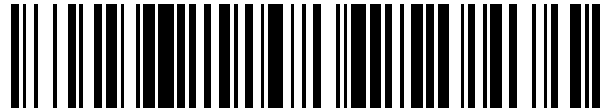


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 724**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10711235 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2414836**

54 Título: **Biomarcadores, métodos y kits para el diagnóstico de artritis reumatoide**

30 Prioridad:

30.03.2009 EP 09305266
06.11.2009 EP 09306063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2014

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (50.0%)

72 Inventor/es:

AUGER, ISABELLE y
ROUDIER, JEAN

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 483 724 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores, métodos y kits para el diagnóstico de artritis reumatoide

5 **Sector de la técnica**

La presente invención reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Europea N° EP 09 305 266 presentada el 30 de marzo de 2009 y la Solicitud de Patente Europea N° EP 09 306 063.0 presentada el 6 de noviembre de 2009.

10 **Estado de la técnica**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Se caracteriza por inflamación y proliferación celular en la cápsula sinovial de las articulaciones que en último término puede dar lugar a destrucción del cartílago y hueso, deformidad articular y pérdida de movilidad. La AR causa habitualmente problemas en varias articulaciones al mismo tiempo, a menudo de manera simétrica. La AR tiende precozmente a afectar primero las articulaciones pequeñas, tales como las articulaciones de las muñecas, manos, tobillos y pies. Según progresa la enfermedad, también pueden estar implicadas las articulaciones de los hombros, codos, rodillas, caderas, mandíbula y cuello. A diferencia de otras afecciones artríticas que solo afectan áreas en o alrededor de las articulaciones, la AR es una enfermedad sistémica que produce inflamación en tejidos extra-articulares por todo el cuerpo incluyendo la piel, vasos sanguíneos, corazón, pulmones y músculos.

La AR se asocia con dolor, deformidad, descenso de la calidad de vida, y discapacidad que afecta a su vez a la capacidad de los pacientes para llevar una vida normal y productiva. Estudios recientes han demostrado que 5 años después de la aparición de la enfermedad, aproximadamente un tercio de los pacientes con AR no son capaces de trabajar, y a los 10 años, la mitad de los pacientes tienen una discapacidad funcional importante (A. Young y col., *Rheumatology*, 2007, 46: 350-357). En consecuencia, la AR impone una carga importante a la sociedad. Muchos datos también sugieren que la AR se asocia con una disminución en la esperanza de vida.

Aunque la AR se ha estudiado extensamente, la etiología y patogénesis de la enfermedad sigue sin comprenderse completamente. Los factores que pueden aumentar el riesgo de AR incluyen: el sexo del individuo (las mujeres tienen 2 o 3 veces más probabilidad que los hombres de desarrollar la enfermedad); la edad (la AR se produce más comúnmente entre las edades de 40 y 60 años, aunque puede atacar a niños, adolescentes y adultos más ancianos); la genética (la AR se encuentra fuertemente asociada con el antígeno HLA-DR4 del tejido heredado tipo complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) - más específicamente DRB1*0401 y DRB 1*0404); y el tabaquismo (la AR es aproximadamente 4 veces más común en fumadores que en no fumadores).

Actualmente no existe una cura fiable para la AR. El tratamiento se dirige esencialmente a aliviar el dolor, reducir la inflamación y detener o ralentizar el daño articular y la destrucción ósea. La estrategia terapéutica actual es la prescripción de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) precozmente en la afección, debido a que los pacientes que se tratan pronto con tales fármacos tienen mejores resultados, con mayor preservación de la función, menos incapacidad laboral, y menor riesgo de muerte prematura. Los avances recientes en el entendimiento de la patofisiología de la AR han dado lugar al desarrollo de nuevos DMARD, llamados modificadores biológicos de la respuesta. Los DMARD biológicos se diseñan para dirigirse y bloquear la acción de ciertas células clave o moléculas, tales como el factor alfa de necrosis tumoral (TFN- α), interleucina-1 (IL-1), células T, y células B, implicadas en la reacción inmunitaria anormal que se asocia con la AR. En comparación con los DMARD tradicionales, los agentes biológicos tienen un inicio de acción mucho más rápido y pueden ofrecer una respuesta clínica mejor con una prevención a largo plazo del daño articular (J.K.D. de Vries-Bouwstra y col., *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2005, 31: 745-762).

Debido a que la destrucción articular irreversible se puede evitar por la intervención en estadios tempranos de la enfermedad, es importante el diagnóstico precoz de la AR. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de AR puede ser difícil. Los ensayos inmunológicos que se pueden llevar a cabo para el diagnóstico de AR incluyen, en particular, la medición de los niveles del factor reumatoide (RF), y anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP). El ensayo serológico de RF es complicado debido a su sensibilidad y especificidad moderadas, y a las altas tasas de positividad en otras enfermedades inflamatorias crónicas e infecciosas (T. Dorner y col., *Curr. Opin. Rheumatol*, 2004, 16: 246-253). El ensayo de anticuerpos anti-CCP es particularmente útil en el diagnóstico de AR, con alta especificidad, positividad precoz en el proceso de la enfermedad, y capacidad para identificar pacientes que probablemente tengan enfermedad grave y daño irreversible. Sin embargo, un resultado negativo en el ensayo de anticuerpos anti-CCP no excluye la AR.

El documento de AUGER I Y COL. (28-10-2008) identificó la PAD4 y BRAF como autoantígenos específicos de la AR, por exploración con 8.268 matrices proteicas en sueros de pacientes con AR. Sin embargo, AUGER Y COL: (28-10-2008), los documentos de MICHELLE Y COL. (07-2008) y ZHAO JINXIA Y COL (06-2008), cada documento por separado, desvela los inmunoensayos para el diagnóstico de artritis reumatoides (AR) en un sujeto, que comprende la detección de al menos un biomarcador, tal como por ejemplo, péptidos de PAD4, pero no desvelan

BRAF y/o péptidos de BRAF. El documento WO 2004/020595 desvela métodos para diagnosticar un gran número de afecciones tales como por ejemplo la AR, midiendo el nivel de ciertos biomarcadores polinucleótidos y/o polipéptidos. El péptido de sec. 382 (169 aminoácidos) comprende una región que es idéntica al 100% con la SEC ID N° 9 (20 aminoácidos) de la presente solicitud.

Por lo tanto, hay una gran necesidad de nuevos marcadores biológicos de AR. En particular, son altamente deseables, biomarcadores que permitieran un diagnóstico fiable y el seguimiento en estados precoces de la enfermedad y que permitan la intervención precoz para prevenir potencialmente el dolor, la destrucción articular y la incapacidad a largo plazo.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere en general a la mejora de los sistemas y estrategias de diagnóstico de artritis reumatoide (AR). En particular, la invención se refiere a biomarcadores peptídicos que reaccionan específicamente con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con AR. Más específicamente, la presente invención concierne a secuencias de aminoácidos de la PAD4, BRAF y calpastatina humanas, y métodos para utilizar tales secuencias en el diagnóstico de AR, en particular en el diagnóstico de AR en pacientes negativos al CCP.

Realizaciones de la invención:

1. Un método in vitro para el diagnóstico de la artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto la muestra biológica obtenida del sujeto con al menos un biomarcador durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme el complejo biomarcador-anticuerpo, donde al menos un biomarcador es el péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y detectar el complejo biomarcador anticuerpo formado, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en un sujeto.

2. El método in vitro de la realización 1, comprendiendo además dicho método las etapas de: poner en contacto un muestra biológica obtenida del sujeto con al menos otro biomarcador durante un tiempo y en condiciones que permitan que se forme el complejo biomarcador-anticuerpo, donde al menos el otro biomarcador se selecciona del grupo constituido por: péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprenden o consisten en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprenden o consisten en una secuencia que se selecciona de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y cualquier combinación de las mismas, y detectando cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se forme, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en un sujeto.

3. El método in vitro de acuerdo con la realización 2, en la que al menos el otro biomarcador es un péptido de menos de 50 aminoácidos.

4. El método in vitro de la realización 2, donde dicho método se lleva a cabo con tres péptidos de BRAF, tres péptidos de PAD4, y dos péptidos de calpastatina y donde los tres péptidos de BRAF consisten en las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 y SEC ID N° 9, los tres péptidos de PAD4 consisten en las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, y SEC ID N° 4, y los dos péptidos de calpastatina consisten en las SEC ID N° 11 y SEC ID N° 12.

5. Un método in vitro de detección de la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de: poner en contacto la muestra biológica con al menos un biomarcador durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme un complejo biomarcador-anticuerpo, donde al menos un marcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 y SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas o combinaciones de las mismas, y detectando cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se forme, donde la detección de un complejo péptido de BRAF-anticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en la muestra biológica.

6. El método in vitro de cualquiera de las realizaciones 1-5, donde el sujeto es negativo al CCP o la muestra biológica se obtiene de un paciente negativo al CCP.

7. El método in vitro de cualquiera de las realizaciones 1-6, que además comprende la medición, en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, de la concentración de al menos un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por proteína C reactiva, amiloide A sérico, interleucina 6, proteínas S100, osteopontina, factor reumatoide, metaloproteasa de la matriz 1, metaloproteasa de la matriz 3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis, y productos del metabolismo del hueso, cartilago, o sinovia.

8. Un kit para el diagnóstico in vitro de artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho kit: al menos un biomarcador, donde el biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas y al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el péptido de BRAF y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto.
9. El kit de la realización 8 que comprende además al menos otro biomarcador, donde el otro biomarcador se selecciona de entre el grupo de: péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el al menos otro biomarcador y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en un sujeto.
10. Un kit para el diagnóstico in vitro de artritis reumatoide en un sujeto negativo al CCP, comprendiendo dicho kit: al menos 8 biomarcadores que comprenden: tres péptidos de BRAF seleccionados de entre el grupo constituido por los péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, tres péptidos de PAD4 seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas y dos péptidos de calpastatina seleccionados de entre el grupo de péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas; y al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo que se forma entre el biomarcador y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto negativo al CCP.
11. Un kit para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit: al menos un biomarcador, donde al menos el biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo que se forma entre el péptido de BRAF y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica, donde el autoanticuerpo es un autoanticuerpo anti-BRAF que es indicativo de artritis reumatoide.
12. Una matriz para el diagnóstico de artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicha matriz, al menos un biomarcador fijado en su superficie, donde el biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas y combinaciones de las mismas.
13. La matriz de la realización 12 que comprende además, al menos otro biomarcador fijado en su superficie, donde el otro biomarcador se selecciona de entre el grupo constituido por: péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y combinaciones de los mismos, y cualquier combinación de los mismos.
14. Una matriz para el diagnóstico de la artritis reumatoide en un sujeto negativo al CCP, comprendiendo dicha matriz, al menos ocho biomarcadores fijados en su superficie, donde los al menos ocho biomarcadores comprenden: tres péptidos de BRAF seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, y SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, tres péptidos de PAD4 seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas y combinaciones de las mismas y dos péptidos de calpastatina seleccionados del grupo de péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia

seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas.

5 15. La matriz de cualquiera de las realizaciones 12-14 que comprende además, al menos un biomarcador adicional fijado en su superficie, para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de AR en una muestra biológica, preferentemente anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti-CCP.

10 16. Un biomarcador de artritis reumatoide, donde el biomarcador es: un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 y SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y donde el biomarcador es reconocido por un autoanticuerpo anti-BRAF.

15 17. Un kit de acuerdo con la realización 9 o la realización 10 o una matriz de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13-15, donde los péptidos de PAD4 y péptidos de calpastatina son péptidos de menos de 50 aminoácidos.

Estos y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán aparentes para los expertos habitados en la técnica que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

20 Descripción de las figuras

25 La **Figura 1** es un gráfico que muestra que los autoanticuerpos contra PAD4 presentes en el suero de pacientes con AR inhiben la citrulinación del fibrinógeno. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la sección de los Ejemplos. Una relación de DO (ensayo)/DO (control) > 1 indica una activación de la citrulinación del fibrinógeno por PAD4, mientras que una relación < 1 indica una inhibición de la citrulinación del fibrinógeno por PAD4.

30 La **Figura 2** es un gráfico que muestra, para cada grupo de sueros de pacientes con AR, pacientes con SA y controles sanos, el porcentaje de suero que reconoce el péptido **22**, el péptido **28**, el péptido **61** y el péptido **63**. Los sueros positivos se definían como sueros para los que se midió un valor de DO de más de dos veces el valor de fondo (véase la sección de Ejemplos para los detalles experimentales).

