



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 804**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05748087 .3**

96 Fecha de presentación : **24.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1766411**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54

Título: **Método para determinar un proceso de degradación tisular mediante la detección de neoepítomos de COMP.**

30

Prioridad: **24.05.2004 DK 2004 00815**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

73

Titular/es: **ANAMAR AB**
Kungsporsavenyn 22
411 36 Goteborg, SE

72

Inventor/es: **Heinegård, Dick;**
Önnerfjord, Patrik y
Stubendorff, Johann, Jakob

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 360 804 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar un proceso de degradación tisular mediante la detección de neoepítomos de COMP

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para determinar un proceso de degradación tisular mediante la detección de neoepítomos de COMP (proteína oligomérica de matriz de cartílago), a anticuerpos contra neoepítomos de COMP y a fragmentos que contienen neoepítomos de COMP para la generación de tales anticuerpos.

10

Antecedentes

Las afecciones patológicas que producen degradación de tejido tal como la degradación de cartílago constituyen un problema médico, social y económico principal. De las personas mayores de 65 años de edad, alrededor de 500 de 1.000 tienen artritis. Los procesos de degradación tisular se caracterizan por la ruptura de los componentes del tejido. Los componentes del tejido se pueden degradar debido a, por ejemplo, estrés mecánico, compuestos tóxicos o por enzimas. Por esta razón, la determinación de los procesos de degradación de tejido para los fines de diagnóstico, seguimiento de enfermedad, tratamiento, etc., se puede realizar por numerosos métodos. Una manera de determinar procesos de degradación en enfermedades de tejido conjuntivo, tales como afecciones artríticas, arterioesclerosis, afecciones degenerativas de las articulaciones, etc., es la detección de la presencia de productos de degradación de los componentes del tejido conjuntivo. Esto permite la detección directa del proceso de degradación, comparado con métodos indirectos como, por ejemplo, medir cantidades aumentadas de leucocitos, que se han empleado ampliamente en el diagnóstico de procesos inflamatorios tal como afecciones artríticas.

15

20

25

30

35

40

45

Tradicionalmente, el diagnóstico clínico de la se basa en los antecedentes del paciente, exploración física y radiografías. El pronóstico, tratamiento y desenlace clínico de pacientes con artritis se evalúan por determinaciones en serie. Sin embargo, para minimizar el daño tisular permanente causado por afecciones patológicas que cursan con degeneración de cartílago, es importante ser capaz de diagnosticar tales afecciones en una fase temprana. Según esto, durante la última década se han hecho esfuerzos para encontrar marcadores biológicos adecuados que permitan una detección temprana de degeneración patológica de cartílago.

Uno de tales marcadores biológicos es COMP. Previamente se ha asociado un nivel elevado en suero de COMP con destrucción de articulaciones en artritis reumatoide (Månsson et al., J. Clin. Invest (1995), vol. 95, pp. 1077-1077; Wolhein et al., British Journal of Rheumatology (1997), vol. 36, pp. 847-849; Petersson et al., British Journal of Rheumatology (1998), vol. 37, pp. 46-50). También se han encontrado cantidades significativas de fragmentos pequeños de COMP en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y otras formas de artritis inflamatoria (Neidhardt et al., British Journal of Rheumatology (1997), vol. 36, pp. 1151-1160).

El documento WO980935 divulga un método para la determinación de degradación de tejido cribando para la presencia de uno o más neoepítomos de COMP que aparecen después del corte de COMP.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado un método para la determinación de procesos de degradación tisular usando fragmentos específicos de COMP como marcador para la degradación de tejido. Al usar fragmentos de COMP como marcador para procesos de degradación de tejido se obtiene un relación señal a ruido mucho mayor y por tanto el problema de tener resultados de la prueba falsos positivos se minimiza o casi evita. La mayor relación señal a ruido del método presente también permite una detección más temprana del proceso de degradación de tejido, que es un factor importante en el diagnóstico de afecciones degenerativas, ya que permite el tratamiento temprano de la enfermedad y por tanto una posibilidad mucho mayor de recuperación.

50

55

60

65

Basado en la identificación de sitios de corte específicos en COMP, los inventores han desarrollado un método mejorado para la determinación de un proceso de degradación tisular. Según esto, la presente invención se refiere a un método para determinar un proceso de degradación tisular que comprende detectar en una muestra la presencia de uno o más neoepítomos de COMP de mamífero que aparece después de cortar COMP entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID No: 1). El método se puede usar para diagnóstico, seguimiento de la enfermedad y/o seguimiento terapéutico del proceso de degradación tisular. El proceso de degradación puede tener lugar en un tejido conjuntivo, tal como por ejemplo, cartílago, tendón, ligamentos, hueso, vasos sanguíneos, discos intervertebrales y menisco.

La detección de neoepítos específicos de fragmentos de COMP se puede realizar usando anticuerpos contra los neoepítos de COMP, por tanto la presente invención también se refiere a tales anticuerpos y al uso de los mismos. Además la invención divulga fragmentos aislados de COMP que comprenden uno o más neoepítos, para su uso en la producción de anticuerpos contra neoepítos de COMP como se definen aquí.

Descripción detallada

La degradación de estructuras en cartílago articular se ve típicamente en todas las enfermedades que producen crónicamente la destrucción de la estructura de la articulación. Como ejemplos de tales trastornos se pueden mencionar artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis/osteoartrosis. La inflamación aguda de una articulación, por ejemplo, en la artritis reactiva, traumatismo, etc., con frecuencia está acompañada por una destrucción de cartílago, aunque en la mayoría de los casos esto no se desarrollará en la enfermedad crónicamente destructiva. No se sabe qué factores son cruciales para que la articulación agudamente inflamada progrese a la curación o se desarrolle en un proceso crónico. Los ejemplos de enfermedades que cursan con inflamación aguda de la articulación tal como la artritis reactiva secundaria a infección por yersinia, clamidia, salmonella, así como artritis por pirofosfato, gota (artritis úrica), artritis séptica y varias artritis de etiología traumática. Entre otros factores que potencialmente favorecen la destrucción del cartílago articular se puede mencionar, por ejemplo, el tratamiento con cortisona; esto se ha considerado durante mucho tiempo que acelera el proceso degenerativo en osteoartritis/osteoartrosis. Sin embargo, se debe advertir que las auténticas afecciones que prevalecen en casos de artritis con inflamación grave de la articulación son de un carácter bastante más complejo, ya que en esos casos la inyección de cortisona parece tener un efecto positivo global.

Otras enfermedades asociadas con cambios tisulares son enfermedades inflamatorias de las articulaciones tales como, por ejemplo, artritis crónica juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis infecciosa y artritis idiopática juvenil, otras enfermedades que afectan a estructuras de la articulación tales como, por ejemplo, artrosis, daño en el menisco, gota, enfermedades que afectan al disco intervertebral de la columna vertebral, tales como, por ejemplo, lumbago, enfermedades que afectan elementos estructurales del sistema musculoesquelético tales como daño en el tendón, daño en el ligamento y enfermedades óseas tal como, por ejemplo, osteoporosis, enfermedades que afectan arterias principales incluyendo aterosclerosis, vasculitis y traumatismo que produce lesión, enfermedades pulmonares incluyendo asma y EPOC.

Un objeto importante de la presente invención es mejorar las posibilidades diagnósticas de los procesos de degradación tisular, particularmente en fases tempranas, y proporcionar un medio de seguir los efectos de medidas terapéuticas tomadas. En particular se prevé que un método según a presente invención pueda hacer posible diferenciar entre procesos de degradación tisular como, por ejemplo, artritis reumatoide (AR) y osteoartritis/osteoartrosis (OA).

Como se ha descrito anteriormente, los inventores de la presente invención han desarrollado un método fiable para la determinación de procesos de degradación tisular midiendo la presencia de fragmentos de COMP en el tejido y/o en los líquidos en contacto directo o indirecto con el tejido. El método presente permite una detección fiable y temprana del proceso de degradación tisular, que es un factor importante en el diagnóstico de afecciones degenerativas, ya que permite el tratamiento temprano de la enfermedad y por tanto una posibilidad mucho mayor de recuperación. La detección temprana del proceso de degradación tisular también permite seguir la eficacia de la terapia, y la identificación de pacientes con un proceso de degradación tisular activo, que es adecuado para terapia.

