

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 394**

51 Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 7/50 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08857631 .9**
 96 Fecha de presentación: **03.12.2008**
 97 Número de publicación de la solicitud: **2229402**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2010**

54 Título: **Péptidos sintéticos inmunorreactivos con los autoanticuerpos de la artritis reumatoide**

30 Prioridad:
03.12.2007 CA 2613075
21.10.2008 CA 2641448

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
SQI DIAGNOSTICS SYSTEMS INC. (100.0%)
36 METEOR DRIVE
TORONTO, ON M9W 1A4, CA

72 Inventor/es:
LEA, PETER y
LING, MINGFU

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 390 394 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

Péptidos sintéticos inmunorreactivos con los autoanticuerpos de la artritis reumatoide

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0001] Las realizaciones de la presente invención se refieren a péptidos sintéticos que son reconocidos preferentemente por autoanticuerpos, específicamente por anticuerpos autoinmunitarios, para su detección en pacientes que padecen o presentan riesgo de padecer artritis reumatoide, lo que permite una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de estos autoanticuerpos en pacientes presintomáticos así como en pacientes que muestran síntomas de artritis reumatoide. El documento WO-A-9822503 muestra péptidos citrulinados para la misma finalidad, pero de diferente estructura. Los péptidos de la presente invención tienen secuencias únicas que no se encuentran en la naturaleza y que comprenden una serie de restos de citrulina en posiciones seleccionadas a lo largo de los péptidos y tienen además un número óptimo de restos entre los restos de citrulina. El ensamblaje y la secuencia de restos aminoacídicos seleccionados confieren una carga y una hidrofobicidad óptimas para aumentar la reactividad con los anticuerpos autoinmunitarios. Además, los péptidos respectivos pueden estar ciclados. Adicionalmente, tales péptidos sintéticos ciclados pueden multimerizarse en serie como monómeros, dímeros, trímeros y multímeros. Sorprendentemente, la combinación del espaciamiento de restos de citrulina en secuencias peptídicas sintéticas diseñadas, miméticas de antígenos, con mezclas de multímeros de acuerdo con las realizaciones de la invención ha demostrado ser muy adecuada para la mejora del diagnóstico de la artritis reumatoide. Preferentemente, estos péptidos sintéticos tienen las fórmulas siguientes: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33. En otras realizaciones, los péptidos pueden estar ciclados.

[0002] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para la detección de anticuerpos autoinmunitarios expresados por pacientes que presentan riesgo de padecer o padecen artritis reumatoide, en que la composición comprende al menos un péptido que consta de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33 y combinaciones de estas. En otras realizaciones, los péptidos de la composición pueden estar ciclados. En otras realizaciones, los péptidos pueden estar ciclados en serie como monómeros, dímeros, trímeros y multímeros.

[0003] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende al menos dos péptidos que constan de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33, en que al menos dos de dichos, al menos dos péptidos están ciclados. En otras realizaciones, los péptidos pueden estar ciclados en serie como monómeros, dímeros, trímeros y multímeros.

[0004] De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un procedimiento para la detección de anticuerpos autoinmunitarios expresados por pacientes que presentan riesgo de padecer o padecen artritis reumatoide, que comprende las etapas de la puesta en contacto de un péptido sintético de la presente invención con una muestra de plasma o suero de un paciente y la detección de la presencia o ausencia de un complejo antígeno-anticuerpo, en que la presencia del complejo antígeno-anticuerpo indica la presencia de anticuerpos autoinmunitarios y en que la presencia de anticuerpos autoinmunitarios indica que dicho paciente presenta riesgo de padecer o padece artritis reumatoide.

[0005] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de la artritis reumatoide en formato de micromatriz que comprende las etapas de: preparación de una secuencia peptídica sintética de la presente invención; suministro de una muestra biológica para el diagnóstico de la artritis reumatoide; puesta en contacto de dicha muestra biológica con dicho antígeno artificial en condiciones que permitan la formación de un complejo antígeno-anticuerpo con los autoanticuerpos específicos de la artritis reumatoide que puedan estar presentes en dicha muestra biológica; y detección de cualquier complejo antígeno-anticuerpo que pueda formarse.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0006]

5 La figura 1 es una representación de nueve secuencias peptídicas ejemplares de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que ilustra una serie de restos conjugados para mostrar el número y las posiciones específicas de las citrulinas en las secuencias y el espaciamiento ejemplar entre los restos de citrulina.

10 La figura 2 es un diagrama de barras que muestra la intensidad de la señal para la presencia de un complejo péptido sintético-autoanticuerpo para seis de los péptidos sintéticos ejemplares de la presente invención en muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide y sin artritis reumatoide.

15 La figura 3 es un diagrama que muestra que la intensidad de la señal es directamente proporcional a la presencia del complejo péptido sintético-anticuerpo según se detecta en una serie de diluciones de un antígeno múltiple.