35 La **Figura 3** es un gráfico que muestra, para cada grupo de autoanticuerpos anti-PAD4 que inhiben la citrulinación del fibrinógeno (pacientes RA1 a RA20), que activan la citrulinación del fibrinógeno (pacientes RA24 a RA29) y que no tienen efecto sobre la citrulinación del fibrinógeno (pacientes RA21 a RA 23), el porcentaje de autoanticuerpos que reconocen solo el extremo N de los péptidos, solo el extremo C de los péptidos, o ambos terminales N y C de los péptidos.

40 La **Figura 4** es un gráfico que muestra, para cada grupo de autoanticuerpos contra PAD4 que reconocen los péptidos **22**, péptido **28**, péptido **61** y péptido **63**, el porcentaje de autoanticuerpos que inhiben, activan, o no tienen efecto sobre la citrulinación del fibrinógeno.

45 La **Figura 5** es un esquema que presenta un modelo que explica como los autoanticuerpos contra PAD4 podían inhibir a PAD4. (A) La unión con el calcio podría abrir el dominio de unión al sustrato de PAD4. (B) El sustrato podría entonces unirse a PAD4 y se podría citrulinar. (C) Los autoanticuerpos contra PAD4 pueden interferir el cambio de conformación o la unión al sustrato.

50 La **Figura 6** es un gráfico que muestra la unión de los péptidos de BRAF a los autoanticuerpos contra BRAF. Los péptidos de BRAF, **P10**, **P16**, **P25** y **P33** se ensayaron por ELISA en el suero de 21 pacientes de RA, 33 pacientes de SPA, y 60 voluntarios sanos. Después de lavarlos, se añadió un anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, y se leyó la densidad óptica a 405 nm. La DO de fondo se obtuvo añadiendo cada suero sin péptido en un pocillo. Los sueros positivos se definieron por un valor de la DO mayor del doble del valor de fondo.

55 La **Figura 7** es una tabla que muestra que los péptidos de BRAF (**P10**, **P16** y **P25**) identifican AR en el 50% de los pacientes negativos al CCP. El gris indica un péptido positivo (es decir, un péptido de BRAF que está sometido a la unión con autoanticuerpos contra BRAF presentes en el suero de los pacientes negativos al CCP). La unión se determinó por ELISA como se describe en el Ejemplo II.

60 La **Figura 8** es un gráfico que muestra que los autoanticuerpos contra BRAF presentes en el suero de pacientes con AR activan la fosforilación de MEK1. Los autoanticuerpos anti-BRAF purificados de los pacientes se incubaron con BRAF y MEK1. Para cada paciente, se incluyeron un control positivo (BRAF y MEK1) y un control negativo (anticuerpos BRAF y MEK1 y control C1). La activación o inhibición de la fosforilación de MEK1 se detectó midiendo la relación entre la DO de ensayo / DO del control positivo. Una relación >1 indicaba activación, la relación < 1 indicaba inhibición.

65 La **Figura 9** es un gráfico que muestra la unión de péptidos de PAD4, BRAF y Calpastatina a autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con AR. Los péptidos de PAD4 (péptidos **22**, **61** y **63**), los péptidos de BRAF

(P10, P16 y P25) y péptidos de Calpastatina (P'16 y P'28) se pusieron en contacto con los sueros de 118 pacientes de AR y 100 sueros de control. La unión se determinó y evaluó como se describe en el Ejemplo II.

La Figura 10 es un gráfico que muestra que los péptidos de PAD4 (péptidos 22, 61 y 63), los péptidos de BRAF (P10, P16 y P25) y los péptidos de Calpastatina (P'16 y P'28) se reconocen en pacientes negativos al CCP. Estos péptidos se pusieron en contacto con los sueros de 83 pacientes de AR negativos al CCP y 29 pacientes de AR negativos al CCP. La unión se determinó y se evaluó como se describe en el Ejemplo II.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de la especificación, se emplean varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

Como se utiliza en el presente documento la término "sujeto" se refiere a un ser humano o a otro animal (por ejemplo, un primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que pueden padecer AR, pero que pueden o no tener la enfermedad. En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En tales realizaciones, el sujeto a veces se denomina "individuo". El término "individuo" no denota una edad en particular, y por lo tanto engloba niños, adolescentes y adultos.

La expresión "sujeto sospechoso de tener AR" se refiere a un sujeto que presenta uno o más síntomas indicativos de AR (por ejemplo, dolor, agarrotamiento o hinchazón de las articulaciones), o que se explora para detectar AR (por ejemplo, durante el examen físico). De manera alternativa o adicionalmente, un sujeto sospechoso de tener AR puede tener uno o más factores de riesgo (por ejemplo, edad, sexo, historia familiar, fumador, etc.). El término engloba sujetos que no se han ensayado para detectar AR como los sujetos que han recibido un diagnóstico preliminar.

La expresión "muestra biológica" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra biológica generalmente se obtiene de un sujeto. Una muestra puede ser cualquier tejido biológico o fluido con el que se pueden ensayar los biomarcadores de la presente invención. Frecuentemente, una muestra puede ser una "muestra clínica", es decir, una muestra derivada de un paciente. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a estos, fluidos corporales que pueden o no contener células, por ejemplo sangre (por ejemplo, sangre entera, suero o plasma), orina, líquido sinovial, saliva, tejidos o muestras de biopsia de aspiración por aguja fina, y muestras de archivo con una historia conocida de diagnóstico, tratamiento y/o resultado. Las muestras biológicas también pueden incluir partes de tejidos tales como partes congeladas que se han tomado con fines histológicos. La expresión "muestra biológica" también engloba cualquier material derivado del procesamiento de una muestra biológica. Los materiales derivados incluyen, pero no se limitan a, células (o su descendencia) aisladas de la muestra, o proteínas extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede implicar una o más de entre: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes de interferencia, adición de reactivos, y similares. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, la muestra biológica es una muestra serológica y es (o se deriva de) sangre entera, suero o plasma obtenidos de un sujeto.

Los términos "normal" y "sano" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Se refieren a un sujeto que no ha mostrado ningún síntoma de AR, y que no se ha diagnosticado de AR o de lesiones en hueso o cartílago. Preferentemente, un sujeto normal no está bajo una medicación que afecte a la AR y no ha sido diagnosticado de cualquier otra enfermedad (en particular una enfermedad inflamatoria autoinmune). En ciertas realizaciones, los sujetos normales tienen sexos, edades y/o índices de masa corporal similares en comparación con el sujeto del que se obtiene la muestra biológica que se va a ensayar. El término "normal" también se utiliza en el presente documento para calificar una muestra obtenida de un sujeto sano.

En el contexto de la presente invención, el término "control", cuando se utiliza para caracterizar un sujeto, se refiere a un sujeto que está sano o a un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad específica distinta de AR. La expresión "muestra control" se refiere a una, o más de una, muestra que se ha obtenido de un sujeto sano o de un paciente diagnosticado de una enfermedad distinta de AR.

El término "autoanticuerpo", como se utiliza en el presente documento, tiene su significado en la comprensión de la técnica, y se refiere a un anticuerpo que lo produce el sistema inmunitario de un sujeto y que se dirige contra una o más de las proteínas propias del sujeto. Los autoanticuerpos pueden atacar las células, tejidos, y/u órganos propios, causando inflamación y daños.

Como se utiliza en el presente documento, el término "autoantígeno" se refiere a un antígeno endógeno, o a un fragmento activo del mismo, que estimula la producción de autoanticuerpos en el cuerpo de un sujeto, como en las reacciones autoinmunitarias. El término también engloba cualquier sustancia que pueda formar un complejo antígeno-anticuerpo con los autoanticuerpos presentes en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto.

Los términos "biomarcador" y "marcador" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Se refieren a una sustancia que es un indicador distintivo de un proceso biológico, un acontecimiento biológico, y/o una

afección patológica. En el contexto de la presente invención, la expresión "biomarcador de AR" engloba péptidos de BRAF, péptidos de PAD4 y péptidos de Calpastatina que se proporcionan aquí, que son reconocidos específicamente por autoanticuerpos anti-PAD4 presentes en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) de un paciente con AR. En ciertas realizaciones preferidas, los biomarcadores de la invención son péptidos de menos de 50 aminoácidos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "indicativo de AR", cuando se aplica a un proceso o acontecimiento, se refiere a un proceso o acontecimiento que es diagnóstico de AR, tal como el proceso o acontecimiento que se encuentra significativamente más a menudo en sujetos con AR que en sujetos sanos y/o en sujetos que sufren una enfermedad distinta de AR.

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, y se refiere a secuencias de aminoácidos de una variedad de longitudes, que estén en sus formas neutras (sin carga) o como sales, y que estén modificadas o no modificadas por glicosilación, oxidación de cadenas laterales, o fosforilación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos en una proteína nativa de longitud completa. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En otras realizaciones más, la secuencia de aminoácidos está modificada por sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de los aminoácidos, tales como unidades glucosilo, lípidos, o iones inorgánicos tales como los fosfatos, así como modificaciones relativas a la conversión química de cadenas tales como la oxidación de grupos sulfhidrilo. Por tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeta a modificaciones que no cambien significativamente sus propiedades específicas. En particular el término "proteína" engloba las isoformas proteicas, es decir, variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que se diferencian en su pI o MW, o ambos. Tales isoformas se pueden diferenciar por su secuencia de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de cortes y empalmes alternativos o proteólisis limitada), o como alternativa, pueden producirse por modificación post-traduccional diferencial (por ejemplo, glicosilación, acilación, fosforilación).

El término "análogo", cuando se utiliza en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, se refiere a un péptido que posee una función similar o idéntica que la proteína o polipéptido pero que no necesariamente tiene que comprender una secuencia de aminoácidos similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o polipéptido o una estructura que sea similar o idéntica a la de la proteína o polipéptido. Preferentemente, en el contexto de la presente invención, un análogo tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 30%, más preferentemente, al menos aproximadamente: un 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o el polipéptido. En ciertas realizaciones preferidas, un análogo de un péptido biomarcador de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 80% o al menos un 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos del péptido biomarcador.

El término "fragmento", cuando se utiliza en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácido (preferentemente, de al menos aproximadamente: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, o 250 restos de aminoácido) de la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido. El fragmento de proteína o polipéptido puede o no poseer la misma actividad funcional que la proteína o el polipéptido. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, un fragmento de un péptido marcador de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 10 restos de aminoácido consecutivos de la secuencia de aminoácidos del péptido biomarcador.

El término "homólogo" (u "homología"), como se utiliza en el presente documento, es sinónimo del término "identidad" y se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando la misma base o el mismo aminoácido ocupan una posición en dos secuencias comparadas, entonces las respectivas moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias corresponde al número de coincidencias o de posiciones homólogas que comparten dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas y multiplicado por 100. En general, una comparación se hace cuando las dos secuencias se alinean para dar una homología máxima. Las secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los restos similares son sustituciones conservadoras para, o "mutaciones de punto permitidas" de, que se corresponden con los restos de aminoácidos en una secuencia de referencia. Las "sustituciones conservadoras" de un resto en una secuencia de referencia son sustituciones que son funcionalmente o físicamente similares al correspondiente resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño similar, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno o similares. Sustituciones conservadoras particularmente preferidas son las que cumplen los criterios definidos para una "mutación de punto aceptada" por Dayhoff y col. ("Atlas of Protein Sequence y Structure", 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22: 354-352).

Las expresiones "marcado", "marcado con un agente detectable" y "marcado con un resto detectable" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Estas expresiones se utilizan para especificar que una entidad (por ejemplo, un péptido de PAD4, un péptido de BRAF, un péptido de Calpastatina) se puede visualizar, por

ejemplo, después de la unión con otra entidad (por ejemplo, un autoanticuerpo anti-PAD4, un autoanticuerpo anti-BRAF o un autoanticuerpo anti-calpastatina). Preferentemente, un resto o agente detectable se selecciona tal que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad se relaciona con la cantidad de entidad unida. En los métodos basados en matrices, un agente o resto detectable también se selecciona preferentemente tal que genere una señal localizada, permitiendo de esta manera la resolución espacial de la señal a partir de cada mancha de la matriz. Los métodos para marcar proteínas y polipéptidos se conocen bien en la técnica. Los polipéptidos marcados se pueden preparar por incorporación o por conjugación con un marcador, que es detectable directa o indirectamente por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos, o químicos, o cualquier otro medio adecuado. Los agentes adecuados detectables incluyen, pero no se limitan a estos, varios ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos, y haptenos.

Las expresiones “matriz proteica” y “chip proteico” se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. Se refieren a una superficie de sustrato sobre el que se han inmovilizado diferentes proteínas o polipéptidos, en una manera ordenada, en manchas discretas sobre el sustrato. Las matrices proteicas se pueden utilizar para identificar las interacciones proteína/proteína (por ejemplo las interacciones antígeno/anticuerpo), para identificar los sustratos de enzimas, o para identificar las dianas de moléculas pequeñas biológicamente activas. El término “micromatriz” se refiere más específicamente a una matriz que está miniaturizada de forma que requiere el examen microscópico para la evaluación visual.