El método se basa en la observación de que se forman neoepítos de COMP durante por ejemplo, la degradación de cartílago. La delineación de fragmentos específicos de COMP por los inventores permite la identificación de neoepítos de COMP, que se pueden usar en la determinación de la degradación tisular. Los fragmentos de COMP que contienen neoepítos de COMP se pueden emplear en la producción de anticuerpos contra neoepítos de COMP, que se pueden usar en la detección de la presencia de neoepítos de COMP en procesos de degradación tisular.

Fragmentos de COMP

COMP (proteína oligomérica de matriz de cartílago) también denominada trombospondina 5, es prominente en cartílago, disco intervertebral pero también está presente en tendón (Cartilage matrix proteins: An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. E. Hedbom, P. Antonsson, A. Hjerpe, D. Aeschlimann, M. Paulsson, E. Rosa-Pimentel, Y. Sommarin, M. Wendel, Å. Oldberg y D. Heinegård. J. Biol. Chem. (1992) 267, 6132-6136., The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. R. Smith, L. Zunino, P. Webbon y D. Heinegård. Matrix Biology (1997) 16, 255-271).

La proteína tiene un papel en la formación de la red de colágeno, una entidad estructural importante en cartílago. De esta manera, se ha mostrado que se une a colágeno con gran afinidad (Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity, Zn-dependent interaction with triple helical collagen. K. Rosenberg, H. Olsson, M. Mörgelin y D. Heinegård. J. Biol. Chem. (1998) 273, 20397-20403.). En mutaciones de la proteína se observan graves trastornos del crecimiento de pseudocondroplasia y displasia epifisaria múltiple (Mutations in Cartilage Oligomeric Matrix Protein causing Pseudoachondroplasia and Multiple Epiphyseal Dysplasia affect binding of Calcium and Collagen I, II and IX. J. Thur, K. Rosenberg, P. Nitsche, T. Pihlajamaa, L. Ala-Kokko, D. Heinegård, M. Paulsson y P. Maurer. J. Biol. Chem. (2001) 276, 6083-6092.).

En una variedad de enfermedades de articulación la proteína se fragmenta y libera del cartílago al líquido sinovial, donde se pueden detectar los fragmentos (Cartilage oligomeric matrix protein. A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. T. Saxne y D. Heinegård. Brit. J. Rheumatol (1992) 31, 583-591; Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. B. Månsson, M. Ionescu, A.R. Poole, D. Heinegård y T. Saxne. J. Clin. Invest. (1995) 95, 1071-1077; Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. Vilim V, Olejarova M, Machacek S, Gatterova J, Kraus VB, Pavelka K. Osteoarthritis Cartilage. Sep. 2002; 10(9):707-13.). Los constituyentes moleculares liberados en su mayor parte representan fragmentos, pero se sabe poco sobre su carácter a pesar de que se ha hecho algo de mapeo de las regiones reconocidas por alguno de los anticuerpos usados (Monoclonal antibodies to human cartilage oligomeric matrix protein: epitope mapping and characterization of sandwich ELISA. Vilim V, Voburka Z, Vytasek R, Senolt L, Tchetverikov I, Kraus VB, Pavelka K. Clin Chim Acta. Feb. 2003; 328(1-2):59-69). Hasta la fecha, sin embargo, poco se sabe del corte que genera los fragmentos observados.

Un problema en ensayos de COMP en líquidos corporales para diagnóstico y seguimiento de enfermedad de las articulaciones y rotura de tejido es que hay un recambio de fondo en particularmente todos los tejidos cartilaginosos que es parte de la adaptación normal de estos tejidos a la carga y medio ambiente. Como resultado, la rotura aumentada que se produce en un cartílago de articulación particular en enfermedad solo se puede ver contra un fondo de recambio normal. De esta manera, el aumento es solo encima de un nivel existente. Es deseable identificar hechos sobre los fragmentos que distinguen los patológicos de los normalmente presentes. Un planteamiento para esto es identificar los terminales específicos que están presentes en los varios fragmentos y después desarrollar anticuerpos que solo reconocen tal extremo específico y por tanto solo un fragmento determinado.

Los presentes inventores por tanto se comprometieron a estudiar fragmentos de COMP en un tejido, que experimenta degeneración con aparente rotura y alteración de la matriz tisular. Este tejido, el disco intervertebral de personas mayores se estudió adicionalmente.

En general, COMP se extrajo y purificó. Se separaron los fragmentos y se determinó el extremo de dos de tales fragmentos, que define cada uno así dos nuevos epítomos (neopítomos), que es la secuencia de péptido en el lado N-terminal del corte (lo que define un nuevo extremo C) y la secuencia de péptido en el lado C-terminal del corte (lo que define un nuevo extremo C). Se han generado anticuerpos contra una de estas secuencias peptídicas como se demuestra al reaccionar con el fragmento, mientras que no con COMP intacta.

Definiciones

El término "proceso de degradación tisular" se define como cualquier fase desde el principio hasta el final de un proceso de ruptura en tejido.

El término "neopítomo" se define como un epítomo, que normalmente no está expuesto en tejido, células o moléculas normales. Los cambios fenotípicos en una célula pueden incluir pérdida de componentes de epítomos antigénicos de superficie celular normal y la ganancia de nuevos neopítomos. Otras formas de ganar neopítomos son por cambios estructurales de moléculas, tal como proteínas. En el contexto de esta solicitud, un neopítomo es un epítomo que normalmente no está expuesto en COMP, pero aparece después de cambios de la proteína. Ejemplos de cambios pueden ser alteraciones en el plegamiento de la proteína que producen cambios estructurales de la estructura secundaria y/o terciaria de COMP. Un cambio de COMP también puede resultar de, por ejemplo, corte de la proteína. El neopítomo puede estar formado, por ejemplo, por una estructura primaria, secundaria y/o terciaria de un fragmento de COMP que aparece después del corte.

El término "fragmento" se define como un producto de degradación de una proteína generado por la rotura en uno o más puntos del esqueleto de la proteína. En el contexto actual, se define fragmento como un fragmento de COMP generado por la degradación de COMP tal como, por ejemplo, por corte de la

proteína. El fragmento se puede generar por degradación de COMP *in vivo* o *in vitro* opcionalmente seguida por aislamiento del fragmento o el fragmento se puede generar *in vitro* expresando partes de la molécula COMP usando un método sintético, semisintético y/o recombinante.

5 El término “péptido” se define como una secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos presentes en la secuencia se pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, sustituido o sin sustituir. El péptido comprende de dos a 100 aminoácidos en la secuencia.

10 En el presente contexto el término “fragmento de COMP” se pretende que indique una parte de la secuencia de COMP de longitud completa, por ejemplo, una versión C-terminalmente y/o N-terminalmente truncada de la misma. Un ejemplo específico de un fragmento de COMP contiene una secuencia de al menos 3 residuos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% a la de COMP de mamífero tal como por ejemplo, COMP humana como se reivindica aquí.

15 El término “anticuerpo” se define como un compuesto que tiene una estructura que se une a uno o más antígenos y/o epítomos. En el presente contexto, el anticuerpo/compuesto se dirige a neoepítomos de COMP. El compuesto puede ser uno o más fragmentos de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) o un fragmento F(ab)₂ (un fragmento que contiene dos Fab), o el compuesto puede ser un anticuerpo en general.

20 El término “espaciador” se define como un compuesto con la función de mantener otros dos compuestos, moléculas o átomos (por ejemplo, un fragmento de COMP y una proteína inmunógena) unidos a cada extremo del espaciador, aparte con una cierta distancia. Los ejemplos de espaciadores son uno o más residuos de aminoácidos, tal como, por ejemplo, uno o más residuos de glicina, uno o varios residuos de monosacáridos, polímeros sintéticos incluyendo por ejemplo, agentes de entrecruzamiento con una cadena alifática de longitud variable con grupos hidrofílicos ejemplificado por los reactivos SPDP (N-(succinimidil-piridilditio-propionato-hexanoato) de Pierce Chemicals.