La figura 4 es un diagrama de barras que muestra una comparación de la intensidad de la señal que demuestra la presencia del complejo péptido sintético-anticuerpo en muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide y sin artritis reumatoide.

20 La figura 5 es una tabla que representa péptidos ejemplares de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0007] La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria sistémica y está considerada como el más frecuente de los reumatismos inflamatorios crónicos. El suero de los pacientes afectados contiene autoanticuerpos, parte de los cuales son específicos y constituyen un marcador de la enfermedad, lo que permite su diagnóstico incluso en etapas tempranas. Se ha publicado una amplia gama de procedimientos, en una búsqueda para encontrar e identificar antígenos reconocidos por estos anticuerpos y preparaciones de antígenos purificadas que puedan usarse en técnicas de diagnóstico inmunológico convencionales.

[0008] Las interacciones proteínicas analito-anticuerpo desempeñan un papel esencial en el control de los sucesos moleculares implicados en la transducción de señales. Los perfiles superficiales comparativamente extensos en estas superficies de contacto proteína-proteína impiden espacialmente el diseño y la accesibilidad de los sitios interactivos en moléculas pequeñas. Los restos energéticos que modulan activamente las superficies de contacto proteína-proteína usan regiones relativamente pequeñas de la superficie proteínica. Las moléculas miméticas de epítopos de proteínas (PEM) correctamente seleccionadas que imitan epítopos superficiales proporcionan un medio de imitar la actividad biológica de una proteína completa en sitios moleculares sintéticos relativamente pequeños y espacialmente adaptados de reconocimiento macromolecular tridimensional. El diseño de péptidos miméticos comienza con estructuras tridimensionales de péptidos y los complejos miméticos conjugados que forman, aplicando la información sobre el tipo y la posición de estructuras matriciales de restos. Esto representa un área de la química orgánica en la que la conformación matricial y los mecanismos de unión confirman el diseño y la síntesis de matrices moleculares orgánicas biológicamente activas.

[0009] Por lo tanto, existe la necesidad de péptidos sintéticos que se unan con gran sensibilidad a autoanticuerpos, específicamente a anticuerpos autoinmunitarios, para su detección en pacientes que padecen artritis reumatoide, lo que permitirá una mayor sensibilidad y especificidad en la detección de estos autoanticuerpos en pacientes presintomáticos, así como en pacientes que muestran síntomas de artritis reumatoide. Existe la necesidad de un péptido tal que sea reconocido por anticuerpos autoinmunitarios específicos de la artritis reumatoide. Además, existe la necesidad de la detección de los autoanticuerpos de la artritis reumatoide dirigidos contra proteínas citrulinadas mediante péptidos múltiples de nuevo diseño para proporcionar una mayor sensibilidad y especificidad para una medida relativa cuantitativa más precisa de la concentración de los autoanticuerpos.

[0010] Las realizaciones de la presente invención implican la síntesis de epítopos miméticos en péptidos sintéticos. Es posible ensamblar determinantes antigénicos potentes y selectos para obtener matrices peptídicas que contengan estos determinantes; la sensibilidad y la especificidad de secuencias de aminoácidos contiguos en una disposición lineal (epítipo continuo) y de aminoácidos muy próximos en la proteína plegada, pero distantes cuando no está plegada (epítipo discontinuo) forman matrices peptídicas diseñadas para imitar los epítopos inmunodominantes del antígeno. En algunas realizaciones, el epítipo puede ser una región localizada en la superficie de un antígeno que puede provocar una respuesta inmunitaria.

[0011] Los péptidos sintéticos de la presente invención tienen secuencias únicas que contienen una serie de restos de citrulina en posiciones seleccionadas a lo largo de los péptidos y pueden tener también un número óptimo de restos entre los restos de citrulina. Sorprendentemente, el ensamblaje y la secuencia de restos aminoácidos seleccionados confieren una carga y una hidrofobicidad óptimas para aumentar la reactividad con los anticuerpos autoinmunitarios. En otras realizaciones, los péptidos respectivos pueden estar ciclados en serie como monómeros,

dímeros, trímeros y multímeros. En ciertas realizaciones, un múltiplo de las secuencias peptídicas diseñadas puede ser adecuado para el diagnóstico de la artritis reumatoide.

5 **[0012]** Los procedimientos para la ciclación de péptidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales procedimientos se describen en Cline D. J., Thorpe C., Schneider, J. P., General method for facile intramolecular disulfide formation in synthetic peptides, *Analytical Biochemistry* 335:168 – 170 (2004), que se incorpora en el presente documento por referencia.

10 **[0013]** Los procedimientos para la creación de dímeros y multímeros también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales procedimientos se describen en Marini M. A., Moore G. L., Christensen S. M., Fishman R. M., Jessee R. G., Medina F., Snell S. M., Zegna A. I., Reexamination of the polymerization of pyridoxylated hemoglobin with glutaraldehyde, *Biopolymers* 29: 871 – 882 (1990), que se incorpora en el presente documento por referencia.