El término “tratamiento” se utiliza en el presente documento para caracterizar un método que tiene como objetivo (1) retrasar o evitar la aparición de una enfermedad o afección (por ejemplo, AR); (2) ralentizar o detener la progresión, el agravamiento, o los deterioros de los síntomas de la afección; (3) dar lugar a mejoría en los síntomas de la afección; y/o (4) curar la afección. Un tratamiento puede administrarse antes de la aparición de la enfermedad, para lograr una acción preventiva o profiláctica. También se puede administrar tras el inicio de la enfermedad, para conseguir una acción terapéutica.

Como se mencionó anteriormente, la presente invención proporciona biomarcadores que se pueden utilizar para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de AR en muestras biológicas obtenidas de pacientes. Estos marcadores son péptidos de PAD4 que se corresponden con epítomos de PAD4 humanos y lo cuales reaccionan específicamente con autoanticuerpos anti-PAD4 presentes en el suero de pacientes con AR. Otros biomarcadores son péptidos de BRAF que son epítomos de autoantígenos BRAF. Otros biomarcadores más son péptidos de calpastatina. Preferentemente, los biomarcadores son péptidos de menos de 50 aminoácidos. También se proporcionan métodos para utilizar estos biomarcadores para el diagnóstico de AR.

I – Péptidos Biomarcadores

Péptidos de PAD4

Los anticuerpos críticos en AR se dirigen a los restos de citrulina de diferentes proteínas tales como Fibrina, Filagrina, y Vimentina. La citrulina se genera por conversión post-traducciona de restos de arginina. Este proceso está catalizado por un grupo de peptidil deiminasa de arginina dependientes del calcio, PAD. Se cree ampliamente que una de las enzimas PAD, la PAD4, tiene un papel que causa la aparición y progresión de la enfermedad AR debido a que se han identificado mutaciones en el gen PAD4 asociadas con AR en una variedad de poblaciones (A. Suzuki y col., Nat. Genet., 2003, 34(4): 395-402; T. Iwamoto y col., Rheumatology, 2006, 45: 804-807; S.M. Harney y col., Rheumatology, 2005, 44: 869-872; T. Cantaert y col., Ann. Rheum. Dis., 2005, 64: 1316-1320).

La PAD4 no solo está implicada en la generación de epítomos citrulinados, es por sí misma una diana para anticuerpos específicos de AR. Ya se habían descrito autoanticuerpos contra PAD4 en los pacientes con AR (Y. Takizawa y col., Scand. J. Rheumatol., 2005, 3: 212-215; E.B. Roth y col., Clin. Exp. Rheumatol., 2006, 1: 12-18; E.H. Halvorsen y col., Ann. Rheumatol. Dis., 2008, 67: 414-417; J. Zhao y col., J. Rheumatol., 2008, 35: 969-974). En 2008, los presentes solicitantes identificaron anticuerpos contra PAD4 en pacientes con AR utilizando matrices proteicas y análisis ELISA (I. Auger y col., Rheum. Dis., 2009, 68: 591-594; EP 08 305 167, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Los solicitantes observaron que el 29% de 116 pacientes eran positivos a PAD4 en comparación con ninguno de 33 pacientes con espondiloartropatía (AS) y el 3% de 60 controles sanos (p = 0 por el ensayo Chi cuadrado, 116 pacientes contra 93 controles).

Como se describe en el Ejemplo I posterior, los presentes solicitantes han identificado ahora epítomos de PAD4 humana que son reconocidos específicamente por los sueros de pacientes con AR. Estos epítomos se identificaron utilizando 65 péptidos solapantes de 20 aminoácidos (véase la Tabla 1 de EP 09 305 266.1) englobando la secuencia completa de la PAD4 humana (Número de registro de GenBank: NP_036519.1M locus NM_012387; SEC ID N° 1). Estos péptidos se exploraron con los sueros de 29 pacientes y 2 controles de los que se sabía que contenían autoanticuerpos contra PAD4. Entre los 65 péptidos, 18 fueron reconocidos por los sueros ensayados. Cuatro péptidos (péptidos **22**, **28**, **61** y **63**) fueron preferencialmente reconocidos por los sueros de pacientes de AR y los controles que contenían autoanticuerpos anti-PAD4 (véase Tabla 2). Para confirmar aún más estos resultados, los solicitantes han ensayado el suero de 33 pacientes con espondiloartropatía (AS) y 33 individuos sanos por ELISA

utilizando los péptidos **22**, **28**, **61** y **63** como inmunoabsorbentes. Los autoanticuerpos que reconocen los péptidos **22**, **61** y **63** se encontraron en un porcentaje significativamente más alto en el suero de pacientes con AR que en los controles (pacientes con AS e individuos sanos). Por el contrario, los anticuerpos que reconocían el péptido **28** se encontraron en un alto porcentaje en el suero de pacientes con AR así como en el suero de los controles (véase la Figura 2).

El péptido **22** identificado como se describe en el presente documento se localiza en el dominio del extremo N de PAD4 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 2 VRVFQATRGKLSKCSVVLG,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 211 a 230 de PAD4 humana.

El péptido **61** identificado como se describe en el presente documento se localiza en el dominio del extremo C de PAD4 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 3 PFGPVINGRCCLEEKVCSLL,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 601 a 620 de PAD4 humana.

El péptido **63** identificado como se describe en el presente documento se localiza en el dominio del extremo C de PAD4 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 4 EPLGLQCTFINDFFTYHIRH,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 621 a 640 de la PAD4 humana.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona péptidos de PAD4 que son reconocidos específicamente por los autoanticuerpos anti-PAD4 presentes en los sueros de pacientes con AR. Los péptidos de PAD4 de la invención tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, análogas de las mismas, y homólogas de las mismas. Las SEC ID N° 2-4 se describieron anteriormente. La SEC ID N° 5 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 5 PFGPVINGRCCLEEKVCSLLEPLGLQCTFINDFFTYHIRH,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 601 a 640 de la PAD4 humana.

Péptidos de BRAF

La BRAF (también llamada B-raf) es una proteína serina-treonina quinasa de la familia de proteínas RAF, el gen BRAF codifica una proteína BRAF de 766 restos de aminoácidos (Número de registro GenBank: NP_004324.1), cuya secuencia se define en la SEC ID N° 6.

Los presentes solicitantes han demostrado previamente que el dominio catalítico de BRAF (restos 456 a 712 en la SEC ID N° 6) es una diana para los autoanticuerpos de pacientes afectados de AR y es un marcador específico de AR (I. Auger y col., Rheum. Dis., 2009, 68: 591-594; EP 08 305 167). Los solicitantes han identificado ahora (véase el Ejemplo II) tres péptidos lineales en el dominio catalítico de BRAF que es reconocido casi únicamente por los pacientes con AR. Se ha demostrado que estos péptidos de BRAF, **P10**, **P16**, y **P25**, son reconocidos por los sueros de pacientes negativos al CCP. El uso combinado de **P10**, **P16** y **P25** identifica el 50% de pacientes negativos al CCP.

El péptido **P10** identificado como se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 7 RKTRHVNILLFMGYSTKPQL,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 506 a 525 de BRAF humana.

El péptido **P16** identificado como se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 8 YLHAKSIIHRDLKSNIFLH,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 566 a 585 de BRAF humana.

El péptido **P25** identificado como se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 9 YSNINNRDQITFMVGRGYLS,

5 la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 656 a 675 de BRAF humana.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona péptidos de BRAF que son reconocidos específicamente por autoanticuerpos anti-BRAF presentes en los sueros de pacientes con AR. Los péptidos de BRAF de la invención tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, análogas de las mismas, y homólogas de las mismas. Las SEC ID N°^{os} 7-9 se han descrito anteriormente.

Péptidos de Calpastatina

15 Los presentes solicitantes han observado que los pacientes que padecen AR y son homocigotos para HLA-DRB1*0404 reconocían una proteína sinovial de 100 kD identificada como calpastatina (Auger y col. Ann. Rheum. Dis., 2007, 66: 1588-1593). La calpastatina es un inhibidor de la calpaína endógena (cisteína proteasa dependiente del calcio), presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos. La calpastatina consiste en un dominio del extremo amino L y cuatro dominios repetitivos inhibidores de calpaína - los dominios 1 a 4 (Menard y col., Immun. Today, 20 1996, 17: 545-547). La secuencia de aminoácidos de la isoforma A de la calpastatina humana se proporciona en la SEC ID N° 10 (número de registro GenPept: NP_001035908).

Los presentes solicitantes habían identificado previamente (véase el Ejemplo III) dos péptidos lineales de la calpastatina que eran reconocidos por los sueros de pacientes negativos al CCP: **P'16** y **P'28**, que son péptidos de 25 15 aminoácidos del locus NP_001035908.

El péptido **P'16** identificado como se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 SEC ID N° 11 IGPDDAIDALSSDFT,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 226 a 240 de la isoforma A de la Calpastatina humana y se localiza en el dominio repetitivo inhibidor de calpaína 1.

El péptido **P'28** identificado como se describe en el presente documento tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

40 SEC ID N° 12 AVCRTSMCSIQSAPP,

la cual se corresponde con los restos de aminoácidos 406 a 420 de la isoforma A de la Calpastatina humana y se localiza en el dominio repetitivo inhibidor de calpaína 2.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona péptidos de calpastatina que son reconocidos específicamente por autoanticuerpos anti-calpastatina presentes en los sueros de pacientes con AR. Los péptidos de calpastatina de la invención tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, análogas de las mismas, y homólogas de las mismas. Las SEC ID N°^{os} 11-12 son las que se han descrito anteriormente.

Preparación de los biomarcadores peptídicos

Los biomarcadores peptídicos de la presente invención se pueden preparar por cualquier método adecuado, incluyendo síntesis química y métodos recombinantes.

Los péptidos de la invención son generalmente lo suficientemente cortos para que la síntesis química, utilizando métodos de referencia, sea factible. La síntesis de péptidos en fase sólida, que fue descrita inicialmente por R.B. Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 1963, 85: 2149-2154) es una estrategia rápida y fácil para sintetizar péptidos y pequeñas moléculas peptídicas de secuencias conocidas. Un compendio de tales técnicas de fase sólida se puede encontrar, por ejemplo, en "Solid Phase Peptide Synthesis" (Methods in Enzymology, G.B. Fields (Ed.), 1997, Academic Press: San Diego, CA (que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). La mayoría de estos procedimientos de síntesis implican la adición secuencial de uno o más restos de aminoácidos o restos de aminoácidos protegidos adecuadamente, a una cadena peptídica en crecimiento. Por ejemplo, el grupo carboxilo del primer aminoácido se une a un soporte sólido por medio de un enlace lábil, y se hace reaccionar con el segundo aminoácido, cuyo grupo amino se ha protegido de antemano para evitar la autocondensación. Después del emparejamiento, se desprotege el grupo amino y se va repitiendo este proceso con el siguiente aminoácido. Una vez

que se ensambla el péptido deseado, se escinde del soporte sólido, se precipita, y el péptido libre resultante se puede analizar y/o purificar como se desee. Los métodos en solución, como los descritos, por ejemplo, en "The Proteins" (Vol. II, 3rd Ed., H. Neurath y col. (Eds.), 1976, Academic Press: New York, NY, pp. 105-237) también pueden utilizarse para sintetizar los biomarcadores de la invención.

5 En ciertas realizaciones, un biomarcador peptídico de la invención se proporciona inmovilizado en un portador sólido o soporte (por ejemplo, una perla o una matriz). Los métodos para inmovilizar moléculas polipeptídicas en una superficie sólida se conocen en la técnica. Un péptido puede inmovilizarse bien sea por un enlace covalente o pasivamente a la superficie de un portador sólido o soporte. Ejemplos de materiales de portadores o soportes
10 adecuados incluyen, pero sin limitarse a estos, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sephadex, Sepharosa, carboximetil celulosa, poli(acrilamidas), poliestireno, polivinilo de cloro, polipropileno, papel de filtro, magnetita, resina de intercambio de iones, cristal, copolímero de poliamina-metil-vinil-éter de ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero de etileno ácido maleico, nylon, seda, y similares. La inmovilización de un biomarcador peptídico en la superficie de un portador sólido o soporte puede implicar unión cruzada, unión covalente o adsorción
15 física, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El portador sólido o soporte puede estar en forma de perla, partícula, un pocillo de microplaca, matriz, una cubeta, un tubo, una membrana, o de cualquier forma adecuada para llevar a cabo un método diagnóstico de acuerdo con la invención (por ejemplo, utilizando un inmunoensayo).