25 En la presente solicitud, los aminoácidos en COMP se numeran según la lista de secuencias.

30 *Sitios de corte de COMP*

Los inventores de la presente invención han identificado sitios de corte específicos de COMP hasta ahora desconocidos. Los sitios de corte están localizados en el N-terminal de COMP, más específicamente entre la posición 530 y 660 de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO. 1), por ejemplo, el corte de COMP está en uno o más sitios entre la posición 540 y 650, tal como por ejemplo, entre la posición 540 y 640 de la secuencia de aminoácidos de COMP.

40 Más específicamente y como se muestra en los ejemplos aquí, los presentes inventores han encontrado dos sitios de corte de COMP humana. Uno entre la posición 540 y 560 de la secuencia de aminoácidos de COMP y el otro entre la posición 610 y 630 de la secuencia de aminoácidos de COMP.

45 El sitio de corte específico entre la posición 540 y 560 es entre la posición 550 (N⁵⁵⁰) y 551 (W⁵⁵¹), mientras que el otro sitio de corte específico es entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶).

Los sitios de corte anteriormente mencionados se refieren a COMP humana.

Fragmentos de COMP para uso en la producción de anticuerpos

50 Como se ha mencionado antes, la identificación de neoepítomos en COMP permite la producción de anticuerpos contra los neoepítomos para la determinación de degradación de cartílago. Se puede usar una forma aislada de uno o más fragmentos de COMP que comprende neoepítomos para generar tales anticuerpos.

55 La especificidad deseada en un método según la presente invención normalmente requiere 12 tal como, por ejemplo, 10 o menos residuos de aminoácidos con el nuevo extremo libre. De esta manera, se contempla que péptidos que tienen 3 residuos de aminoácidos tal como, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más residuos de aminoácidos que tienen una identidad del 100% a la parte C-terminal (es decir, los últimos 15 residuos de aminoácidos) de los nuevos fragmentos peptídicos en el lado N-terminal del corte (que define un nuevo extremo C) o a la parte N-terminal (es decir, los primeros 15 residuos de aminoácidos) de los nuevos fragmentos peptídicos en el lado C-terminal del corte (que define un nuevo extremo N), respectivamente, son útiles en este contexto.

65 Los fragmentos se pueden producir *in vivo* como resultado de degradación de COMP, o los fragmentos se pueden preparar *in vitro* por corte enzimático o por un método sintético, semisintético y/o recombinante.

El uso de fragmentos de COMP que se producen *in vivo* para la generación de anticuerpos contra neoepítomos de COMP, implica el aislamiento de los fragmentos de un líquido corporal tal como sangre o líquido sinovial, de tejido conjuntivo, tal como cartílago, hueso, ligamentos, tendón, vasos sanguíneos, discos intervertebrales y menisco. El fragmento también se puede aislar de células en un tejido conjuntivo, tal como por ejemplo, fibroblastos, condrocitos, células de músculo liso o células tumorales.

La preparación del fragmento *in vitro* se puede realizar mediante un método para expresar el fragmento, que comprende los pasos de

- i) construir un vector de expresión de ADN recombinante que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica el fragmento a ser expresado
- ii) transformar una célula huésped procarionota o eucariota compatible con el vector de modo que el fragmento se pueda expresar por la célula huésped, y cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo adecuado para producir el fragmento, y
- iii) opcionalmente, aislar y/o purificar el fragmento.

Los fragmentos según la presente invención son fragmentos de COMP humana (SEQ ID NO 1).

A continuación, se mencionan fragmentos específicos.

20 *Fragmentos de COMP humana que contienen neoepítomos que aparecen después de corte entre N⁶²⁵ y P⁶²⁶ de COMP*

En una forma de realización, la invención se refiere a un fragmento de COMP humana, en donde el fragmento tiene la secuencia de aminoácidos WKQMEQTYWQAN (COMP₆₁₄₋₆₂₅) (SEQ ID NO 22).

En otras formas de realización la invención se refiere a uno o más fragmentos de COMP humana, en donde el fragmento tiene una de las siguientes secuencias:

KQMEQTYWQAN (SEQ ID NO 23)

QMEQTYWQAN (SEQ ID NO 24)

MEQTYWQAN (SEQ ID NO 25)

EQTYWQAN (SEQ ID NO 26)

QTYWQAN (SEQ ID NO 27)

TYWQAN (SEQ ID NO 28)

YWQAN (SEQ ID NO 29)

WQAN (SEQ ID NO 30)

QAN (SEQ ID NO 31)

El corte produce la aparición de otro fragmento que tiene P como nuevo extremo N. Según esto, la invención también se refiere a uno o más fragmentos de COMP humana, en donde el fragmento tiene una de las siguientes secuencias:

PFRAVAEPIQL (COMP₆₂₆₋₆₃₇) (SEQ ID NO 32)

PFRAVAEPIQ (SEQ ID NO 33)

PFRAVAEPI (SEQ ID NO 34)

PFRAVAEPG (SEQ ID NO 35)

PFRAVAEP (SEQ ID NO 36)

PFRAVAE (SEQ ID NO 37)

PFRAVA (SEQ ID NO 38)

PFRAV (SEQ ID NO 39)

PFRA (SEQ ID NO 40)

50 *Conjugados de péptidos y/o fragmentos*

Normalmente los péptidos no son antigénicos por sí mismos. Por tanto, con frecuencia los péptidos se acoplan a una proteína exógena que actúa de esta manera como un hapteno. Normalmente, tales proteínas se eligen de modo que no se produzcan en ninguna especie a ser investigada para evitar reacción de los anticuerpos a esta proteína. De esta manera, la reactividad estará restringida al neoepítomo en el péptido corto.

La presente invención también se refiere a un conjugado de fragmento para su uso en la producción de anticuerpos contra uno o más neoepítomos de COMP como se definen aquí. Preferiblemente, los fragmentos según la invención se acoplan a través del extremo que no representa el sitio de corte a un transportador proteico. En una forma de realización específica, la proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina y también puede emplear otras proteínas no presentes en el animal inmunizado con o sin acoplamiento covalente.

65 *Anticuerpos contra neoepítomos de COMP*

Las observaciones de que se forman neoepítomos de COMP tras la degradación de la proteína incluyendo la identificación de los sitios de corte de COMP son útiles en la generación de anticuerpos contra los neoepítomos de COMP. De esta manera, la presente invención se refiere a uno o más anticuerpos generados contra uno o más neoepítomos de COMP de la invención. La degradación de COMP produce fragmentos de COMP que pueden contener neoepítomos formados, por ejemplo, por una parte de la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos. Según esto, la invención también se refiere a neoepítomos de COMP que aparecen en uno o más fragmentos de COMP producidos por el corte de COMP, entre las posiciones 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO: 1), como se define en las reivindicaciones 2-4.

Ejemplos de neoepítomos formados por la estructura primaria de los fragmentos son los nuevos extremos N y C de COMP que aparecen después del corte. El neoepítomo puede estar formado por 3-12 aminoácidos de los nuevos extremos N y C. Se divulgan ejemplos de las secuencias de aminoácidos en las secciones "*Fragmentos para su uso en la producción de anticuerpos contra neoepítomos de COMP*" y "*Péptidos para su uso en la producción de anticuerpos contra neoepítomos de COMP*".

Los neoepítomos también pueden estar formados por la estructura secundaria de los fragmentos de COMP generados por el corte, y por tanto comprender elementos estructurales secundarios, tales como por ejemplo, hélices α , láminas β , giros β y/o bucles de cisteína/puentes disulfuro, etc., de los fragmentos. Además, los neoepítomos pueden estar formados por elementos estructurales terciarios de los fragmentos de COMP.

Los anticuerpos contra los neoepítomos de COMP se pueden obtener inmunizando una animal con uno o más fragmentos de COMP y/o uno o más conjugados según la invención. El animal inmunizado se puede seleccionar del grupo que comprende seres humanos, ratones, ratas, conejos, ovejas, primates no humanos, cabra, caballo y aves de corral.

Los anticuerpos según la invención también se pueden obtener mediante métodos de inmunización *in vitro* usando uno o más fragmentos de COMP y/o uno o más conjugados según la invención.

El anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

La producción de un anticuerpo según la invención puede implicar el planteamiento de presentación en fagos. Cuando se genera el anticuerpo por el planteamiento de presentación en fagos, el anticuerpo puede ser uno o más fragmentos de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) o un fragmento F(ab)₂ (un fragmento que contiene dos Fab) o un anticuerpo intacto que se une a uno o más neoepítomos de COMP.