15 **[0014]** En las realizaciones de la presente invención, los péptidos sintéticos tiene las fórmulas de SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:33.

20 **[0015]** La figura 1 muestra nueve péptidos ejemplares de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Todos los péptidos están numerados y tienen restos de citrulina indicados por la letra X. La serie de restos conjugados muestra las repeticiones de X en posiciones específicas en las secuencias y la distancia que separa los restos X entre sí. Los péptidos de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:8, respectivamente, con un espaciamento X-X respectivo de 3, 0, 1 – 1 y 2 intervalos aminoácidos, al usarlos en la mezcla de múltiples péptidos en una proporción de formatos de aproximadamente 1:1, dieron lugar a una intensa señal de autoanticuerpos.

25 **[0016]** En otras realizaciones, los péptidos pueden comprender además restos opcionales, por ejemplo, aquellos con puentes disulfuro intrínsecos que permiten la ciclación de dichos péptidos o su enlace intermolecular para maximizar la estabilidad química y estructural. La ciclación tiene la ventaja adicional de proporcionar una perspectiva espacial a los péptidos.

30 **[0017]** Otra realización de la presente invención es una composición para proporcionar una unión antigénica óptima de los autoanticuerpos de la artritis reumatoide que comprende los péptidos de SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:23 en una mezcla de aproximadamente 1:1.

35 **[0018]** El diseño de estos péptidos sintéticos miméticos de antígenos asegura la colocación de restos flexibles, como glicina, serina o treonina, en proximidad de los restos de citrulina y también la presencia de restos de menor tamaño para permitir la flexibilidad del péptido. Tales restos incluyen glicina y serina, que se usan normalmente como enlazantes entre dominios de proteínas, incluidos anticuerpos de cadena sencilla. Estos péptidos deberían incluir restos solubles, como arginina, glutamina y leucina, para mantener una carga equilibrada y un pH relativamente no neutro. Sorprendentemente, cuando la realización de péptidos sintéticos múltiples miméticos de antígenos de la presente invención se usa en un formato de ensayo de micromatrices, la ciclación de los péptidos también mejora la estabilidad de la captura del antígeno y su capacidad para ser inmovilizado en el sustrato del ensayo.

45 **[0019]** Otras realizaciones más de la presente invención son composiciones de los péptidos sintéticos como monómeros, dímeros, trímeros y multímeros. Tales composiciones pueden proporcionar un efecto beneficioso al aumentar la eficacia de la detección. Por ejemplo, un péptido sintético puede tener la composición siguiente como monómero, en que los aminoácidos se muestran por los códigos de una letra: CKDNSDXSTYXWTRCK. Un ejemplo de dímero es el siguiente: CKDNSDXSTYXWTRCK+ CKDNSDXSTYXWTRCK. Un ejemplo de trímero es el siguiente: CKDNSDXSTYXWTRCK+ CKDNSDXSTYXWTRCK+ CKDNSDXSTYXWTRCK. Un ejemplo de multímero es el siguiente: [CKDNSDXSTYXWTRCK]_n.

55 **[0020]** En otra realización más, los péptidos de la presente invención pueden incluirse en una composición que se pone en contacto con una muestra líquida de un paciente en el que se ha de examinar la existencia de artritis reumatoide o la predisposición a la misma. La composición puede incluir uno o más de los péptidos sintéticos de SEQ ID NO:1 a SEQ ID NBO:33. Por ejemplo, la composición incluye los péptidos que constan de las secuencias aminoácidas SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30, en una relación ponderal de aproximadamente 1:1:3:3:3.

60 **[0021]** En general, las secuencias peptídicas sintéticas de la presente invención pueden mezclarse en una composición en una relación ponderal de aproximadamente 1 a 3; preferentemente en una relación ponderal de aproximadamente 1 a 1.

65 **[0022]** En ciertas realizaciones, las secuencias peptídicas pueden mezclarse en composiciones en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 1 µg/ml, preferentemente en una concentración de aproximadamente 3 mg/ml.

[0023] Una vez que la muestra de plasma o de suero de un paciente se ha puesto en contacto con la mezcla que comprende los péptidos sintéticos de la presente invención, el complejo anticuerpo-péptido resultante puede detectarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el complejo puede marcarse por fluorescencia y puede medirse la intensidad de la fluorescencia. El nivel de fluorescencia será directamente proporcional al nivel de unión de los péptidos sintéticos a los anticuerpos autoinmunitarios expresados a consecuencia de la artritis reumatoide.

[0024] Las realizaciones de la presente invención pueden explicarse y ejemplificarse más detalladamente por medio del ejemplo siguiente.