20 En particular, la invención proporciona una matriz o matriz proteica para el diagnóstico de AR, que comprende, inmovilizado en su superficie, al menos un biomarcador peptídico de la invención. Preferentemente, la matriz comprende más de un biomarcador peptídico de la invención. La matriz puede comprender además al menos otro biomarcador adicional de AR. Los biomarcadores adecuados de AR incluyen los biomarcadores que permiten la detección de la presencia de anticuerpos antinucleares y/o anticuerpos contra el CCP.

25 La presente invención también proporciona una matriz proteica de perlas en suspensión para el diagnóstico de AR. Esta matriz de perlas en suspensión comprende una suspensión de una o más partículas o perlas distintas, donde cada perla contiene características codificadas en relación a su tamaño, color, o señal fluorescente y donde cada perla está revestida con un biomarcador peptídico de la presente invención. Ejemplos de matrices de perlas en suspensión incluyen la matriz de perlas en suspensión thexMAP® (Luminex Corporation).

30 II – Métodos de diagnóstico

Como se ha mencionado anteriormente, los biomarcadores peptídicos desvelados en el presente documento son reconocidos específicamente por los sueros de pacientes con AR, y en particular por los sueros de pacientes con AR
35 negativos al CCP.

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar AR en un sujeto. Tales métodos comprenden poner en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto que se va a ensayar con al menos un biomarcador durante un tiempo y bajo unas condiciones que permitan que se forme el complejo biomarcador-
40 anticuerpo; y detectar cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se haya formado.

En ciertas realizaciones, el al menos un biomarcador es un péptido de PAD4 que tiene una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, análogas
45 de las mismas, y fragmentos de las mismas. En estos métodos, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos anti-PAD4 en la muestra biológica, y por lo tanto es indicativa de AR en el sujeto. Se pueden utilizar más de un péptido de PAD4 en estos métodos.

En otras realizaciones, el al menos un biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, análogas de las mismas,
50 y fragmentos de las mismas. En estos métodos, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en la muestra biológica, y por lo tanto es indicativa de AR en el sujeto. Se pueden utilizar más de un péptido de BRAF en estos métodos.

55 La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar AR en un sujeto. Tales métodos comprenden poner en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto que se va a ensayar con al menos dos biomarcadores durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme el complejo biomarcador-anticuerpo; y detectando cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se haya formado. Los al menos dos biomarcadores se pueden seleccionar de entre:
60

Péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas;

65 Péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7,

SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas, Péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas; y

5 cualquier combinación de los mismos

En este método, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de AR en el sujeto.

10 En otras realizaciones, se utilizan más de dos biomarcadores peptídicos, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 biomarcadores peptídicos. En ciertas realizaciones preferidas, se utilizan 8 biomarcadores peptídicos, es decir, tres péptidos de PAD4, tres péptidos de BRAF y dos péptidos de calpastatina. En realizaciones particularmente preferidas, los tres péptidos de PAD4 consisten en las SEC ID N°s 2-4, los tres péptidos de BRAF consisten en las SEC ID N°s 7-9 y los dos péptidos de calpastatina consisten en las SEC ID N°s 11-12.

15 **Muestras biológicas**

Los métodos de diagnóstico de la presente invención se pueden aplicar al estudio de cualquier tipo de muestra biológica permitiendo ensayar uno o más biomarcadores inventivos. Ejemplos de muestras biológicas adecuadas, incluyen, pero sin limitarse a estas, orina, sangre completa, suero, plasma, saliva, y líquido sinovial. Las muestras biológicas utilizadas en la práctica de la invención pueden ser muestras recientes o congeladas recolectadas de un sujeto, o muestras de archivo con una historia conocida del diagnóstico, tratamiento y/o resultado. Las muestras biológicas se pueden recolectar por medios no invasivos, tales como, por ejemplo, por extracción de sangre de un sujeto, o utilizando una aspiración por aguja fina o una biopsia por aguja. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra serológica y se selecciona de entre el grupo constituido por sangre completa, suero, plasma.

En realizaciones preferidas, los métodos inventivos se llevan a cabo en la muestra biológica en sí misma sin, o con un procesamiento limitado de la muestra.

30 Sin embargo, de manera alternativa, los métodos inventivos se pueden llevar a cabo sobre un extracto proteico preparado de la muestra biológica. En este caso, el extracto proteico contiene preferentemente el contenido proteico total. Los métodos de extracción de proteínas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo "Protein Methods", D.M. Bollag y col., 2ª Ed., 1996, Wiley-Liss; "Protein Purification Methods: A Practical Approach", E.L. Harris and S. Angal (Eds.), 1989; "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", S. Roe, 2ª Ed., 2001, Oxford University Press; "Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization", H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FL). Se pueden utilizar varios kits para extraer proteínas de los fluidos corporales y tejidos. Tales kits están disponibles comercialmente en, por ejemplo, BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL), e Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Las instrucciones que describen en detalle el protocolo a seguir están incluidas habitualmente en todos estos kits. La sensibilidad, el tiempo de procesamiento y los costes pueden ser diferentes de un kit a otro. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el kit(s) más adecuado(s) para una situación en particular.

45 **Detección de complejos biomarcador-anticuerpo**

Los métodos de diagnóstico de la presente invención generalmente implican la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el biomarcador peptídico y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica ensayada. En la práctica de la invención, la detección de tal complejo se puede llevar a cabo por cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratories Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY).

Por ejemplo, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo se puede llevar a cabo utilizando un inmunoensayo. Hay disponible un amplio intervalo de técnicas de inmunoensayos, incluyendo el radioinmunoensayo, inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), e inmunoprecipitación de inmunofluorescencia. Los inmunoensayos se conocen bien en la técnica. Los métodos para llevar a cabo tales ensayos así como las aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en los libros de texto. Ejemplos de tales libros de texto incluyen P. Tijssen, En: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278 y varios volúmenes de Methods in Enzymology, Eds. S.P. Colowick y col., Academic Press, que trata sobre métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121. Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos.

Por ejemplo, cualquiera de varias variaciones de la técnica de ensayo sándwich se puede utilizar para llevar a cabo un inmunoensayo. Brevemente, en un ensayo sándwich típico aplicado a la detección de, por ejemplo, autoanticuerpos anti-PAD4 de acuerdo con la presente invención, un biomarcador peptídico PAD4 no marcado se inmoviliza sobre una superficie sólida (como se ha descrito anteriormente) y la muestra biológica que se va a

ensayar se pone en contacto con el biomarcador unido durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme un complejo biomarcador-anticuerpo. Después de la incubación, se añade un anticuerpo que está marcado con un resto detectable y que reconoce específicamente anticuerpos de las especie ensayada (por ejemplo, uno anti IgG humana para sujetos humanos) y se incuba bajo condiciones que permitan la formación de un complejo ternario entre cualquier biomarcador unido al autoanticuerpo y el anticuerpo marcado. Cualquier material no unido se lava, y se determina la presencia de cualquier autoanticuerpo anti-PAD4 en la muestra por observación/detección de la señal producida directa o indirectamente por el resto detectable. Variaciones de este ensayo incluyen un ensayo, en el que tanto la muestra biológica como el anticuerpo marcador se añaden simultáneamente al biomarcador peptídico PAD4 inmovilizado.

El segundo anticuerpo (es decir, el anticuerpo añadido en un ensayo sándwich como se ha descrito anteriormente) se puede marcar con cualquier resto detectable adecuado, es decir, cualquier entidad que, por su naturaleza química, proporciona una señal identificable analíticamente que permita la detección del complejo ternario, y en consecuencia, la detección del complejo biomarcador-anticuerpo.

La detección puede ser tanto cualitativa o cuantitativa. Los métodos de marcado de moléculas biológicas tales como anticuerpos, se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", Methods in Enzymol., 1974, Vol. 34, W.B. Jakoby y M. Wilneck (Eds.), Academic Press: New York, NY; y M. Wilchek y E.A. Bayer, Anal. Biochem., 1988, 171: 1-32).

Los restos detectables que se utilizan más comúnmente en inmunoensayos son las enzimas y los fluoróforos. En el caso de inmunoensayos enzimáticos (EIA o ELISA), una enzima tal como la peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, y similares, se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Los sustratos que se utilizan con las enzimas específicas se eligen generalmente por la producción de un cambio de color detectable, por la hidrólisis de la enzima correspondiente. En el caso de inmunofluorescencia, el segundo anticuerpo se une químicamente a un resto fluorescente sin alteración de su capacidad de unión. Después de la unión del anticuerpo marcado fluorescentemente al complejo biomarcador-anticuerpo y la eliminación de cualquier material no unido, se detecta la señal fluorescente generada por el resto fluorescente y opcionalmente se cuantifica. De manera alternativa, el segundo anticuerpo se puede marcar con radioisótopo, un resto quimioluminiscente, o un resto bioluminiscente.

Diagnóstico de AR

En los métodos de la presente solicitud, la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos anti-PAD4, autoanticuerpos anti-BRAF, o autoanticuerpos anti-calpastatina en la muestra biológica ensayada y por lo tanto es indicativa de AR en el sujeto del que se obtuvo la muestra biológica. Por lo tanto, los métodos de la presente solicitud, se pueden utilizar para el diagnóstico de AR en los pacientes. En particular, los métodos de la invención se pueden utilizar para ensayar sujetos sospechosos de tener AR.

Un experto en la técnica apreciará que se puede hacer un diagnóstico de AR solamente con los resultados obtenidos por un método proporcionado en el presente documento. De manera alternativa, un médico puede también considerar otros parámetros clínicos o patológicos que se utilizan en los métodos para diagnosticar AR existentes. Por tanto, los resultados obtenidos utilizando los métodos de la presente solicitud se pueden comparar y/o combinar con los resultados de otras pruebas, ensayos o procedimientos llevados a cabo para el diagnóstico de AR. Tal comparación y/o combinación puede ayudar a proporcionar un diagnóstico más afinado.

Por ejemplo, los métodos de diagnóstico de AR de la presente solicitud se pueden utilizar en combinación con los criterios ARA (es decir, los criterios revisados en 1987 por el Colegio Americano de Reumatología para la clasificación de AR descritos en F.C. Arnett y col., Arthritis Rheum., 1988, 31: 315-324). De acuerdo con los criterios ARA, se dice que un paciente tiene AR si el paciente muestra al menos 4 de los siguientes criterios: 1) agarrotamiento matutino durante al menos 1 hora; 2) artritis de 3 o más áreas articulares; 3) artritis de articulaciones de las manos; 4) artritis simétricas; 5) nódulos reumatoides; 6) factor reumatoide sérico (RF); y 7) cambios radiográficos, donde los criterios 1-4 deben estar presentes desde hace al menos 6 meses.

De manera alternativa o adicionalmente, los resultados de los métodos de diagnóstico de AR de la presente solicitud se pueden utilizar en combinación con los resultados de uno o más ensayos que empleen otros biomarcadores de AR. Por tanto, en ciertas realizaciones, el diagnóstico de AR se puede basar en resultados de un método de la presente solicitud y en resultados de uno o más ensayos adicionales que utilicen un biomarcador de AR diferente. Por ejemplo, se puede ensayar un panel de biomarcadores de AR bien individualmente o simultáneamente, por ejemplo, utilizando una tecnología basada en perlas o un chip.

Ejemplos de biomarcadores de AR adecuados incluyen, pero no se limitan a, CCP, proteína C reactiva, amiloide A sérica, interleucina 6 (IL6), proteínas S100, osteopontina, factor reumatoide, metaloproteasa de la matriz 1 (MMP-1), metaloproteasa de la matriz 3 (MMP-3), ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis (tales como factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF), y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovia (tales como piridinolina o su forma glucosilada; desoxipiridinolina; telopéptidos entrecruzados; neoepítomos de colágeno, proteína

de la matriz oligomérica de cartílago, proteína de la capa intermedia del cartílago; matrilinas, condromodulinas, osteocalcina, y similares)

5 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención se utilizan para el diagnóstico de AR en pacientes negativos al CCP. Además, como se presenta en el presente documento en la sección de los Ejemplos, los solicitantes han demostrado, en particular, que un método de la invención que utiliza la combinación de ocho biomarcadores peptídicos (3 péptidos de PAD4, 3 péptidos de BRAF, y 2 péptidos de calpastatina) permite el diagnóstico de AR en más del 70% de sujetos negativos al CCP. Las expresiones “paciente negativo al CCP” y “sujeto negativo al CCP” se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. Se refieren a un sujeto cuyo suero no contiene anticuerpos (o al menos no anticuerpos detectables) dirigidos contra proteínas citrulinadas.