Los anticuerpos según la invención se pueden usar para la detección de neoepítomos de COMP, y según esto la presente invención también se refiere a un método para determinar un proceso de degradación tisular según la invención, en donde la presencia de uno o más neoepítomos se detecta usando uno o más anticuerpos según la invención.

Los anticuerpos contra neoepítomos de COMP según la invención se pueden usar en medicina. Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos se pueden usar para determinar un proceso de degradación tisular, en donde están presentes neoepítomos de COMP. Tal método de determinación se puede emplear en el diagnóstico, seguimiento de enfermedad y/o seguimiento terapéutico de un proceso de degradación de tejido.

Ejemplos de procesos de degradación tisular, que se pueden determinar por un método de determinación según la presente invención, son procesos de degradación tisular implicados en artritis. La afección de artritis se puede seleccionar del grupo que consiste en artritis crónica, tal como por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis/osteoartrosis, artritis psoriásica, artritis crónica juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis infecciosa y artritis idiopática juvenil, enfermedades que afectan al disco intervertebral de la columna vertebral, tales como, por ejemplo, lumbalgia, daño en el menisco, enfermedades de tendón y ligamento, enfermedades que afectan arterias principales incluyendo aterosclerosis, vasculitis y traumatismo que produce lesión y gota.

Uso de anticuerpos generados contra uno o más neoepítomos de COMP

Los anticuerpos contra estos neoepítomos se usarán para desarrollar ensayos específicos que solo detectarán fragmentos que contienen estos cortes específicos.

Según esto, el uso de estos anticuerpos puede ser

5 i) en combinación con otros anticuerpos que reaccionan con COMP en inmunoensayos de tipo sándwich donde un anticuerpo, por ejemplo, específico para el neoepítipo se usa para coger el fragmento y otro anticuerpo. El otro anticuerpo podría ser un anticuerpo que reacciona con el otro extremo del fragmento o un anticuerpo que reacciona con cualquier sitio presente en el fragmento,

ii) el uso de los anticuerpos en inmunoensayos de inhibición donde la unión del anticuerpo al epítipo específico, por ejemplo, presentado por un péptido sintético o por un fragmento se inhibe por la muestra de líquido corporal a ser ensayada.

10 Los ensayos proporcionan una alta especificidad para los fragmentos presentes en los líquidos corporales y son específicos para AR y OA.

15 Según esto, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en diagnóstico, diagnóstico diferencial (por ejemplo, diferenciar entre dos enfermedades distintas o entre cartílago u otros tejidos normal y enfermo), seguimiento de enfermedad y/o seguimiento terapéutico de un proceso de degradación tisular.

20 Además, para verificar la especificidad de los anticuerpos una eliminación del nuevo aminoácido terminal del péptido debe delecionar la reactividad del anticuerpo. El anticuerpo también se tendrá que probar contra la proteína intacta para mostrar una falta de reactividad. Se puede probar además la reactividad específica del fragmento en inmunotransferencia. La reactividad debe ser inhibida por el péptido sintético correcto pero no por péptidos sin relación.

25 Una aplicación es generar anticuerpos por tecnología in vitro y otra es usar procedimientos de presentación en fagos para buscar péptidos/proteínas específicos que reaccionan, no necesariamente anticuerpos.

Kits

30 La forma comercial de un método analítico con frecuencia es un kit. Un kit incluye más de un componente para la realización del ensayo. Puede incluir una sustancia e instrucciones detalladas para su uso. En general, el kit incluye todos o la mayoría de los componentes necesarios para el ensayo.

35 Hay numerosos tipos de métodos que se pueden usar para el análisis de una sustancia específica. Para encontrar la localización de una sustancia en tejido se pueden usar, por ejemplo, componentes reactivos fluorescentes o marcados con oro como anticuerpos. Diferentes métodos para detectar y cuantificar una sustancia en varios líquidos incluyen métodos nefelométricos y turbidométricos pero más particularmente ELISA y RIA. Todos estos métodos tienen nombres detallados según el marco especial en realización y aplicaciones. El ELISA se podría, por ejemplo, presentar como un método sándwich incluyendo una situación de recogida y una fase posterior de detección de sustancia unida o un método de inhibición donde la sustancia a ser analizada puede reaccionar en una mezcla con componentes reactivos como anticuerpos y los anticuerpos no reactivos en esta mezcla se detectan posteriormente haciéndolos reaccionar con, por ejemplo, sustancia pura inmovilizada.

45 Un kit para determinar un proceso de degradación de tejido por un método según la invención puede comprender los siguientes componentes:

50 i) Un primer componente que comprende uno o más anticuerpos según la invención. Los anticuerpos pueden ser ligandos, fragmentos de anticuerpos, tal como Fab o F(ab)'2 identificados por los métodos de presentación en fagos o anticuerpos intactos que se unen a neoepítipos de COMP.

ii) Un segundo componente que comprende medios para detectar si el uno y más anticuerpos han reaccionado con uno o más neoepítipos como se definen anteriormente.

55 Un modo de detectar en una muestra la presencia de uno o más neoepítipos de COMP en fragmentos resultantes de la degradación de COMP es, por ejemplo, por un ensayo de competición. En un ejemplo de tal ensayo de competición, se acoplan uno o más anticuerpos según la presente invención, que se unen a uno o más neoepítipos de COMP, a una fase sólida, tal como por ejemplo, un pocillo en una placa. El uno o más anticuerpos se ocupan con fragmentos marcados que contienen neoepítipos de COMP mediante unión a los neoepítipos. La presencia de neoepítipos de COMP en una muestra se puede medir después añadiendo la muestra al pocillo en la placa. Si están presentes uno o más neoepítipos de COMP en la muestra, competirán con los fragmentos marcados que contienen neoepítipos de COMP para la unión a los anticuerpos, y se puede detectar una disminución en el nivel del marcaje (por ejemplo, radioactividad, fluorescencia, etc.).

65 De esta manera, un kit para determinar un proceso de degradación de tejido por un método según la invención puede comprender los siguientes componentes:

- i) Un primer componente que comprende uno o más anticuerpos según la invención, el uno o más anticuerpos están opcionalmente acoplados a una fase sólida.
- ii) Un segundo componente que comprende uno o más fragmentos marcados de COMP que comprende uno o más neoepítomos como se han definido anteriormente.

5

Otra manera de detectar en una muestra la presencia de uno o más neoepítomos de COMP en fragmentos resultantes de degradación de COMP es, por ejemplo, mediante un ensayo sándwich que comprende dos componentes diferentes que se unen a uno o más fragmentos que contienen uno o más neoepítomos de COMP: Un primer componente que se une a una parte arbitraria del uno o más fragmentos, y un segundo componente que comprende uno o más anticuerpos de la invención, que se unen a uno o más neoepítomos de COMP del uno o más fragmentos. En un ejemplo de tal ensayo sándwich, el primer componente está acoplado a una fase sólida, tal como, por ejemplo, un pocillo en una placa. La presencia de neoepítomos de COMP en una muestra se puede detectar luego añadiendo en primer lugar la muestra al pocillo. Si están presentes en la muestra uno o más fragmentos que contienen neoepítomos de COMP, los fragmentos se unirán a la fase sólida a través del primer componente, y la presencia de neoepítomos de COMP en los fragmentos se puede medir luego añadiendo en segundo lugar el segundo componente que comprende los anticuerpos de la invención, que se unen al uno o más neoepítomos de COMP. Los anticuerpos de la invención están opcionalmente marcados con, por ejemplo, un marcador radioactivo o fluorescente para medir el nivel de anticuerpo unido a los neoepítomos de COMP presentes en la muestra. Si los anticuerpos no están marcados, el nivel de anticuerpos unidos a los neoepítomos de COMP presentes en la muestra se puede medir añadiendo un tercer componente marcado, que se une a los anticuerpos.