Material y procedimientos

[0025] Los péptidos se ciclaron por oxidación de los restos de cisteína de dichos péptidos para formar puentes disulfuro intramoleculares. Después de la ciclación, los péptidos se conjugaron mediante multimerización facilitada por glutaraldehído durante 12 – 20 horas. El exceso de glutaraldehído se eliminó por reacción con borohidruro de sodio. Después, los péptidos conjugados se purificaron mediante una columna de filtración por centrifugación basada en una membrana. Los péptidos resultantes se cuantificaron por espectrofotometría.

[0026] Los péptidos conjugados se añadieron individualmente o mezclados entre sí a tampones de impresión de micromatrices. Las disoluciones resultantes se imprimieron mediante una impresora de micromatrices sin contacto. Las micromatrices resultantes se acondicionaron para optimizar los péptidos impresos y se bloquearon. A continuación, la micromatriz impresa se examinó en cuanto a la reactividad de los péptidos sintéticos miméticos de antígenos, específicamente, de su capacidad para capturar anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas mediante un ensayo de micromatrices.

[0027] En este ensayo, las muestras de suero que contenían niveles nulos, bajos, medios y altos de anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas se cargaron sobre la micromatriz en 96 pocillos de reacción por cada placa micromatriz en formato de microtitulación. Después de 30 minutos de incubación, se eliminó la cantidad de la muestra de suero en exceso y la micromatriz se lavó en un aparato lavador de placas. A continuación, se añadió una mezcla de anticuerpos marcados dirigidos contra IgA, IgG e IgM humanas y la incubación se dejó continuar durante 30 minutos. Después de otra etapa de lavado de la placa, los pocillos de la micromatriz se secaron y se midió la fluorescencia en un lector de micromatrices.

[0028] En algunos ensayos, además de los péptidos citrulinados, también se imprimieron en cada pocillo reactivos para el factor reumatoide, con el fin de detectar simultáneamente IgA dirigidas contra el factor reumatoide, IgG dirigidas contra el factor reumatoide e IgM dirigidas contra el factor reumatoide y anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas. Para todos los ensayos, se usó un software de análisis de datos propio para integrar la intensidad de las señales y, opcionalmente, para estandarizar las señales en valores de concentración.

Resultados

Péptidos individuales examinados

[0029] Se prepararon seis péptidos sintéticos, los péptidos 8B, 8, 10B, 10, 11B y 11 [SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30], de acuerdo con el procedimiento anterior y las placas micromatriz resultantes se examinaron con el uso de 24 muestras. Se analizaron las respuestas de cada muestra para cada péptido y se representaron gráficamente. Los resultados fueron valores de intensidad de fluorescencia para cada muestra, representados frente a las identidades de las muestras. La línea gruesa indica un umbral de corte, según se muestra en la figura 2.

Análisis para establecer la respuesta cuantitativa de la mezcla de multímeros

[0030] Una mezcla de dos muestras se diluyó con el factor de dilución indicado y se examinó mediante el ensayo descrito anteriormente. Los resultados fueron valores de intensidad de fluorescencia para cada muestra representados frente a las identidades de las muestras. Se observó un aumento progresivo de la respuesta desde la muestra más diluida hasta la muestra menos diluida, según se observa en la figura 3.

Análisis mediante el uso de un panel de muestras normales y muestras de pacientes con la mezcla de péptidos citrulinados (CCP)

[0031] Se examinaron 12 muestras obtenidas de donantes sanos, cuya normalidad se comprobó mediante un kit ELISA comercial y 12 muestras obtenidas de pacientes con artritis reumatoide conocida y confirmada mediante varios kits ELISA. Los resultados fueron valores de intensidad de fluorescencia para cada muestra representados frente a las identidades de las muestras. La línea gruesa indica el umbral de corte que se usó para distinguir las muestras en los resultados finales del análisis. Las 12 muestras normales dieron un resultado normal y 9 de las 12

muestras resultaron positivas para los anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas, según se muestra en la figura 4.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0032]

< 110 > SQI DIAGNOSTICS SYSTEMS INC.

< 120 > PÉPTIDOS SINTÉTICOS INMUNORREACTIVOS CON LOS AUTOANTICUERPOS DE LA ARTRITIS

10 REUMATOIDE

< 130 > 874 – 121

< 160 > 33

< 170 > PatentIn, versión 3.5

< 210 > 1

15 < 211 > 18

< 212 > Proteína

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > péptido sintético

20 < 220 >

< 221 > Xaa

< 222 > (1) .. (18)

< 223 > Xaa es citrulina

< 400 > 1

25

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr Xaa Cys Gly Xaa Ser Ser Arg Asp
1 5 10 15

Gly Cys

< 210 > 2

< 211 > 15

30 < 212 > Proteína

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > péptido sintético

< 220 >

35 < 221 > Xaa

< 222 > (1) .. (15)

< 223 > Xaa es citrulina

< 400 > 2

40

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr Xaa Gly Arg Arg Asp Gly Cys
1 5 10 15

< 210 > 3

< 211 > 15

< 212 > Proteína

45 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > péptido sintético

< 220 >

< 221 > Xaa

50 < 222 > (1) .. (15)