III – Kits

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo los métodos diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos diagnósticos proporcionados en el presente documento se pueden llevar a cabo en laboratorios diagnósticos, laboratorios experimentales, o por facultativos. La invención proporciona kits que se pueden utilizar en estos distintos entornos.

20 Los materiales y reactivos para detectar autoanticuerpos anti-PAD4, autoanticuerpos anti-BRAF y/o autoanticuerpos anti-calpastatina en una muestra biológica y/o para el diagnóstico de AR en un sujeto de acuerdo con la presente solicitud, se pueden incluir juntos en un kit. Cada kit de la invención comprende al menos un biomarcador peptídico inventivo preferentemente en una cantidad que sea adecuada para la detección de autoanticuerpos en una muestra biológica.

25 La presente solicitud desvela un kit que comprende al menos un péptido de PAD4 que tiene una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas.

30 En una realización, un kit inventivo comprende al menos un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos, de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas.

35 En otras divulgaciones más, un kit comprende al menos dos biomarcadores seleccionados de entre el grupo constituido por:

40 Péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas;
 Péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas,
 45 Péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos, preferentemente de menos de 50 aminoácidos, que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, análogas de las mismas y fragmentos de las mismas; y

cualquier combinación de los mismos

50 En ciertas divulgaciones, el kit comprende al menos 8 marcadores, tres péptidos de PAD4, 3 péptidos de BRAF y 2 péptidos de calpastatina, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente los tres péptidos de PAD4 consisten en las SEC ID N^{os} 2-4, los tres péptidos de BRAF consisten en las SEC ID N^{os} 7-9, y los dos péptidos de calpastatina consisten en las SEC ID N^{os} 11-12.

55 El biomarcador(es) incluido en un kit puede o no inmovilizarse en una superficie de sustrato (por ejemplo, perlas, matrices, y similares). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un kit inventivo puede incluir una matriz para diagnosticar AR como se proporciona en la presente solicitud. De manera alternativa, puede incluirse una superficie de sustrato en un kit inventivo para la inmovilización de los biomarcadores peptídicos.

60 Un kit comprende también generalmente al menos un reactivo para la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el péptido biomarcador incluido en el kit y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica. Tal reactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que reconoce específicamente anticuerpos de la especie ensayada (por ejemplo, un anti IgG humana para sujetos humanos), como se ha descrito anteriormente.

65 Dependiendo del procedimiento, el kit puede comprender además uno o más de: un tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de bloqueo, tampón y/o reactivos de inmunodetección, tampón y/o reactivos de marcado, y medios de detección. Se pueden incluir en el kit los protocolos de cómo utilizar estos tampones y

reactivos para llevar a cabo diferentes etapas del procedimiento.

Los diferentes reactivos incluidos en el kit se pueden suministrar en forma sólida (por ejemplo liofilizada) o líquida. Los kits de la presente invención pueden comprender opcionalmente diferentes envases (por ejemplo, viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o botellas) para cada tampón o reactivo individual. Cada componente generalmente será adecuado como una alícuota en su respectivo envase o se proporcionará en forma de concentrado. Se pueden proporcionar también otros envases adecuados para realizar ciertas etapas de los métodos desvelados. Los envases individuales del kit se mantienen preferentemente en un confinamiento cercano para la venta comercial.

En ciertas realizaciones, un kit contiene instrucciones de cómo utilizar sus componentes para el diagnóstico de AR en un sujeto de acuerdo con un método de la invención. Las instrucciones para utilización del kit de acuerdo con los métodos de la invención pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida del sujeto y/o para llevar a cabo el ensayo, y/o instrucciones para interpretar los resultados. Un kit puede también contener la información en la forma que prescriba la agencia gubernamental que regula la fabricación, uso y venta de productos farmacéuticos y biológicos.

IV – Desarrollo de productos terapéuticos nuevos para AR

Los epítomos de PAD4 y/o de BRAF identificados por los solicitantes pueden ser dianas atractivas para la identificación de compuestos o sustancias potencialmente útiles para tratar la AR o prevenir la progresión de AR.

Como se mencionó anteriormente, la PAD4 no solo es una diana para anticuerpos específicos en la AR, también está implicada en la generación de epítomos citrulinados. Los presentes solicitantes han demostrado que los autoanticuerpos anti-PAD4 inhiben la citrulinación del fibrinógeno por la PAD4 (véase la sección de Ejemplos). Los solicitantes también han demostrado que los anticuerpos anti-PAD4 reconocen específicamente 3 epítomos en PAD4, 2 de los cuales (péptidos **61** y **63**) se localizan en el dominio de unión al sustrato de PAD4. Evitando la unión de los autoanticuerpos anti-PAD4 a estos epítomos de PAD4 podría revertirse la acción inhibitoria de los autoanticuerpos y restaurar la actividad enzimática de PAD4.

La BRAF es una diana interesante para los anticuerpos. La BRAF es una serina-treonina quinasa implicada en la transducción de señales mitógenicas desde la membrana al núcleo. La BRAF regula la cascada de señalización de las proteína quinasa activadas por mitógeno (MAPK). Las MAPK también tienen un papel en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6). Para ensayar si los autoanticuerpos contra BRAF pueden influenciar la actividad de BRAF como quinasa, los solicitantes han desarrollado un ensayo de fosforilación utilizando BRAF, MEK1 (su principal sustrato) y autoanticuerpos BRAF purificados de sueros de pacientes con AR; y han descubierto que el 80% de los autoanticuerpos anti BRAF activan la fosforilación *in vitro* de MEK1 por la BRAF. Este resultado sugiere que los anticuerpos anti-BRAF podían activar la ruta de la MAP quinasa por medio de BRAF, dando lugar a la producción de citoquinas pro-inflamatorias y a la inflamación articular. Los solicitantes también han demostrado que los autoanticuerpos anti-BRAF reconocen específicamente 3 epítomos en la BRAF (péptidos **P10**, **P16** y **P25**). Por lo tanto los anticuerpos anti-BRAF pueden constituir una diana para el control de la inflamación en AR.

Por lo tanto, se pueden desarrollar exploraciones para identificar compuestos o sustancias que eviten la unión de los autoanticuerpos anti-PAD4 a epítomos PAD4, en particular al péptido **61** y/o péptido **63**. De manera similar, se pueden desarrollar exploraciones para identificar compuestos o sustancias que eviten la unión de autoanticuerpos anti-BRAF a epítomos BRAF, en particular a los péptidos **P10**, **P16** y/o **P25**.

Tales exploraciones se pueden llevar a cabo en cualquier sistema biológico adecuado tal como un fluido biológico, o células aisladas. Generalmente, las exploraciones se llevan a cabo utilizando células que pueden cultivarse en equipos de cultivo tisular de referencia. Las células adecuadas incluyen todas las células apropiadas normales o transformadas derivadas de cualquier fuente reconocida. Preferentemente, las células son de origen mamífero (humanas o animales, tales como de roedor o simio). Más preferentemente, las células son de origen humano. Las células mamíferas pueden ser de cualquier origen tisular u orgánico (por ejemplo, hueso, cartílago, o líquido sinovial) y de cualquier tipo celular siempre y cuando las células expresen PAD4 y/o PAD4. Las células que se utilizan en la práctica de los métodos de la presente invención pueden ser células primarias, células secundarias, o células inmortalizadas (por ejemplo, líneas celulares establecidas). Se pueden preparar por técnicas bien conocidas en la técnica (por ejemplo, las células se pueden aislar de hueso, cartílago o líquido sinovial) o se pueden obtener de fuentes comerciales inmunológicas y microbiológicas (por ejemplo, de la colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA). De manera alternativa o adicional, las células se pueden modificar genéticamente para contener, por ejemplo, un gen de interés. Un ensayo desarrollado para una selección primaria de fármacos (es decir, una selección en primera ronda) se lleva a cabo preferentemente utilizando líneas celulares establecidas, que están disponibles comercialmente y normalmente son relativamente fáciles de cultivar, aunque el ensayo que se usa más tarde en el proceso de desarrollo de fármacos se lleva a cabo, preferentemente utilizando células primarias y secundarias, que generalmente son más difíciles de obtener, manteniendo y/o cultivando células inmortalizadas pero que representan mejores modelos experimentales para la situación *in vivo*. Los métodos de selección se pueden llevar a cabo utilizando células contenidas en una pluralidad de pocillos de una placa de ensayo multi-pocillo.

Como apreciará un experto habituado en la técnica, se puede explorar cualquier tipo de compuesto o agente. Un compuesto candidato puede ser un compuesto sintético o natural; puede ser una molécula única o una mezcla o complejo de diferentes moléculas. Los compuestos candidatos pueden explorarse individualmente. De manera alternativa, los compuestos comprendidos en colecciones o bibliotecas se pueden explorar simultáneamente.

Las colecciones de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles en, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) or MycoSearch (Durham, NC). Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), Microsource (New Milford, CT), y Aldrich (Milwaukee, WI). También se han desarrollado bibliotecas de compuestos candidatos y están disponibles comercialmente en grandes compañías químicas, que incluyen, por ejemplo, Merck, Glaxo Wellcome, Bristol-Meyers-Squibb, Novartis, Monsanto/Searle, y Pharmacia UpJohn. Además, las colecciones naturales, las bibliotecas producidas sintéticamente y los compuestos se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Las bibliotecas químicas son relativamente fáciles de preparar por síntesis automática tradicional, PCR, clonación o métodos sintéticos propios (véase, por ejemplo, S.H. DeWitt y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 1993, 90:6909-6913; R.N. Zuckermann y col., J. Med. Chem. 1994, 37: 2678-2685; Carell y col., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33: 2059-2060; P.L. Myers, Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8: 701-707).

Utilizando el péptido **61** y/o el péptido **63** de PAD4 o el péptido **P10**, péptido **P16** y/o el péptido **P25** de BRAF como diana(s), se pueden encontrar agentes útiles para el tratamiento de AR en una gran variedad de clases de productos químicos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos de hacer y practicar la presente invención. Sin embargo, se debería entender que los ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no significa que limiten el ámbito de la invención. Además, a menos que la descripción de un Ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, como el resto de la especificación, no pretende sugerir que los experimentos se hayan llevado a cabo o se hayan obtenido realmente los datos.

Algunos de los resultados presentados posteriormente fueron presentados por los presentes solicitantes en un artículo científico (Auger y col., Ann. Rheum. Dis., 2009, 68: 591-594).

35 Ejemplo 1: Péptidos de PAD4 para el diagnóstico de AR

Pacientes y métodos

Pacientes de AR y controles

Los pacientes de AR se seleccionaron del Ala de Reumatología del Hospital La Concepción de Marsella, Francia. Estos pacientes cumplían los criterios de 1987 del Colegio Americano de Reumatología para AR (F.C. Arnett y col., Arthritis Rheum., 1988, 31: 315-324). Los pacientes con espondiloartropatía (AS) eran del Ala de Reumatología del Hospital La Concepción de Marsella. Sirvieron como controles normales los voluntarios del personal del laboratorio y del Centro de Transfusión de Sangre de Marsella. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Purificación de Autoanticuerpos contra PAD4

Las placas de ELISA se revistieron con 1 µg de PAD4 por pocillo durante una noche a 4 °C, utilizando proteína recombinante PAD4 (Abnova Corporation, H0023569P01). Se seleccionaron los sueros de 29 pacientes de AR y 2 de dos controles que contenían autoanticuerpos contra PAD4 (I. Auger y col., Ann. Rheum. Dis., 2008 Oct 28). Los sueros se diluyeron a 1:2 en PBS y se incubaron durante 3 horas. Después de lavarse, se purificaron los autoanticuerpos contra PAD4 en PBS a pH 2, se neutralizaron en tampón Tris 1 M, y se cuantificaron. La presencia de autoanticuerpos anti-PAD4 se confirmó por transferencia puntual.

Ensayo de Citrulinación en el laboratorio

Se incubó Fibrinógeno humano (Sigma) con una concentración final de 10 mg/ml con 1 µg de PAD4 (Abnova Corporation) en tampón de trabajo (Tris HCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, pH 7,5) en presencia de 1 µg de autoanticuerpos purificados contra PAD4, durante 4 horas a 55 °C. Se incluyó un control positivo para cada paciente (incubación de fibrinógeno con PAD4 en tampón de trabajo en presencia de 1 µg de autoanticuerpos de control anti C1 o C2). Cada mezcla de reacción se incubó dos veces con perlas de sefrosa proteína A para eliminar anticuerpos.