En el ensayo sándwich, el componente acoplado a la fase sólida puede ser el primer componente o el segundo componente. En el ejemplo dado anteriormente, el primer componente está acoplado a la fase sólida. En la siguiente situación, el segundo componente está acoplado a la fase sólida. En otro ejemplo del ensayo sándwich, el segundo componente que comprende los anticuerpos de la presente invención, está acoplado a una fase sólida, tal como por ejemplo, un pocillo en una placa. La presencia de neoepítomos de COMP en una muestra se puede detectar después añadiendo en primer lugar la muestra al pocillo en la placa. Si están presentes en la muestra uno o más fragmentos que contienen neoepítomos de COMP, los fragmentos se unirán a la fase sólida a través de los anticuerpos, que se unen a los neoepítomos en los fragmentos. La presencia de fragmentos que contienen neoepítomos de COMP se puede medir luego añadiendo en segundo lugar el primer componente que comprende una o más sustancias que se unen a una parte arbitraria del uno o más fragmentos. La una o más sustancias están opcionalmente marcadas con, por ejemplo un marcador radioactivo o fluorescente para medir el nivel de sustancia marcada a los fragmentos presentes en la muestra. Si las sustancias no están marcadas, se puede medir el nivel de sustancia unida al fragmento que contiene neoepítomos de COMP presentes en la muestra añadiendo un tercer componente marcado, que se une a la una o más sustancias.

De forma alternativa un kit para determinar un proceso de degradación de tejido por un método según la invención puede comprender los siguientes componentes:

- i) Un primer componente que comprende una o más sustancias que se unen a COMP o a un fragmento de la misma, las sustancias opcionalmente están acopladas a una fase sólida y opcionalmente están marcadas.
- ii) Un segundo componente que comprende uno o más anticuerpos según la invención, y el uno o más anticuerpos opcionalmente acoplados a una fase sólida y opcionalmente están marcados.
- iii) Opcionalmente, un tercer componente que comprende medios para detectar si la una o más sustancias o el uno o más anticuerpos han reaccionado con uno o más neoepítomos como se han definido anteriormente.

50

También es posible detectar en una muestra la presencia de uno o más anticuerpos que se unen a neoepítomos de COMP como se ha definido anteriormente, por ejemplo, mediante un ensayo que comprende dos componentes diferentes: Un primer componente que comprende uno o más fragmentos de COMP que comprenden uno o más neoepítomos como se ha definido anteriormente, y un segundo componente que comprende medios para detectar si uno y más anticuerpos en la muestra han reaccionado con los neoepítomos.

55

En un ejemplo del ensayo, el uno o más fragmentos de COMP que comprenden uno o más neoepítomos como se han definido anteriormente, están acoplados a una fase sólida, tal como por ejemplo, un pocillo en una placa. La presencia de anticuerpos en una muestra se puede detectar luego añadiendo en primer lugar la muestra al pocillo. Si uno o más anticuerpos contra los neoepítomos de COMP están presentes en la muestra, los anticuerpos se unirán a la fase sólida a través del uno o más fragmentos, y se puede medir después la presencia de anticuerpos añadiendo en segundo lugar el segundo componente que comprende sustancias, que se unen al uno o más anticuerpos. Las sustancias pueden estar marcadas con, por ejemplo, un marcador radioactivo o fluorescente para medir el nivel de anticuerpo unido a los neoepítomos de COMP en los fragmentos en el pocillo.

65

Un kit para determinar un proceso de degradación de tejido que determina en una muestra cualquier presencia de uno o más anticuerpos contra uno o más neoepítomos como se ha definido aquí también puede comprender los siguientes componentes:

- 5 i) Un primer componente que comprende uno o más fragmentos de COMP que comprenden uno o más neoepítomos como se definen en las reivindicaciones, el uno o más fragmentos están opcionalmente acoplados a una fase sólida.
- 10 ii) Un segundo componente que comprende medios para detectar si uno o más anticuerpos han reaccionado con los neoepítomos.

En una forma de realización, el proceso de degradación de tejido tiene lugar en un tejido conjuntivo. El tejido conjuntivo se puede seleccionar del grupo que consiste en cartílago, tendón, ligamentos, hueso, vasos sanguíneos, discos intervertebrales y menisco.

- 15 En una segunda forma de realización, el proceso de degradación de tejido está implicado en artritis. La artritis se puede seleccionar del grupo que consiste en artritis crónica, tal como por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis/osteoartrosis, artritis psoriásica, artritis crónica juvenil, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis infecciosa y artritis idiopática juvenil, enfermedades que afectan al disco intervertebral de la columna vertebral, tales como, por ejemplo, lumbago, daño en el menisco, daño en el
- 20 tendón y ligamento, enfermedades que afectan arterias principales incluyendo aterosclerosis, vasculitis, traumatismo que produce lesión y gota.

Leyenda de las figuras

- 25 La figura 1 muestra una inmunotransferencia usando el anticuerpo contra el neoepítomo PFRAVAE de muestra normal, AR y OA. El fragmento caracterizado (18 kDa) es la banda superior encontrada en todas las muestras. Sin embargo, la banda inferior en la muestra AR es específica para este tipo de muestra y se puede usar como un marcador para AR. El epítomo del otro extremo en este caso debe estar localizado antes del C-terminal absoluto. El anticuerpo C-terminal no reconoció este fragmento, pero el de 18 kD se
- 30 encontró aquí.

La figura 2 muestra los péptidos identificados en la digestión con tripsina de fragmentos de COMP de 18 y 26 kD (los residuos se numeran desde el inicio del fragmento).

- 35 La figura 3 muestra diferentes transferencias para demostrar la presencia de esos fragmentos de COMP en extractos de tejido que se usaron para la identificación de neoepítomos por espectrometría de masas: a) transferencia anti-COMP C-term (gel no reducido); b) transferencia anti-COMP C-term (gel reducido); c) gel con azul brillante G-250 (red.; alquilado, +PNGasa).

40 Ejemplos

Ejemplo 1 Identificación de neoepítomos en COMP humana

- 45 Extracción con guanidina-HCl de disco intervertebral humano (anillo fibroso y núcleo pulposo): Se cortaron 20 g de tejido en trozos pequeños de aproximadamente 1 g. Cada pieza de anillo fibroso y núcleo pulposo se homogenizó a 4°C con un homogenizador politrón durante 3 x 30 s en 20 mL de tampón de extracción de PBS a pH 7,4. Las proteínas se extrajeron durante 24 h a 4°C. Se hicieron pasos
- 50 adicionales de extracción con PBS pH 7,4 que contenía EDTA 100 mM y por último con cloruro de guanidinio (GuHCl) 4 M en acetato de sodio (NaOAc) 50 mM pH 5,8. Se añadió un coctel con inhibidores estándar de proteasas en todas las extracciones. Después de cada paso de extracción las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 14000 g y se recogió el sobrenadante, es decir, se obtuvieron 6 sobrenadantes. El sobrenadante de la primera extracción con PBS de anillo fibrosos contenía tanto COMP intacta como fragmentos de COMP y esta muestra se usó para la caracterización adicional.

- 55 Aislamiento de COMP intacta y fragmentada: Los sobrenadantes de las extracciones con PBS se cargaron en una columna de heparina HiTrap (Pharmacia, 1 mL) y se recogió el flujo no unido que contenía COMP y sus fragmentos. El flujo no unido se purificó adicionalmente en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q (Pharmacia, 5 mL) con un gradiente de NaCl de 0,07 a 0,4 M (en Tris-HCl 50 mM pH 7,4) a una velocidad de flujo de aproximadamente 0,5 mL/min. COMP y sus fragmentos se
- 60 eluyeron en la fracción 36-42 (\approx NaCl 0,29 M), que se juntaron y diluyeron 1:3 con Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La muestra juntada se purificó de forma similar en una columna de intercambio aniónico HiTrap Q usando un sistema de HPLC (Pharmacia, SMART) y un gradiente de sal de NaCl de 0,07 a 0,4 M en 60 minutos. COMP intacta eluyó en las fracciones 63-70 mientras que los fragmentos de COMP eluyeron en las
- 65 fracciones 55-62. Las fracciones individuales 57-59, 65 y 70 se sometieron después a una columna de filtración en gel SuperDex 200 usando un tampón de carrera de GuHCl 4 M en NaOAc 50 mM pH 5,8. Las

fracciones que contenían COMP (33-36) y fragmentos de COMP (43-47) se juntaron por separado y se corrieron en el sistema SMART usando cromatografía de fase reversa con una columna SC-C2/C18 de Pharmacia (2,1 x 100 mm). Se corrió un gradiente de acetonitrilo del 0-100% en TFA al 0,1% en 60 minutos. Se usaron SDS-PAGE (Lemli, 1970) e inmunotransferencia (anticuerpos contra COMP humana C-terminal) como herramienta para seguir COMP durante los pasos de purificación.