< 223 > Xaa es citrulina

< 400 > 3

55

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr xaa Ser Ser Arg Asp Gly Cys
1 5 10 15

< 210 > 4

- < 211 > 16
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 5 < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (16)
- < 223 > Xaa es citrulina
- 10 < 400 > 4

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Arg Ser Arg Gly Arg Ser Cys
1 5 10 15

- < 210 > 5
- 15 < 211 > 16
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- 20 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (16)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 5
- 25

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Ser Arg Ser Arg Gly Arg Ser Cys
1 5 10 15

- < 210 > 6
- < 211 > 19
- 30 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- 35 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (19)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 6

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly
1 5 10 15

40 **Arg Ser Cys**

- < 210 > 7
- < 211 > 15
- < 212 > Proteína
- 45 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 50 < 222 > (1) .. (15)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 7

Lys Ser Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Xaa Ser Arg Arg Asp Gly
1 5 10 15

55

ES 2 390 394 T3

- < 210 > 8
- < 211 > 14
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- 5 < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (14)
- 10 < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 8

Cys Arg Asp Gly Ser Xaa His Pro Xaa Arg Ser His Asp Cys
1 5 10

- 15 < 210 > 9
- < 211 > 15
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 20 < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (15)
- < 223 > Xaa es citrulina
- 25 < 400 > 9

Cys ser ser Thr Gly cys xaa Gln Gly Xaa Ser His His Glu Cys
1 5 10 15

- < 210 > 10
- 30 < 211 > 17
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- 35 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (17)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 10

40

Cys Ser His Gln Glu Ser Val Xaa Leu Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ser

- < 210 > 11
- < 211 > 18
- 45 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético
- < 220 >
- 50 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 11

Cys Asp Asn Tyr Trp Ser Phe Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Trp Thr
1 5 10 15

Arg Cys

- < 210 > 12
- < 211 > 18
- 5 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:1
- < 220 >
- 10 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 12

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr Xaa Cys Gly Xaa Ser Ser Arg Asp
1 5 10 15

Gly Cys

- 15 < 210 > 13
- < 211 > 18
- < 212 > Proteína
- 20 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:1
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 25 < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 13

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr xaa Gly xaa Ser Arg Arg Asp Gly
1 5 10 15

Gly Cys

- 30 < 210 > 14
- < 211 > 20
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- 35 < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:1
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (20)
- 40 < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 14

Cys Lys Ser Gly Gly Gly Ser Thr xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Ser Arg
1 5 10 15

Arg Asp Gly Cys
20

- 45 < 210 > 15

- < 211 > 19
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 5 < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (19)
- < 223 > Xaa es citrulina
- 10 < 400 > 15

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly
1 5 10 15

Arg Ser Cys

- < 210 > 16
- 15 < 211 > 19
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
- 20 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (19)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 16
- 25

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly Arg
1 5 10 15

Ser Gly Cys

- < 210 > 17
- < 211 > 20
- 30 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
- < 220 >
- 35 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (20)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 17

Cys Lys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly
1 5 10 15

Arg Ser Gly Cys
20

- < 210 > 18
- < 211 > 21
- < 212 > Proteína
- 45 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 50 < 222 > (1) .. (21)

< 223 > Xaa es citrulina
< 400 > 18

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Ser Arg Ser
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ser Cys
20

5

< 210 > 19
< 211 > 19
< 212 > Proteína
< 213 > Secuencia artificial

10

< 220 >
< 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
< 220 >
< 221 > Xaa

< 222 > (1) .. (19)

15

< 223 > Xaa es citrulina
< 400 > 19

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Xaa Ser Arg Ser Arg Gly Arg Ser
1 5 10 15

Gly Cys Lys

20

< 210 > 20
< 211 > 20
< 212 > Proteína
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >

25

< 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
< 220 >
< 221 > Xaa
< 222 > (1) .. (20)

< 223 > Xaa es citrulina

30

< 400 > 20

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Ser Arg
1 5 10 15

Ser Arg Cys Lys
20

< 210 > 21

35

< 211 > 21
< 212 > Proteína
< 213 > Secuencia artificial
< 220 >

< 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6

40

< 220 >
< 221 > Xaa
< 222 > (1) .. (21)

< 223 > Xaa es citrulina

< 400 > 21

45

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Gly Xaa Ser
1 5 10 15

Arg Ser Arg Cys Lys
20

- < 210 > 22
- < 211 > 18
- 5 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:6
- < 220 >
- 10 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 22

Cys Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Xaa Gly Xaa Ser Arg Ser Arg
1 5 10 15

15 **Cys Lys**

- < 210 > 23
- < 211 > 14
- < 212 > Proteína
- 20 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:8
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 25 < 222 > (1) .. (14)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 23

Cys Arg Asp Gly Ser Xaa His Pro Xaa Arg Ser His Asp Cys
1 5 10

- 30 < 210 > 24
- < 211 > 15
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- 35 < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:8
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (15)
- 40 < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 24

