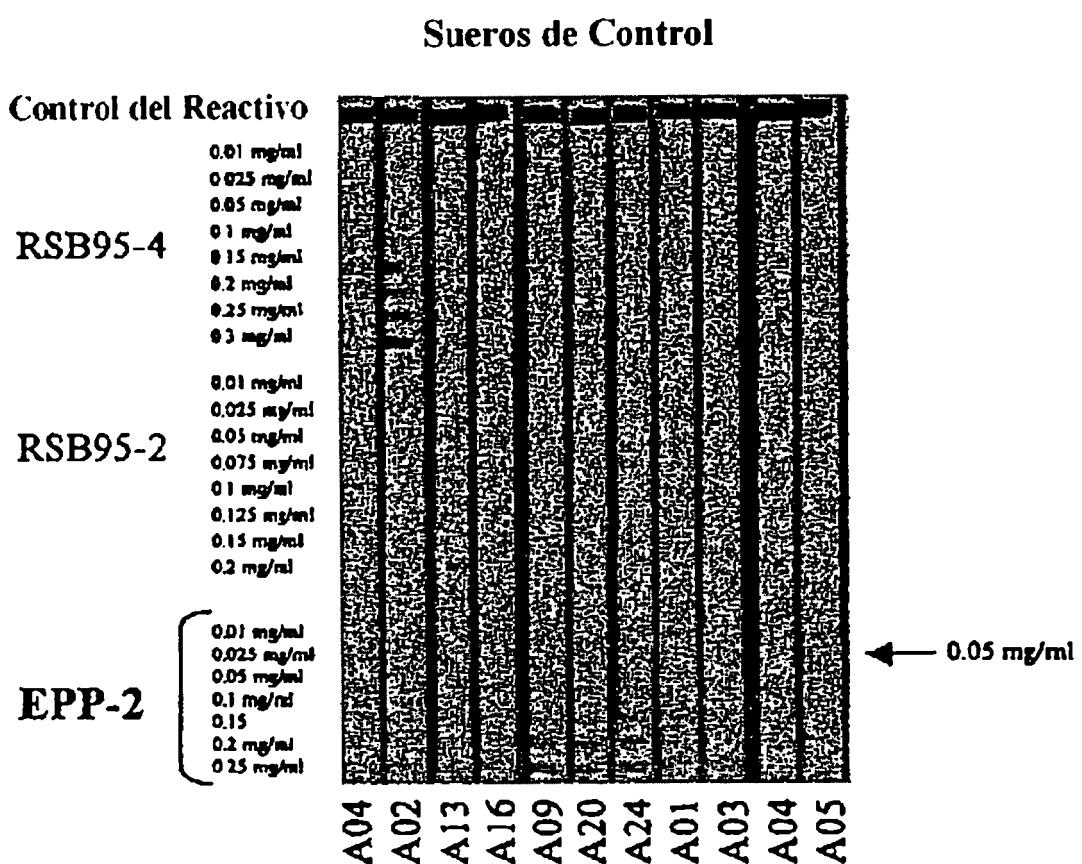


Figura 17A. Reactividad de los sueros de control con EPP-2 recombinante sobre transferencias en linea



ES 2 326 324 T3

Figura 17B. Reactividad de los sueros de pacientes con endometriosis con EPP-2 recombinante sobre transferencias en línea