Preparación de muestras para espectrometría de masas:

Las muestras se trataron con N-glicosidasa F (Boehringer-Mannheim) para eliminar las N-glicosilaciones. La digestión con N-glicosidasa F se realizó en bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,0 a 37°C durante 12-16 horas. Las muestras se aplicaron a geles en gradiente SDS-PAGE del 4-16%. Los geles se fijaron en metanol al 40% v/v, ácido acético al 7% v/v durante una hora y se tiñeron con azul brillante de Coomassie G-250 (Serva) o nitrato de plata (Shevchenko et al., Anal Chem 1 marzo 1996; 68(5): 850-8). Después de destañar con agua destilada, se cortaron las bandas fuertemente teñidas y se lavaron con 400 µl de agua durante una hora. Los trozos de gel se destañaron después con cuatro lavados de 300 µl con acetonitrilo al 40% v/v en NH₄HCO₃ 25 mM durante 15 minutos hasta que estuvieron visiblemente incoloras. Después se secaron en un concentrador Speed vac. Las muestras se rehidrataron en 40 µl de ditiotreitol 10 mM en NH₄HCO₃ 25 mM. La reducción de las proteínas se llevó a cabo a 56°C durante 30 minutos. La solución superflua se eliminó y las proteínas se alquilaron con 40 µl de yodoacetamida 50 mM en NH₄HCO₃ 25 mM y se incubaron en oscuridad completa a temperatura ambiente. Los trozos de gel se lavaron después tres veces con acetonitrilo al 40% v/v en NH₄HCO₃ 25 mM y se evaporaron a sequedad completa.

Identificación de fragmentos de COMP por espectrometría de masas: Las proteínas se degradaron en fragmentos característicos con tripsina (grado de secuenciación, Promega), endoproteínasa Glu-C o endoproteínasa Lys-C (Boehringer-Mannheim). Brevemente, los trozos de gel se rehidrataron en 12 µl de soluciones de las respectivas enzimas 20-25 µg/ml en NH₄HCO₃ 25 mM. Después de la rehidratación, se añadieron 23 µl del mismo tampón y las muestras se incubaron a 37°C durante 16-24 horas. Para la digestión con Glu-C se usó PBS en lugar de NH₄HCO₃. Los trozos de gel se extrajeron después con ácido trifluoroacético al 2% v/v en agua. Las soluciones que contenían péptidos se purificaron en Ziptips C18 (Millipore) con eluciones posteriores al 20, 50 y 70 por ciento de ácido trifluoroacético hecho en ácido α-ciano-4-hidroxicinámico saturado (Sigma). Se echaron alícuotas de un microlitro de solución de elución/matriz directamente en una placa objetivo de MALDI y se dejaron secar al aire. La placa objetivo de MALDI se cargó en un espectrómetro de masas Bruker Reflex™ III. La polaridad del instrumento se ajustó para iones positivos usando extracción retrasada y con el detector en modo reflector. La diferencia de potencial de aceleración se ajustó a 26 kV y se sumaron 120 disparos por mancha de muestra en cada espectro. Los productos de autólisis de las proteasas se usaron como masas de referencia. Los espectros se analizaron para coincidencias usando la máquina de búsqueda ProFound (Universidad Rockefeller) (Zhang et al., 2000).

Resultado:

Identificación y caracterización de fragmentos de COMP: Para determinar la identidad de las bandas que migran más rápido reactivas con el anticuerpo anti-COMP c-terminal, que migran a 18 y 26 kDa (véase la figura 3), se usó digestión en gel seguida por espectrometría de masas. La cobertura de la secuencia de péptidos de las bandas las identificó como fragmentos C-terminales de COMP humana. Para mapear e identificar el nuevo N-terminal formado en estos fragmentos se usaron varias proteasas diferentes. Los péptidos identificados en las bandas de 18 kD y 26 kD se muestran en la figura 3.

Cuando se compara el fragmento digerido con tripsina con la cobertura de la secuencia de COMP humana intacta que se corrió en paralelo como control, el péptido "QMETYWQANPFRAVAEPIQLK" residuos 617-638 solo se encontró en la muestra de COMP intacta. El resultado indicó que el nuevo epítipo está localizado en esta secuencia. Cuando se buscaron los péptidos no coincidentes según esta secuencia aparece una coincidencia de masa que muestra que el nuevo N-terminal es "PFRAVAEPIQLK" aa 626-638. La masa experimental no coincidente era 1425,5 Da y se realizó espectrometría de masas en tándem usando fragmentación de descomposición post-fuente (PSD) para este péptido que apoya esta secuencia. Además, se encontró el péptido correspondiente también en la muestra digerida con Glu-C (PFRAVAE) y Lys-C (PFRAVAEPIQLK). El fragmento de 18 kD también se sometió a secuenciación N-terminal convencional (Bo Ek, SLU) y los resultados también apoyan la secuencia sugerida 9 de 12 residuos coincidieron con la primera o segunda elección de sugerencia. Dos residuos no dieron resultados.

La banda de 26 kD mostró de forma similar un nuevo extremo C en los aa 550-551 (N/W) ya que el digerido tríptico del fragmento produjo la identificación del péptido no tríptico 551-558 (N)/WVVLNQGGR se identificó. Además, el péptido correspondiente 551-559 WVVLNQGREG se encontró en el digerido de Glu-C del fragmento.

Ejemplo 2**Producción y caracterización de anticuerpo neoepítipo**

Método:

- 5 Producción de anticuerpo neoepítipo: Se usó la nueva secuencia de aminoácidos N-terminal PFRAVAE para sintetizar un péptido al que se añadió una cisteína C-terminal para fines de acoplamiento. Este péptido se acopló a BSA., KLH y tiopropil-Sepharosa, respectivamente (Schafer-N, Copenhagen, Dinamarca).
- 10 Se disolvieron quinientos microgramos de conjugado de KLH en 500 µl de PBS y después se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Se inyectaron conejos blancos Nueva Zelanda con una dosis de 500 µg seguido por una inyección de recuerdo cuatro semanas después. Las inyecciones de recuerdo se prepararon de la misma manera aunque con adyuvante incompleto. Se cogieron sangrados de prueba de dos a tres semanas después de la primera inmunización.
- 15 Purificación por afinidad de antisuero NeoCOMP: Se preparó una columna de seiscientos microlitros (volumen de lecho empaquetado) de NeoCOMP conjugado a tiopropil-sepharosa en una columna de BioRad equipada con una aguja del calibre 22 para ralentizar la velocidad de flujo. La columna se lavó con 4 ml de PBS. Se dejó que goteara a través un mililitro de suero crudo. Se recuperó el flujo no unido y se pasó a través tres veces más. Se usaron cuatro mililitros de PBS que contenía NaCl 1 M para lavar el material ligeramente unido. La columna se lavó después con 4 ml de PBS. Se eluyeron anticuerpos específicos con glicina-HCl 100 mM, pH 2,8 y se neutralizaron fracciones de 250 µl mediante recogida en tubos Eppendorf que contenían 12,5 µl de Tris-HCl 100 mM, pH 9,5.
- 20
- 25 Ensayo de la especificidad de anticuerpo neoepítipo por ELISA:
- Ensayo de la especificidad de anticuerpo neoepítipo por inmunotransferencia: La especificidad para la forma cortada de COMP y la confirmación del neoepítipo se realizó mediante inmunotransferencia.
- 30 Resultados:
- Se encontró que un anticuerpo neoepítipo generado hacia el péptido sintético era reactivo solo con la forma cortada de COMP. Sin embargo, inmunotransferencias de muestras de OA y AR produjeron varios fragmentos detectados en OA frente a AR. No se detectó COMP intacta con el anticuerpo.
- 35 OA – 60 kD
AR – 14 kD
- Se encontró un fragmento mayor en OA, AR y normal.