Cada mezcla de reacción se revistió entonces en placas ELISA por duplicado y se bloqueó con PBS que contenía un 5% de leche. Para detectar la citrulinación del fibrinógeno, se utilizó un suero que contenía autoanticuerpos contra

fibrinógeno citrulinado pero no anticuerpos contra PAD4. Después de lavar con Tween 20 al 0,1%, se añadió un anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Sigma, Francia). Se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm. Se determinó la activación o inhibición de la citrulinación por la PAD4 calculando la relación de la DO medida para la muestra de ensayo entre la DO medida para el control positivo. Una relación > 1 indicaba activación, una relación < 1 indicaba inhibición.

Péptidos sintéticos

Los péptidos (Neosystem, Strasbourg, Francia) se sintetizaron utilizando un sistema en fase sólida y se purificaron. Un total de 65 péptidos de 20 aminoácidos solapantes sobre 10 aminoácidos derivados de PAD4 (locus NM_012387), restos 1 a 663.

Mapeado de Péptidos de PAD4

Las placas se revistieron durante una noche con 10 µg/pocillo de péptidos de PAD4 diluidos en tampón salino de fosfato (PBS), pH 7,4. Se bloquearon las placas con PBS que contenía un 5% de leche. Se incubó el suero diluido a 1:100 en PBS durante 2 horas. Después de lavarlos con Tween 20 al 0,1%, se añadió un anti-IgG humano conjugado con peroxidasa. Se leyó la densidad óptica a 405 nm. La DO de fondo se obtuvo añadiendo cada suero a un pocillo sin péptidos. Los sueros positivos se definieron como un valor de DO de más de dos veces la DO de fondo (I Auger y col., Ann. Rheum. Dis., 2007, 66: 1588-1593).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores de p utilizando el ensayo Chi cuadrado.

Resultados

Inhibición de la Citrulinación del Fibrinógeno por los autoanticuerpos contra PAD4

Para ensayar si los anticuerpos dirigidos contra PAD4 interfieren la actividad de PAD4, se analizó la citrulinación del fibrinógeno en presencia de los autoanticuerpos anti-PAD4 purificados de 29 pacientes y 2 controles sanos. La detección de citrulinación se cuantificó después por ELISA.

Se observó la inhibición de la citrulinación del fibrinógeno en 22 de los 31 autoanticuerpos purificados contra PAD4; se observó la activación de la citrulinación del fibrinógeno en 6 de los 31 autoanticuerpos purificados contra PAD4; y se encontró que 3 de los 31 autoanticuerpos purificados contra PAD4 no tenían efecto sobre la citrulinación de fibrinógeno (Figura 1).

Cuatro Epítomos lineales de PAD4 son reconocidos por Autoanticuerpos contra PAD4

Para identificar los epítomos para células B en PAD4, se sintetizaron los 65 péptidos de 20 aminoácidos solapantes que englobaban la secuencia completa de la PAD4 humana. Estos péptidos se exploraron con los sueros de 29 pacientes de AR y 2 controles que se sabía que contenían autoanticuerpos anti-PAD4.

Entre los 65 péptidos, 18 fueron reconocidos por los sueros ensayados. Diez (10) de estos péptidos se localizaron en el dominio del extremo N y los otros 8 péptidos se localizaron en el dominio del extremo C. Cuatro péptidos (**22**, **28**, **61** y **63**) fueron reconocidos preferencialmente por los sueros de pacientes con AR y los controles (Tabla 1). Además, 15 de los 31 sueros de los pacientes de AR eran positivos al péptido **22**, 25 de los 31 eran positivos al péptido **28**, 8 de los 31 eran positivos para el péptido **61**, y 16 de los 31 eran positivos para el péptido **63**. Los péptidos **22** y **28** se localizaban en el dominio del extremo N de PAD4, mientras que los péptidos **61** y **63** estaban localizados en el dominio del extremo C de PAD4.

Tres epítomos lineales de PAD4 se asocian con pacientes con AR

Para confirmar la reactividad observada, se ensayaron los sueros de 33 pacientes con espondiloartropatía (AS) y 33 individuos sanos por ELISA utilizando los péptidos **22**, **28**, **61** y **63** como inmunoabsorbentes.

Tabla 1. Unión de péptidos PAD4 a autoanticuerpos anti-PAD4 (en gris: péptido positivo).

Sujetos	Péptidos PAD4																		
	Extremo N									Extremo C									
	5	9	15	16	18	22	25	26	27	28	33	49	51	59	61	62	63	64	
I	AR1																		
	AR2																		
	AR3																		
	AR4																		
	AR5																		
	AR6																		
	AR7																		
	AR8																		
	AR9																		
	AR10																		
	AR11																		
	AR12																		
	AR13																		
	AR14																		
	AR15																		
	AR16																		
	AR17																		
	AR18																		
	AR19																		
	AR20																		
0	AR21																		
	AR22																		
	AR23																		
A	AR24																		
	AR25																		
	AR26																		
	AR27																		
	AR28																		
	AR29																		
I	CTL1																		
	CTL2																		

I = Inhibición de la citrulinación de fibrinógeno por PAD4; 0 = sin efecto sobre la citrulinación de fibrinógeno por PAD4; A = activación de la citrulinación de fibrinógeno por PAD4

Los autoanticuerpos contra el péptido 22, el péptido 61 y el péptido 63 se encontraron en más pacientes de AR que en los controles (Figura 2). Además, 15 de los 29 pacientes de AR eran positivos para el péptido 22 frente a 7 de los 66 controles ($p = 0$ por el ensayo Chi cuadrado). De forma similar, 8 de 29 pacientes de AR eran positivos al péptido 61 frente a ninguno de los 66 controles ($p = 0$ por el ensayo Chi cuadrado). Finalmente, 15 de los 29 pacientes de AR eran positivos al péptido 63 frente a 6 de los 66 controles ($p = 0$ por el ensayo Chi cuadrado).

Los autoanticuerpos contra el péptido 28 se encontraron en altos porcentajes en los controles. Además 24 de los 29 pacientes eran positivos frente a 20 de los 33 pacientes de AS y 10 de los 33 individuos sanos ($p = 0,002$ por el

ensayo Chi cuadrado, 29 pacientes frente a 66 controles).

Reconocimiento de péptidos por autoanticuerpos contra PAD4 e inhibición de la citrulinación por PAD4

- 5 Se analizó el patrón de péptidos de autoanticuerpos contra PAD4 que inhiben (pacientes AR1 a AR20), que activan (pacientes AR24 a AR29), o que no tienen efecto (pacientes AR21 a AR23) sobre la citrulinación por PAD4.

10 No se observó ninguna diferencia en el número de péptidos que reconocían los autoanticuerpos que se sabía que inhibían o activaban PAD4 (Tabla 2). Sin tener en cuenta su acción (activación o inhibición), la mayoría de los autoanticuerpos contra PAD4 reconocían péptidos localizados en el dominio del extremo N y en el dominio del extremo C. Entre los anticuerpos contra PAD4 que inhibían PAD4, 5 de los 20 reconocían exclusivamente péptidos localizados en el dominio del extremo N, 1 de 20 reconocían exclusivamente péptidos localizados en el dominio del extremo C y 14 de 20 reconocían péptidos localizados en el dominio del extremo N y en el dominio del extremo C (Figura 3).

15 Entre los anticuerpos contra PAD4 que no tienen efecto sobre la citrulinación por PAD4, 3 de los 3 reconocían péptidos localizados en el dominio del extremo N y en el dominio del extremo C.

20 Entre los autoanticuerpos contra PAD4 que activan PAD4, 1 de 6 reconocen exclusivamente los péptidos localizados en el dominio del extremo N, ninguno de los 5 reconocían los péptidos localizados en el dominio del extremo C, y 3 de los 6 reconocían los péptidos localizados en el dominio del extremo N y en el dominio del extremo C.

25 Los péptidos **22** y **61** fueron reconocidos preferencialmente por los autoanticuerpos contra PAD4 que inhiben PAD4 (Figura 4). Además, 12 de 20 autoanticuerpos contra PAD4 que inhiben PAD4 eran positivos al péptido **22** en comparación con 2 de los 5 autoanticuerpos contra PAD4 que activan PAD4. Además el péptido **61** era reconocido por 6 de los 20 autoanticuerpos contra PAD4 que inhiben PAD4 frente a ninguno de los 6 autoanticuerpos contra PAD4 que activan PAD4. Sin embargo, se encontró que entre los autoanticuerpos contra PAD4 que no tenían efecto sobre la citrulinación de PAD4, 2 de 3 reconocían el péptido **61**.

30 Conclusiones

35 Utilizando matrices proteicas y ensayos ELISA, los presentes solicitantes habían encontrado anteriormente que la PAD4 es un autoantígeno en pacientes con AR. Los autoanticuerpos contra PAD4 ya se habían descrito en la AR. La PAD4 está implicada en la generación de epítomos citrulinados. Los autoanticuerpos contra los epítomos citrulinados son altamente específicos de AR. La presencia de estos autoanticuerpos antes de la aparición de AR sugiere un papel potencial en la patofisiología de la enfermedad.

40 El estudio presentado en el presente documento se sometió a un ensayo para ver si los autoanticuerpos contra PAD4 interfieren con la actividad de PAD4. Los solicitantes han desarrollado un ensayo de citrulinación casero con PAD4, fibrinógeno y autoanticuerpos contra PAD4 purificados a partir de sueros de pacientes con AR. Como regla general, se observó que los autoanticuerpos contra PAD4 inhiben la citrulinación del fibrinógeno por la PAD4. Además, se encontró que 22 de los 31 autoanticuerpos purificados contra PAD4 inhibían la citrulinación de fibrinógeno por la PAD4.

45 Con el fin de identificar los epítomos reconocidos por autoanticuerpos contra PAD4, se utilizaron 65 péptidos de 20 aminoácidos que englobaban la secuencia completa de PAD4 en un ensayo ELISA directo. Se encontró que los autoanticuerpos contra PAD4 reconocen cuatro epítomos principales: el péptido **22** (que corresponde con los restos de aminoácidos 211-230 de la PAD4 humana); el péptido **28** (restos de aminoácidos 271-290); péptido **61** (restos de aminoácidos 601-620) y péptido **63** (restos de aminoácidos 621-640). Los péptidos **22** y **28** se localizan en el dominio del extremo N de PAD4 (que engloba los restos de aminoácidos 1-300), mientras que los péptidos **61** y **63** se localizan en el dominio del extremo C de PAD4 (que engloba los restos de aminoácidos 301-663). Los autoanticuerpos que reconocen los péptidos **22**, **61** y **63** se encontraron en un alto porcentaje en pacientes con AR en comparación con los controles.

55 Se han identificado cinco motivos de unión al Ca^{2+} en PAD4, tres están en el dominio del extremo N y dos están en el dominio del extremo C (K Arita y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 10: 5291-5296; K Arita y col., Natl. Struct. Mol. Biol., 2004, 11: 777-783). El dominio del extremo N parece que está implicado en cambios conformacionales mediados por el Ca^{2+} . Después de unirse al Ca^{2+} , los cambios conformacionales generan una hendidura activa y el sustrato se une a la PAD4. El dominio del extremo N puede tener también influencia en la actividad enzimática de la PAD4. Además, el gen PADI4 presenta dos haplotipos principales. En algunas poblaciones, uno es susceptible a AR y en la otra no es susceptible a AR. Estos dos haplotipos contienen cuatro polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) en exones del dominio del extremo N (posiciones 55, 82, 112, y 117). El dominio del extremo C contiene el dominio de unión al sustrato y el dominio catalítico.

65 En 2008, Harris y col., mapearon los epítomos de PAD4 por inmunoprecipitación de truncamientos de PAD4 traducidas in vitro con anticuerpos contra PAD4 (M.L. Harris y col., Arthritis Rheum., 2008, 58(7): 1958-1967). Se

identificaron dos tipos de suero. Se descubrió que los sueros tipo I reconocían exclusivamente la PAD4 de longitud completa (1-663) y se descubrió que los sueros tipo dos reconocían tanto la de longitud completa (1-663) como la PAD4 truncada (1-523). Los autoanticuerpos tipo II contra PAD4 necesitan contribuciones exclusivamente del dominio del extremo N de PAD4 (1-119). Sin embargo, los autoanticuerpos tipo I contra PAD4 necesitan contribuciones del dominio del extremo N (1-119) y del dominio del extremo C (523-663) de PAD4.

En las matrices proteicas y en los ensayos ELISA llevados a cabo por los presentes solicitantes, cada autoanticuerpo contra PAD4 reconocían la PAD4 de longitud completa (1-663) (I Auger y col., Ann. Rheum. Dis., 2008 Oct. 28). Entre los autoanticuerpos contra PAD4 de pacientes con AR, solamente 3 de 29 reconocían la PAD4 truncada (restos 1 a 111) (datos no mostrados). En el extenso ensayo de péptidos, 7 de los 29 autoanticuerpos contra PAD4 reconocían exclusivamente los péptidos localizados en el dominio del extremo N (211-290) de PAD4. Uno de 29 autoanticuerpos contra PAD4 reconocían exclusivamente los péptidos localizados en el dominio del extremo C (611-630). Finalmente, se descubrió que 19 de 29 autoanticuerpos contra PAD4 reconocían los péptidos localizados en el dominio del terminal N (211-290) y el dominio del extremo C (601-650).