Cys Lys Arg Asp Gly Ser Xaa His Pro Xaa Arg Ser His Asp Cys
1 5 10 15

- 45 < 210 > 25
- < 211 > 15
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 50 < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:8

- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (15)
- < 223 > Xaa es citrulina
- 5 < 400 > 25

Cys Arg Asp Gly Ser Xaa His Pro Xaa Arg Ser His Asp Cys Lys
1 5 10 15

- < 210 > 26
- 10 < 211 > 17
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:10
- 15 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (17)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 26
- 20

Cys Ser His Gln Glu Ser Val Xaa Leu Gly Xaa Ser Arg Ser Arg Gly
1 5 10 15

Ser

- < 210 > 27
- < 211 > 18
- 25 < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:10
- < 220 >
- 30 < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 27

Cys Lys Ser His Gln Glu Ser Val Xaa Leu Gly Xaa Ser Arg Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser

- 35
- < 210 > 28
- < 211 > 19
- < 212 > Proteína
- 40 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:10
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 45 < 222 > (1) .. (19)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 28

Cys Lys Ser His Gln Glu Ser Val Xaa Leu Gly Xaa Ser Arg Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ser Cys

- < 210 > 29
- < 211 > 18
- < 212 > Proteína
- 5 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:11
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- 10 < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 29

Cys Asp Asn Tyr Trp Ser Phe Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Trp Thr
1 5 10 15

Arg Cys

- 15 < 210 > 30
- < 211 > 16
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- 20 < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:11
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (16)
- 25 < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 30

Cys Lys Asp Asn Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Trp Thr Arg Cys Lys
1 5 10 15

- 30 < 210 > 31
- < 211 > 18
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 35 < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:11
- < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- 40 < 400 > 31

Cys Lys Asp Asn Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Trp Thr Arg Cys Lys
1 5 10 15

Lys Lys

- < 210 > 32
- 45 < 211 > 17
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:11
- 50 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (17)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 32

Cys Lys Asp Asn Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Thr Arg Cys Lys Lys
1 5 10 15

Lys

- < 210 > 33
- 5 < 211 > 18
- < 212 > Proteína
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > péptido sintético derivado de SEQ ID NO:11
- 10 < 220 >
- < 221 > Xaa
- < 222 > (1) .. (18)
- < 223 > Xaa es citrulina
- < 400 > 33
- 15

Lys Cys Lys Asp Asn Ser Asp Xaa Ser Thr Tyr Xaa Trp Thr Arg Cys
1 5 10 15

Lys Lys

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético que consta de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por SED ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33.
2. El péptido sintético de la reivindicación 1, en que dicho péptido está ciclado.
3. Una composición que comprende
 - a) un vehículo y un péptido que consta de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por SED ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33 y combinaciones de estas, o
 - b) al menos dos péptidos que constan de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo compuesto por SED ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33, en que dichos, al menos dos péptidos están ciclados.
4. La composición de la reivindicación 3, en que la composición de la alternativa a) comprende los péptidos que constan de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:30.
5. La composición de la reivindicación 4, en que los péptidos están en una relación ponderal de aproximadamente 1:1:3:3:3.
6. La composición de la reivindicación 3, en que la composición de la alternativa a) comprende un dímero, trímero o multímero de cualquiera de las secuencias aminoacídicas definidas en la reivindicación 1.
7. La composición de la reivindicación 3, en que dicho péptido de la alternativa a) está ciclado.
8. Un procedimiento para la detección de anticuerpos autoinmunitarios expresados por un paciente que presenta riesgo de padecer o padece artritis reumatoide que comprende las etapas de la puesta en contacto de un péptido sintético de la reivindicación 1 con una muestra de un paciente y la detección de la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo, en que la presencia de dicho complejo antígeno-anticuerpo indica la presencia de anticuerpos autoinmunitarios.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en que la presencia de dicho complejo antígeno-anticuerpo indica que dicho paciente presenta riesgo de padecer o padece artritis reumatoide.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en que dicha muestra de un paciente se selecciona entre plasma y suero.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además la etapa de la cuantificación de la inmunorreactividad del péptido sintético con los anticuerpos autoinmunitarios.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en que se cuantifican al menos tres inmunoglobulinas.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en que dichas, al menos tres inmunoglobulinas son inmunoglobulina IgG, inmunoglobulina IgA e inmunoglobulina IgM.
14. El procedimiento de la reivindicación 8, en que la puesta en contacto de un péptido sintético de la reivindicación 1 con una muestra de un paciente **se caracteriza porque** se mezcla una composición de la alternativa a) de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4 con la muestra del paciente.
15. Uso del péptido sintético de la reivindicación 1 para el diagnóstico in vitro de la artritis reumatoide en un paciente.