40 Lista de secuencias

- <100> AnaMar Medical AB
- <120> Método para determinar un proceso de degradación tisular mediante detección de neoepítipos de COMP
- 45 <130> P11314 PC/P10859
- <160> 41
- 50 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 737
- 55 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gln Gly Gln Ser Pro Leu Gly Ser Asp Leu Gly Pro Gln Met Leu Arg
 21 25 30 35
 Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu
 40 45 50
 Arg Gln Gln Val Arg Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu
 55 60 65
 Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln Gln Ser Val Arg Thr Gly Leu Pro Ser
 70 75 80
 Val Arg Pro Leu Leu His Cys Ala Pro Gly Phe Cys Phe Pro Gly Val
 85 90 95 100
 Ala Cys Ile Gln Thr Glu Ser Gly Ala Arg Cys Gly Pro Cys Pro Ala
 105 110 115
 Gly Phe Thr Gly Asn Gly Ser His Cys Thr Asp Val Asn Glu Cys Asn
 120 125 130
 Ala His Pro Cys Phe Pro Arg Val Arg Cys Ile Asn Thr Ser Pro Gly
 135 140 145
 Phe Arg Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Tyr Ser Gly Pro Thr His Gln
 150 155 160
 Gly Val Gly Leu Ala Phe Ala Lys Ala Asn Lys Gln Val Cys Thr Asp
 165 170 175 180
 Ile Asn Glu Cys Glu Thr Gly Gln His Asn Cys Val Pro Asn Ser Val
 185 190 195
 Cys Ile Asn Thr Arg Gly Ser Phe Gln Cys Gly Pro Cys Gln Pro Gly
 200 205 210
 Phe Val Gly Asp Gln Ala Ser Gly Cys Gln Arg Arg Ala Gln Arg Phe
 215 220 225
 Cys Pro Asp Gly Ser Pro Ser Glu Cys His Glu His Ala Asp Cys Val
 230 235 240
 Leu Glu Arg Asp Gly Ser Arg Ser Cys Val Cys Ala Val Gly Trp Ala
 245 250 255 260

Gly Asn Gly Ile Leu Cys Gly Arg Asp Thr Asp Leu Asp Gly Phe Pro
 265 270 275
 Asp Glu Lys Leu Arg Cys Pro Glu Arg Gln Cys Arg Lys Asp Asn Cys
 280 285 290
 Val Thr Val Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Val Asp Arg Asp Gly Ile
 295 300 305
 Gly Asp Ala Cys Asp Pro Asp Ala Asp Gly Asp Gly Val Pro Asn Glu
 310 315 320
 Lys Asp Asn Cys Pro Leu Val Arg Asn Pro Asp Gln Arg Asn Thr Asp
 325 330 335 340
 Glu Asp Lys Trp Gly Asp Ala Cys Asp Asn Cys Arg Ser Gln Lys Asn
 345 350 355
 Asp Asp Gln Lys Asp Thr Asp Gln Asp Gly Arg Gly Asp Ala Cys Asp
 360 365 370
 Asp Asp Ile Asp Gly Asp Arg Ile Arg Asn Gln Ala Asp Asn Cys Pro
 375 380 385
 Arg Val Pro Asn Ser Asp Gln Lys Asp Ser Asp Gly Asp Gly Ile Gly
 390 395 400
 Asp Ala Cys Asp Asn Cys Pro Gln Lys Ser Asn Pro Asp Gln Ala Asp
 405 410 415 420
 Val Asp His Asp Phe Val Gly Asp Ala Cys Asp Ser Asp Gln Asp Gln
 425 430 435
 Asp Gly Asp Gly His Gln Asp Ser Arg Asp Asn Cys Pro Thr Val Pro
 440 445 450
 Asn Ser Ala Gln Glu Asp Ser Asp His Asp Gly Gln Gly Asp Ala Cys
 455 460 465
 Asp Asp Asp Asp Asp Asn Asp Gly Val Pro Asp Ser Arg Asp Asn Cys
 470 475 480
 Arg Leu Val Pro Asn Pro Gly Gln Glu Asp Ala Asp Arg Asp Gly Val
 485 490 495 500
 Gly Asp Val Cys Gln Asp Asp Phe Asp Ala Asp Lys Val Val Asp Lys
 505 510 515
 Ile Asp Val Cys Pro Glu Asn Ala Glu Val Thr Leu Thr Asp Phe Arg
 520 525 530

Ala Phe Gln Thr Val Val Leu Asp Pro Glu Gly Asp Ala Gln Ile Asp
 535 540 545

Pro Asn Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg Glu Ile Val Gln Thr Met
 550 555 560

Asn Ser Asp Pro Gly Leu Ala Val Gly Tyr Thr Ala Phe Asn Gly Val
 565 570 575 580

Asp Phe Glu Gly Thr Phe His Val Asn Thr Val Thr Asp Asp Asp Tyr
 585 590 595

Ala Gly Phe Ile Phe Gly Tyr Gln Asp Ser Ser Ser Phe Tyr Val Val
 600 605 610

Met Trp Lys Gln Met Glu Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn Pro Phe Arg
 615 620 625

Ala Val Ala Glu Pro Gly Ile Gln Leu Lys Ala Val Lys Ser Ser Thr
 630 635 640

Gly Pro Gly Glu Gln Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr Gly Asp Thr
 645 650 655 660

Glu Ser Gln Val Arg Leu Leu Trp Lys Asp Pro Arg Asn Val Gly Trp
 665 670 675

Lys Asp Lys Lys Ser Tyr Arg Trp Phe Leu Gln His Arg Pro Gln Val
 680 685 690

Gly Tyr Ile Arg Val Arg Phe Tyr Gln Gly Pro Glu Leu Val Ala Asp
 695 700 705

Ser Asn Val Val Leu Asp Thr Thr Met Arg Gly Gly Arg Leu Gly Val
 710 715 720

Phe Cys Phe Ser Gln Glu Asn Ile Ile Trp Ala Asn Leu Arg Tyr Arg
 725 730 735 740

Cys Asn Asp Thr Ile Pro Glu Asp Tyr Glu Thr His Gln Leu Arg Gln
 745 750 755

Ala

5 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 10 Leu Asp Pro Glu Gly Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
 1 5 10

<210> 3

- <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 5 <400> 3
Asp Pro Glu Gly Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5 10
- <210> 4
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 4
pro Glu Gly Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5 10
- 15 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 20 <400> 5
Glu Gly Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5
- 25 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 30 <400> 6
Gly Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5
- 35 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 7
Asp Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5
- 40 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 45 <400> 8
Ala Gln Ile Asp Pro Asn
1 5
- 50 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 9
Gln Ile Asp Pro Asn
1 5
- 55 <210> 10

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 10
Ile Asp Pro Asn
1
 <210> 11
 <211> 3
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
Asp Pro Asn
1
 15 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 12
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg Glu Ile Val Gln
1 5 10
 <210> 13
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg Glu Ile Val
 30 **1 5 10**
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 14
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg Glu Ile
1 5 10
 40 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 15
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg Glu
1 5
 <210> 16
 <211> 8
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly Arg
1 5
 55 <210> 17

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

5 <400> 17
Trp Val Val Leu Asn Gln Gly
1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 18
Trp Val Val Leu Asn Gln
1 5

15 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 19
Trp Val Val Leu Asn
1 5

<210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 20
Trp Val Val Leu
1

30 <210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 21
Trp Val Val
1

40 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 22
Trp Lys Gln Met Glu Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 23
Lys Gln Met Glu Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
1 5 10

55 <210> 24
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 24
Gln Met Gln Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5 10
 5

 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 25
Met Gln Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5
 15

 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 26
Gln Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5

 <210> 27
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 27
Gln Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5
 30

 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35

 <400> 28
Thr Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5
 40

 <210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 29
Tyr Trp Gln Ala Asn
 1 5
 45

 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 30
Trp Gln Ala Asn
 1
 55

 <210> 31
 <211> 3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
Gln Ala Asn
 1
 5

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 32
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu Pro Gly Ile Gln Leu
 1 5 10

15 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 33
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu Pro Gly Ile Gln
 1 5 10

25 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 34
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu Pro Gly Ile
 1 5 10

35 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 35
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu Pro Gly
 1 5

45 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu Pro
 1 5

50 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
Pro Phe Arg Ala Val Ala Glu
 1 5

55 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38
Pro Phe Arg Ala Val Ala
1 5