Se descubrió que la mayoría de los autoanticuerpos contra PAD4 inhiben la citrulinación del fibrinógeno por PAD4. La mayoría de los autoanticuerpos reconocen péptidos localizados en el dominio del extremo N (principalmente el péptido **22** o el péptido **28**) y el dominio del extremo C (principalmente el péptido **61** y el péptido **63**). Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los solicitantes proponen el siguiente modelo para explicar cómo los autoanticuerpos contra PAD4 inhiben la citrulinación (Figura 5): la interacción de los autoanticuerpos con el péptido **22** o el péptido **28** pueden interferir con los cambios conformacionales mediados por la unión con el Ca^{2+} . La unión con el calcio y la unión al sustrato son importantes para generar el sitio activo en PAD4 (K Arita y col., Nat. Struct. Mol. Biol., 2004, 11: 777-783). También es posible que debido a que los autoanticuerpos contra PAD4 se unen a 40 aminoácidos en el dominio del extremo C de PAD4, se bloquee la interacción de PAD4 y su sustrato. Esto puede explicar por qué los autoanticuerpos contra PAD4 inhiben la citrulinación mediada por PAD4.

Aún queda por aclarar cómo puede influir esta inhibición en el desarrollo de la inmunización anti-citrulina en los pacientes con AR. Los solicitantes están en proceso de estudio de esta cuestión.

Ejemplo II: Péptidos de BRAF para el diagnóstico de AR en negativos al CCP

Pacientes y Métodos

Pacientes de AR y Controles

Se seleccionaron 118 pacientes con AR del Ala de Reumatología del Hospital La Concepción, Marsella, Francia. Estos pacientes cumplían con los criterios de 1987 del Colegio Americano de Reumatología para la AR. Para todos los pacientes se obtuvo el genotipo HLA-DR y la titulación anti CCP. 89 de los 118 pacientes de AR eran positivos al CCP y 20 eran negativos al CCP. Se utilizaron como controles pacientes (33) con espondiloartropatía (AS) del mismo hospital en Marsella y voluntarios sanos (60) del personal de INSERM UMR639 y del centro de Transfusión de Sangre de Marsella.

Péptidos sintéticos

Se sintetizaron cuarenta péptidos de 20 aminoácidos que englobaban los restos 416 a 766 de BRAF (locus NP_004324.1) utilizando un sistema en fase sólida y se purificaron (Neosystem, Strasbourg, Francia). La secuencia de BRAF utilizada para la síntesis de péptidos presentaba un polimorfismo en la posición 599 (V599E, valina sustituida por glutamato), una mutación que se observa en cánceres humanos y que se asocia con un aumento de la actividad quinasa.

Detección de Autoanticuerpos por ELISA

Se recubrieron las placas durante una noche con 10 μg /pocillo de péptido diluido en tampón salino fosfato (PBS), pH 7,4. Las placas se bloquearon con PBS que contenía un 5% de leche. Los sueros diluidos a 1:100 en PBS se incubaron durante 2 horas. Después de lavarlos con Tween 20 al 0,1%, se añadió un anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Sigma, Francia). Se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm. La DO de fondo se obtuvo añadiendo cada suero a un pocillo en ausencia de proteína. Un suero positivo se definió como el que presentaba un valor de DO de más de dos veces la DO de fondo.

Análisis estadístico

Los valores de p se calcularon utilizando el ensayo Chi cuadrado.

Resultados***Autoanticuerpos contra BRAF que reconocen 4 epítomos lineales en BRAF***

- 5 Para identificar los epítomos para células B en BRAF, se sintetizaron 40 péptidos de 20 aminoácidos que englobaban el dominio catalítico de BRAF. Estos 40 péptidos se exploraron con los sueros de 21 pacientes de AR que se sabía que contenían autoanticuerpos contra BRAF. Entre los 40 péptidos, 14 fueron reconocidos por los sueros ensayados. Los sueros de pacientes con AR reconocieron preferencialmente cuatro péptidos, **P10** (SEC ID N° 7, posiciones 506-525 de la BRAF humana,), **P16** (SEC ID N° 8, posiciones 566-585 de la BRAF humana,), **P25** (SEC ID N° 9, posiciones 656-675 de la BRAF humana), y **P33** (SEC ID N° 13). Además, 18 de 21 sueros reconocieron al **P10**, 8 reconocían al **P16**, 15 reconocían al **P25**, y 6 reconocían al **P33** (véase la Tabla 2).

Tres epítomos lineales en la BRAF son reconocidos por los pacientes con AR

- 15 Para confirmar la reactividad observada, los solicitantes ensayaron por ELISA los sueros de 33 pacientes con espondilopatía (AS) y de 60 individuos sanos en presencia de **P10**, **P16**, **P25** y **P33**. Se encontraron autoanticuerpos contra **P10**, **P16** y **P25** en los pacientes con AR más a menudo que en los controles (véase Figura 6). Además, los sueros de 18 de 21 pacientes con AR reconocían al **P16** frente a 10 de 93 controles ($p < 10^{-7}$ por el ensayo Chi cuadrado). De manera similar, los sueros de 8 de 21 pacientes con AR reconocían al **P16** frente a 1/93 controles ($p < 10^{-7}$ por el ensayo Chi cuadrado). Finalmente, los sueros de 15 de 21 pacientes reconocían al **P25** frente a 0/93 controles ($p < 10^{-7}$ por el ensayo Chi cuadrado). Los anticuerpos contra **P33** eran menos específicos de AR. 6 de 21 pacientes con AR, pero también 6/33 pacientes con AS y 13/60 individuos sanos tenían anticuerpos anti **P33** ($p = 0,523$ por el ensayo Chi cuadrado, en 21 pacientes de AR frente a 93 controles).

Tabla 2. Unión de los péptidos de BRAF a autoanticuerpos anti-BRAF (en gris: péptidos positivos)

	Pacientes con AR																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
P1																					
P2																					
P3																					
P4																					
P5																					
P6																					
P7																					
P8																					
P9																					
P10																					
P11																					
P12																					
P13																					
P14																					
P15																					
P16																					
P17																					
P18																					
P19																					
P20																					
P21																					
P22																					
P23																					
P24																					
P25																					
P26																					
P27																					
P28																					
P29																					
P30																					
P31																					
P32																					
P33																					
P34																					
P35																					
P36																					
P37																					
P38																					
P39																					
P40																					

Los péptidos P10, P16 y P25 Identifican la AR en el 50% de los pacientes negativos a CCP

La frecuencia de sueros positivos en pacientes positivos al CCP y negativos al CCP se calculó por ELISA utilizando los péptidos P10, P16 y P25 como inmunoabsorbentes. Entre los pacientes positivos al CCP, 29/89 reconocían el

P10, 7/89 reconocían el **P16**, y 17/89 reconocían el **P25**. Entre los pacientes negativos al CCP, 13/29 reconocían el **P10**, 1/29 reconocían el **P16**, y 8/29 reconocía el **P25**. En combinación, el **P10**, **P16** y **P25** identificaban el 50% de pacientes negativos al CCP (Figura 7).

5 **Conclusiones**

Se han identificado tres péptidos lineales en BRAF reconocidos casi únicamente por los pacientes con AR. Los péptidos **P10** (SEC ID N° 7), **P16** (SEC ID N° 8) y **P25** (SEC ID N° 9) están localizados en el dominio catalítico de BRAF. Estos péptidos también eran reconocidos por sueros de pacientes negativos al CCP. La combinación de **P10**, **P16** y **P25** de BRAF identifica el 50% de pacientes negativos al CCP.

Ejemplo III: Biomarcadores para el diagnóstico de AR en pacientes negativos al CCP

Pacientes y Métodos

Pacientes con AR y Controles

Más de cien (118) pacientes con AR se seleccionaron en el Ala de Reumatología del Hospital de La Concepción, Marsella, Francia, como se ha descrito anteriormente. También se ensayaron cien controles (pacientes con espondiloartropatía (AS) del Ala de Reumatología del Hospital La Concepción, Marsella, y voluntarios del personal del INSERM UMR639 y el Centro de Transfusión de Sangre de Marsella).

Péptidos sintéticos

Se sintetizaron sesenta y cinco péptidos de 20 aminoácidos que englobaban los restos 1 a 663 de la PAD4 tipo silvestre (NM_012387), 40 péptidos de 20 aminoácidos que englobaban los restos 416 a 766 de BRAF (NP_004324.1) utilizando el sistema en fase sólida y se purificaron (Neosystem, Strasbourg, Francia). Se utilizaron noventa y cuatro péptidos de 15 aminoácidos derivados de la isoforma A de calpastatina (locus NP_001035908), restos 1-708.

En particular, los péptidos de PAD4: **22** (SEC ID N° 2), **61** (SEC ID N° 3) y **63** (SEC ID N° 4) son péptidos de 20 aminoácidos del locus NM_012387. Los péptidos de BRAF **P10** (SEC ID N° 7), **P16** (SEC ID N° 8) y **P25** (SEC ID N° 9) son péptidos de 20 aminoácidos del locus NP_004324.1. Los péptidos de Calpastatina **P'16** (SEC ID N° 11) y **P'28** (SEC ID N° 12) son péptidos de 15 aminoácidos del locus NP_001741.

Detección de autoanticuerpos por ELISA

El procedimiento utilizado es idéntico al que se describe en el Ejemplo II.

Análisis estadístico

Los valores de p se calcularon utilizando el ensayo Chi cuadrado.

Resultados

Ocho péptidos (3 péptidos de PAD4, 3 péptidos de BRAF y 2 péptidos de Calpastatina) son reconocidos por pacientes con AR.

Los solicitantes han identificado tres péptidos lineales en PAD4 que son reconocidos preferencialmente por los sueros de los pacientes con AR: los péptidos **22**, **61** y **63**; tres péptidos lineales en BRAF que son reconocidos casi exclusivamente por pacientes con AR: **P10**, **P16**, **P25**; y dos péptidos lineales en la calpastatina que se asocian preferencialmente con pacientes con AR: **P'16** y **P'28** (véase la Figura 9).

Los ocho péptidos son reconocidos por pacientes negativos al CCP

Estos 8 péptidos fueron reconocidos por los sueros de pacientes negativos al CCP (véase la Figura 10). Los enlazadores más eficaces son el **P10** de BRAF y el **P'28** de calpastatina. El **P10** de BRAF es reconocido por el 44% de pacientes negativos al CCP y el **P'28** de calpastatina por el 34% de pacientes negativos al CCP.

La combinación de péptidos de PAD4, BRAF y Calpastatina reconoce la AR en el 72% de los pacientes negativos al CCP

Para un autoantígeno, la mejor combinación para identificar pacientes negativos al CCP es la de péptidos de BRAF. La combinación de **P10**, **P16** y **P25** de BRAF identifica al 50% de pacientes negativos al CCP. Para dos autoantígenos, la combinación de péptidos de BRAF y Calpastatina identifica el 69% de los pacientes negativos al CCP. Finalmente, la combinación de péptidos de PAD4, BRAF y calpastatina identifica el 72% de pacientes

negativos al CCP.