CKSHQESTXGXSRSRGRSGC	= X ¹ G X	[SEQ ID NO:17]
CKRDGSXHPXRSHDC	= X ² HP X	[SEQ ID NO:24]
CKSHQESVXLGXSRSRGS	= X ² LG X	[SEQ ID NO:27]
CKDNSDXSTYXWTRCK	= X ³ STY X	[SEQ ID NO:30]
CSHQESTXXSRSRGRSGCK	= X ⁰ X	[SEQ ID NO:19]
CSHQESTXGGGGXSRSRCK	= X ⁵ GGGGS X	[SEQ ID NO:20]
CSHQESTXGGGGSGXSRSRCK	= X ⁶ GGGGS X	[SEQ ID NO:21]
CSHQESTXGXG XSRSRCK	= X ¹ G X ¹ G X	[SEQ ID NO:22]
CKSHQESVXLGXSRSRGSC	= X ² LG X	[SEQ ID NO:28]

Figura 1

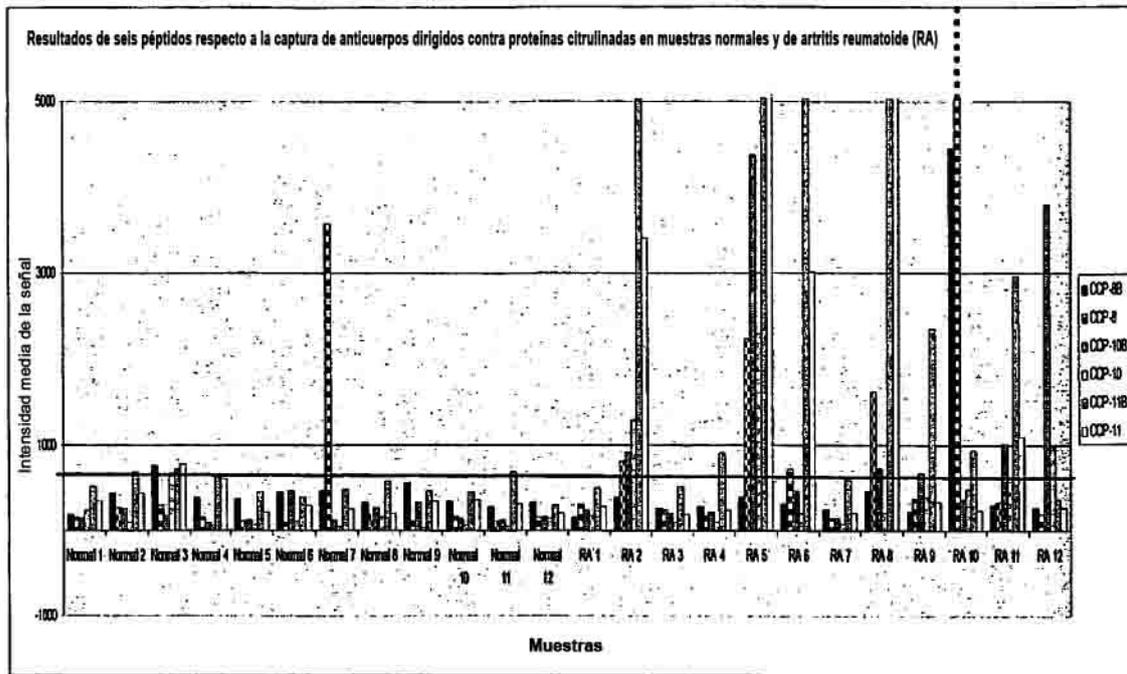


Figura 2

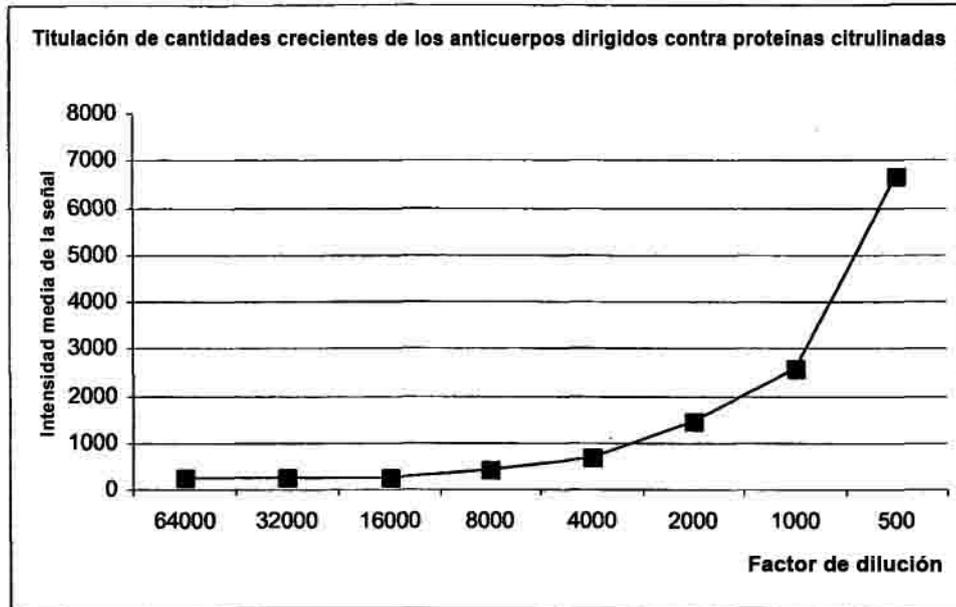


Figura 3

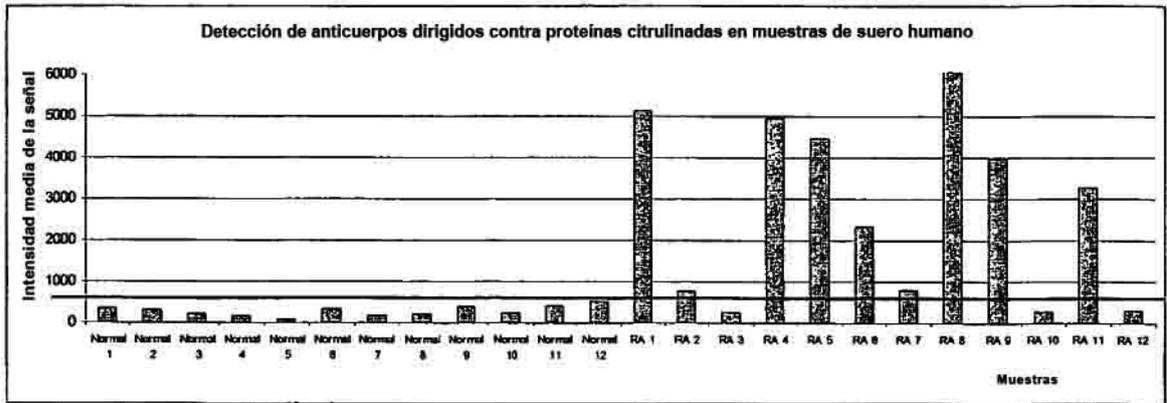


Figura 4

Figura 5

Nº de secuencia	Código	Péptidos originales
1	CCP-1	C K S G G G S T CIT C G CIT S S R D G C
2	CCP-2	C K S G G G S T CIT G R R D G C
3	CCP-3	C K S G G G S T CIT S S R D G C
4	CCP-4	C S H Q E S T CIT G R S R G R S C
5	CCP-5	C S H Q E S T CIT S R S R G R S C
6	CCP-6	C S H Q E S T CIT G G CIT S R S R G R S C
7	CCP-7	K S G G G S CIT G G CIT S R R D G
8	CCP-8	C R D G S CIT H P CIT R S H D C
9	CCP-9	C S S T G C CIT Q G CIT S H H E C
10	CCP-10	C S H Q E S V CIT L G CIT S R S R G S
11	CCP-11	C D N Y W S F S D CIT S T Y CIT W T R C
Derivados de CCP-1		