5

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 39
Pro Phe Arg Ala Val
1 5

15

<210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 40
Pro Phe Arg Ala
1

25

<210> 41
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 41
Pro Phe Arg
1

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un proceso de degradación de tejido que comprende detectar en una muestra la presencia de uno o más neoepítomos de COMP de mamífero que aparecen después del corte de COMP entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO: 1).
5
2. Un fragmento truncado en C-terminal aislado de COMP humana en donde el extremo C-terminal del fragmento es el aminoácido 625 de SEQ ID NO: 1, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de SEQ ID NO: 22-31.
10
3. Un fragmento truncado en N-terminal aislado de COMP humana en donde el extremo N-terminal del fragmento es el aminoácido 626 de SEQ ID NO: 1, y en donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de SEQ ID NO: 32-40.
15
4. Un fragmento aislado de COMP humana que consiste en la secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de SEQ ID NO: 22-40.
5. Uso de un fragmento de COMP como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para la producción de anticuerpos contra uno o más neoepítomos de COMP que aparecen después del corte de COMP entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO: 1).
20
6. Un conjugado para su uso en la producción de anticuerpos contra uno o más neoepítomos de COMP que aparecen después del corte de COMP entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO: 1), que consiste en (i) uno o más fragmentos como se definen en la reivindicación 4 acoplados a o mezclados con una proteína transportadora, o (ii) uno o más fragmentos como se definen en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, acoplados a través del extremo que no representa el sitio de corte a una proteína transportadora.
25
7. Un anticuerpo contra un fragmento aislado de COMP como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o un conjugado como se reivindica en la reivindicación 6 en donde el anticuerpo se une a uno o más neoepítomos de COMP que aparecen después del corte de COMP entre la posición 625 (N⁶²⁵) y 626 (P⁶²⁶) de la secuencia de aminoácidos de COMP (SEQ ID NO: 1).
30
8. Un anticuerpo según la reivindicación 7 para su uso en diagnóstico, diagnóstico diferencial, seguimiento de enfermedad y/o seguimiento terapéutico de un proceso de degradación de tejido.
35
9. Un método según la reivindicación 1, en donde la presencia de uno o más neoepítomos de COMP se detecta usando uno o más anticuerpos como se definen en la reivindicación 7 u 8.
40

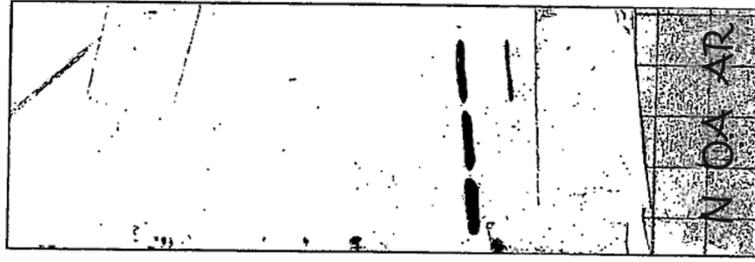


Fig. 1

5

fragmento de 18 kD			
Residuos	masa	fallos	secuencia
[1- 13]	1424.814	1	PFRAVAEPGIQLK
[4- 13]	1024.592	0	AVAEPGIQLK
[17- 26]	1030.504	0	SSTGPGEQLR
[17- 40]	2625.253	1	SSTGPGEQLRNALWHTGDTESQVR
[27- 40]	1612.759	0	NALWHTGDTESQVR
[41- 47]	926.534	1	LLWKDPR
[56- 71]	2105.107	1	SYRWFLQHRPQVGYIR
[59- 71]	1698.911	0	WFLQHRPQVGYIR
fragmento de 26 kD			
Residuos	masa	fallos	secuencia
[66- 78]	1697.762	0	QMEQTYWQANPFR
[66- 78]	1713.757	0	QMEQTYWQANPFR (1 * Oxidación (M))
[79- 88]	1024.592	0	AVAEPGIQLK
[92-101]	1030.504	0	SSTGPGEQLR
[116-122]	926.534	1	LLWKDPR
[120-127]	970.498	1	DPRNVGWK
[149-168]	2271.073	0	FYEGPELVADSNVLDTTMR (1 * Oxidación (M))
[149-168]	2255.078	0	FYEGPELVADSNVLDTTMR
[149-171]	2525.222	1	FYEGPELVADSNVLDTTMRGGR
[149-171]	2541.217	1	FYEGPELVADSNVLDTTMRGGR (1 * Oxidación (M))

Fig. 2

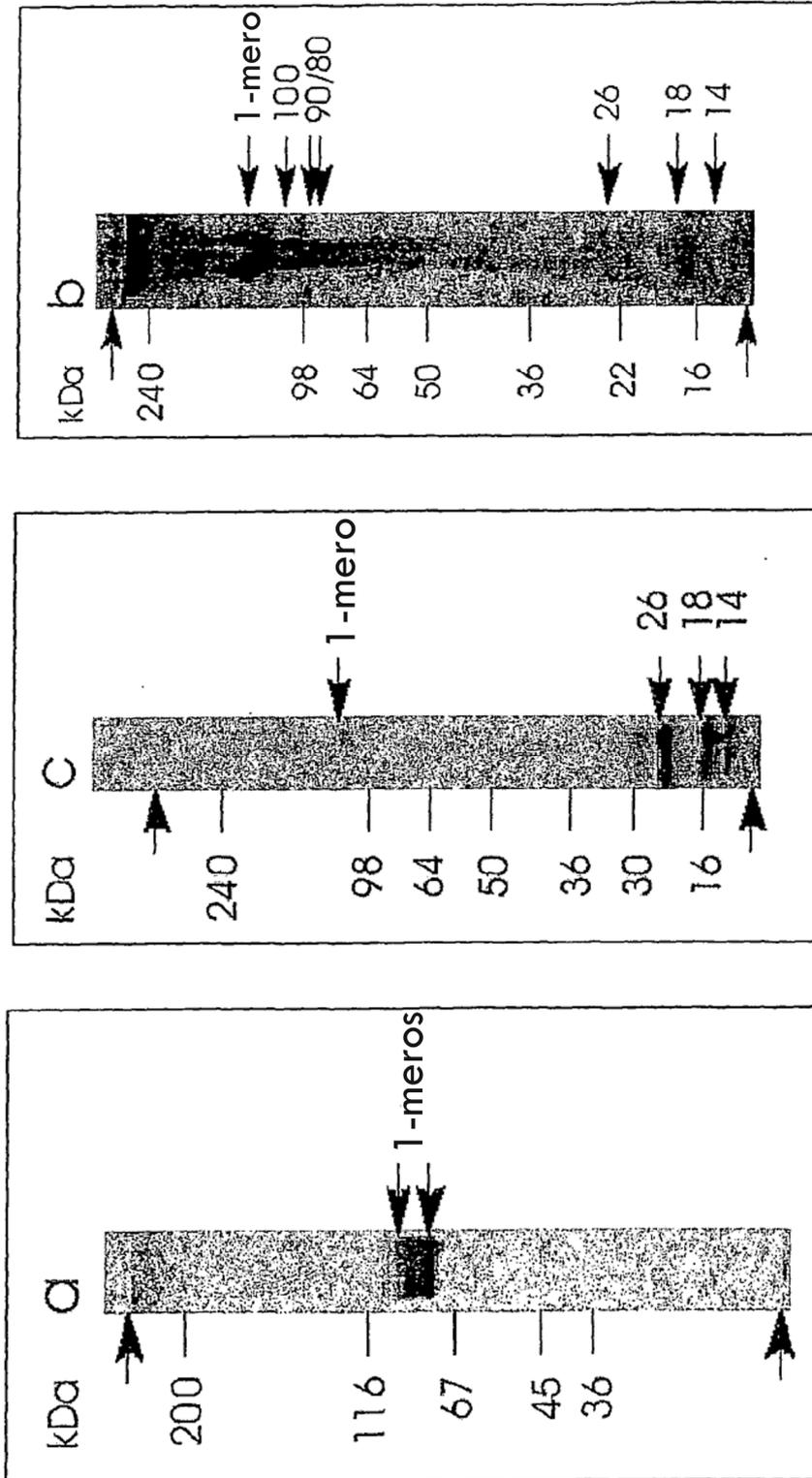


Fig. 3