12	CCP-1	C K S G G G S T CIT C G CIT S S R D G C
13	CCP-1B	C K S G G G S T CIT G CIT S R R D G G C
14	CCP-1C	C K S G G G S T CIT G G G S CIT S R R D G C
Derivados de CCP-6		
15	CCP-6	C S H Q E S T CIT G G CIT S R S R G R S C
16	CCP-6B	C S H Q E S T CIT G CIT S R S R G R S G C
17	CCP-6B2	C K S H Q E S T CIT G CIT S R S R G R S G C
18	CCP-6C	C S H Q E S T CIT G G S CIT S R S R G R S C
19	CCP-6D	C S H Q E S T CIT CIT S R S R G R S G C K
20	CCP-6E	C S H Q E S T CIT G G G G S CIT S R S R C K
21	CCP-6F	C S H Q E S T CIT G G G G S G CIT S R S R C K
22	CCP-6G	C S H Q E S T CIT G CIT G CIT S R S R C K
Derivados de CCP-8		
23	CCP-8	C R D G S CIT H P CIT R S H D C
24	CCP-8B	C K R D G S CIT H P CIT R S H D C
25	CCP-8C	C R D G S CIT H P CIT R S H D C K
Derivados de CCP-10		
26	CCP-10	C S H Q E S V CIT L G CIT S R S R G S
27	CCP-10B	C K S H Q E S V CIT L G CIT S R S R G S
28	CCP-10C	C K S H Q E S V CIT L G CIT S R S R G S C
Derivados de CCP-11		
29	CCP-11	C D N Y W S F S D CIT S T Y CIT W T R C
30	CCP-11B	C K D N S D CIT S T Y CIT W T R C K
31	CCP-11C	C K D N S D CIT S T Y CIT W T R C K K K
32	CCP-11D	C K D N S D CIT S T Y CIT T R C K K K
33	CCP-11E	K C K D N S D CIT S T Y CIT W T R C K K