Conclusiones

- 5 Los presentes solicitantes han descubierto 8 péptidos (3 péptidos de PAD4, 3 péptidos de BRAF y 2 péptidos de calpastatina) que permiten la identificación del 72% de pacientes negativos al CCP.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> INSERM Auger, Isabelle
<120> BIOMARCADORES, MÉTODOS Y KITS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE
<130> BCT100057QT
15 <150> EP 09 305 266.1
<151> 30-03-2009
<150> EP 09 306 063.0
20 <151> 06-11-2009
<160> 12
<170> PatentIn versión 3.3
25 <210> 1
<211> 663
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 1

ES 2 483 724 T3

Met Ala Gln Gly Thr Leu Ile Arg Val Thr Pro Glu Gln Pro Thr His
 1 5 10 15

Ala Val Cys Val Leu Gly Thr Leu Thr Gln Leu Asp Ile Cys Ser Ser
 20 25 30

Ala Pro Glu Asp Cys Thr Ser Phe Ser Ile Asn Ala Ser Pro Gly Val
 35 40 45

Val Val Asp Ile Ala His Ser Pro Pro Ala Lys Lys Lys Ser Thr Gly
 50 55 60

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

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

Tyr Gly Pro Lys Thr Pro Pro Val Lys Ala Leu Leu Tyr Leu Thr Ala
 100 105 110

Val Glu Ile Ser Leu Cys Ala Asp Ile Thr Arg Thr Gly Lys Val Lys
 115 120 125

Pro Thr Arg Ala Val Lys Asp Gln Arg Thr Trp Thr Trp Gly Pro Cys

ES 2 483 724 T3

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

ES 2 483 724 T3

370																			
Met 385	Gly	Pro	Asp	Phe	Gly 390	Tyr	Val	Thr	Arg	Gly 395	Pro	Gln	Thr	Gly	Gly 400				
Ile	Ser	Gly	Leu	Asp 405	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu 410	Glu	Val	Ser	Pro	Pro	Val 415				
Thr	Val	Arg	Gly 420	Lys	Glu	Tyr	Pro	Leu 425	Gly	Arg	Ile	Leu	Phe 430	Gly	Asp				
Ser	Cys	Tyr 435	Pro	Ser	Asn	Asp	Ser 440	Arg	Gln	Met	His	Gln 445	Ala	Leu	Gln				
Asp	Phe 450	Leu	Ser	Ala	Gln	Gln 455	Val	Gln	Ala	Pro	Val 460	Lys	Leu	Tyr	Ser				
Asp 465	Trp	Leu	Ser	Val	Gly 470	His	Val	Asp	Glu	Phe 475	Leu	Ser	Phe	Val	Pro 480				
Ala	Pro	Asp	Arg	Lys 485	Gly	Phe	Arg	Leu	Leu 490	Leu	Ala	Ser	Pro	Arg 495	Ser				
Cys	Tyr	Lys	Leu 500	Phe	Gln	Glu	Gln	Gln 505	Asn	Glu	Gly	His	Gly 510	Glu	Ala				
Leu	Leu 515	Phe	Glu	Gly	Ile	Lys	Lys 520	Lys	Lys	Gln	Gln	Lys 525	Ile	Lys	Asn				
Ile 530	Leu	Ser	Asn	Lys	Thr	Leu 535	Arg	Glu	His	Asn	Ser 540	Phe	Val	Glu	Arg				
Cys 545	Ile	Asp	Trp	Asn	Arg 550	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg 555	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala 560				
Glu	Ser	Asp	Ile	Ile 565	Asp	Ile	Pro	Gln	Leu 570	Phe	Lys	Leu	Lys	Glu 575	Phe				
Ser	Lys	Ala	Glu 580	Ala	Phe	Phe	Pro	Asn 585	Met	Val	Asn	Met	Leu 590	Val	Leu				
Gly	Lys	His 595	Leu	Gly	Ile	Pro	Lys 600	Pro	Phe	Gly	Pro	Val 605	Ile	Asn	Gly				
Arg	Cys	Cys	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Cys	Ser	Leu	Leu	Glu	Pro	Leu	Gly				

610

615

620

Leu Gln Cys Thr Phe Ile Asn Asp Phe Phe Thr Tyr His Ile Arg His
625 630 635 640

Gly Glu Val His Cys Gly Thr Asn Val Arg Arg Lys Pro Phe Ser Phe
645 650 655

Lys Trp Trp Asn Met Val Pro
660

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Val Arg Val Phe Gln Ala Thr Arg Gly Lys Leu Ser Ser Lys Cys Ser
1 5 10 15

Val Val Leu Gly
20

10

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 3

Pro Phe Gly Pro Val Ile Asn Gly Arg Cys Cys Leu Glu Glu Lys Val
1 5 10 15

Cys Ser Leu Leu
20

20

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

25

<400> 4

Glu Pro Leu Gly Leu Gln Cys Thr Phe Ile Asn Asp Phe Phe Thr Tyr
1 5 10 15

His Ile Arg His
20

30

<210> 5
<211> 40

ES 2 483 724 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

5
Pro Phe Gly Pro Val Ile Asn Gly Arg Cys Cys Leu Glu Glu Lys Val
1 5 10 15
Cys Ser Leu Leu Glu Pro Leu Gly Leu Gln Cys Thr Phe Ile Asn Asp
20 25 30
Phe Phe Thr Tyr His Ile Arg His
35 40

<210> 6
<211> 766
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

10

Met	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Ala	Leu	Phe	Asn	Gly	Asp	Met	Glu	Pro	Glu	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly
			20					25					30		
Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Asp	Pro	Ala	Ile	Pro	Glu	Glu	Val	Trp
		35					40					45			
Asn	Ile	Lys	Gln	Met	Ile	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	His	Ile	Glu	Ala	Leu
	50					55					60				
Leu	Asp	Lys	Phe	Gly	Gly	Glu	His	Asn	Pro	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Glu
65					70					75					80
Ala	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Arg	Glu
				85					90					95	
Gln	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Val	Ser
			100					105						110	
Ser	Ser	Ala	Ser	Met	Asp	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu
		115					120						125		
Ser	Val	Leu	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Pro	Thr	Asp	Val
	130					135					140				

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys
225 230 235 240

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
245 250 255

Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
260 265 270

Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
275 280 285

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

Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala
305 310 315 320

Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro
325 330 335

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
340 345 350

His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
355 360 365

Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
370 375 380

Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu
 405 410 415
 Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser
 420 425 430
 Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp
 435 440 445
 Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly
 450 455 460
 Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val
 465 470 475 480
 Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln
 485 490 495
 Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn
 500 505 510
 Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val
 515 520 525
 Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile
 530 535 540
 Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr
 545 550 555 560
 Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp
 565 570 575
 Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile
 580 585 590
 Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His
 595 600 605
 Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val
 610 615 620

ES 2 483 724 T3

Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr
625 630 635 640

Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr
645 650 655

Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly
660 665 670

Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
675 680 685

Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
690 695 700

Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
705 710 715 720

Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
725 730 735

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
740 745 750

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
755 760 765

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr
1 5 10 15

Lys Pro Gln Leu
20

10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 8

Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Ile Phe Leu His
20

5 <210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg
1 5 10 15

10 **Gly Tyr Leu Ser**
20

15 <210> 10
<211> 708
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 483 724 T3

Met	Asn	Pro	Thr	Glu	Thr	Lys	Ala	Ile	Pro	Val	Ser	Gln	Gln	Met	Glu
1				5					10					15	
Gly	Pro	His	Leu	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys	His	Lys	Lys	Gln	Ala	Val	Lys
			20					25					30		
Thr	Glu	Pro	Glu	Lys	Lys	Ser	Gln	Ser	Thr	Lys	Leu	Ser	Val	Val	His
		35					40					45			
Glu	Lys	Lys	Ser	Gln	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Glu	His	Thr	Glu	Pro	Lys
	50					55					60				
Ser	Leu	Pro	Lys	Gln	Ala	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Asn	Asp	Ala	His	Asn
65					70					75					80
Lys	Lys	Ala	Val	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Gln	Gln	Pro	Ser	Glu	Lys	Ser
				85					90					95	
Thr	Glu	Pro	Lys	Thr	Lys	Pro	Gln	Asp	Met	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Glu
			100					105					110		
Ser	Val	Ala	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Asp	Lys	Lys
		115					120					125			

Lys Glu Lys Lys Ser Leu Thr Pro Ala Val Pro Val Glu Ser Lys Pro
 130 135 140

Asp Lys Pro Ser Gly Lys Ser Gly Met Asp Ala Ala Leu Asp Asp Leu
 145 150 155 160

Ile Asp Thr Leu Gly Gly Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu Asn Thr Thr
 165 170 175

Tyr Thr Gly Pro Glu Val Ser Asp Pro Met Ser Ser Thr Tyr Ile Glu
 180 185 190

Glu Leu Gly Lys Arg Glu Val Thr Ile Pro Pro Lys Tyr Arg Glu Leu
 195 200 205

Leu Ala Lys Lys Glu Gly Ile Thr Gly Pro Pro Ala Asp Ser Ser Lys
 210 215 220

Pro Ile Gly Pro Asp Asp Ala Ile Asp Ala Leu Ser Ser Asp Phe Thr
 225 230 235 240

Cys Gly Ser Pro Thr Ala Ala Gly Lys Lys Thr Glu Lys Glu Glu Ser
 245 250 255

Thr Glu Val Leu Lys Ala Gln Ser Ala Gly Thr Val Arg Ser Ala Ala
 260 265 270

Pro Pro Gln Glu Lys Lys Arg Lys Val Glu Lys Asp Thr Met Ser Asp
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Ala Leu Ser Ala Ser Leu Gly Thr Arg Gln Ala Glu
 290 295 300

Pro Glu Leu Asp Leu Arg Ser Ile Lys Glu Val Asp Glu Ala Lys Ala
 305 310 315 320

Lys Glu Glu Lys Leu Glu Lys Cys Gly Glu Asp Asp Glu Thr Ile Pro
 325 330 335

Ser Glu Tyr Arg Leu Lys Pro Ala Thr Asp Lys Asp Gly Lys Pro Leu
 340 345 350

Leu Pro Glu Pro Glu Glu Lys Pro Lys Pro Arg Ser Glu Ser Glu Leu
 355 360 365

Ile Asp Glu Leu Ser Glu Asp Phe Asp Arg Ser Glu Cys Lys Glu Lys
 370 375 380

Pro Ser Lys Pro Thr Glu Lys Thr Glu Glu Ser Lys Ala Ala Ala Pro
 385 390 395 400

Ala Pro Val Ser Glu Ala Val Cys Arg Thr Ser Met Cys Ser Ile Gln
 405 410 415

Ser Ala Pro Pro Glu Pro Ala Thr Leu Lys Gly Thr Val Pro Asp Asp
 420 425 430

Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Ser Leu Gly Lys Lys Glu Ala Asp Pro
 435 440 445

Glu Asp Gly Lys Pro Val Met Asp Lys Val Lys Glu Lys Ala Lys Glu
 450 455 460

Glu Asp Arg Glu Lys Leu Gly Glu Lys Glu Glu Thr Ile Pro Pro Asp
 465 470 475 480

Tyr Arg Leu Glu Glu Val Lys Asp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Leu Pro
 485 490 495

Lys Glu Ser Lys Glu Gln Leu Pro Pro Met Ser Glu Asp Phe Leu Leu
 500 505 510

Asp Ala Leu Ser Glu Asp Phe Ser Gly Pro Gln Asn Ala Ser Ser Leu
 515 520 525

Lys Phe Glu Asp Ala Lys Leu Ala Ala Ala Ile Ser Glu Val Val Ser
 530 535 540

Gln Thr Pro Ala Ser Thr Thr Gln Ala Gly Ala Pro Pro Arg Asp Thr
 545 550 555 560

Ser Gln Ser Asp Lys Asp Leu Asp Asp Ala Leu Asp Lys Leu Ser Asp
 565 570 575

Ser Leu Gly Gln Arg Gln Pro Asp Pro Asp Glu Asn Lys Pro Met Glu
 580 585 590

Asp Lys Val Lys Glu Lys Ala Lys Ala Glu His Arg Asp Lys Leu Gly
 595 600 605

Glu Arg Asp Asp Thr Ile Pro Pro Glu Tyr Arg His Leu Leu Asp Asp
 610 615 620

Asn Gly Gln Asp Lys Pro Val Lys Pro Pro Thr Lys Lys Ser Glu Asp
 625 630 635 640

Ser Lys Lys Pro Ala Asp Asp Gln Asp Pro Ile Asp Ala Leu Ser Gly
 645 650 655

Asp Leu Asp Ser Cys Pro Ser Thr Thr Glu Thr Ser Gln Asn Thr Ala
 660 665 670

Lys Asp Lys Cys Lys Lys Ala Ala Ser Ser Ser Lys Ala Pro Lys Asn
 675 680 685

Gly Gly Lys Ala Lys Asp Ser Ala Lys Thr Thr Glu Glu Thr Ser Lys
 690 695 700

Pro Lys Asp Asp
 705

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

5

<400> 11

Ile Gly Pro Asp Asp Ala Ile Asp Ala Leu Ser Ser Asp Phe Thr
 1 5 10 15

10

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 12

Ala Val Cys Arg Thr Ser Met Cys Ser Ile Gln Ser Ala Pro Pro
 1 5 10 15

20

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

5 poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con al menos un biomarcador durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme el complejo biomarcador-anticuerpo, donde el al menos un biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas; y
10 detectar cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se haya formado,

donde la detección del complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en un sujeto.

2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método además las etapas de:

15 poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con al menos otro biomarcador durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme un complejo biomarcador-anticuerpo, donde el al menos otro biomarcador se selecciona de entre el grupo que consiste en:

20 péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas,
péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las
25 mismas, y combinaciones de las mismas, y cualquier combinación de los mismos; y

detectar cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se haya formado,

donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto.

30 3. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 2, donde el al menos otro biomarcador es un péptido de menos de 50 aminoácidos.

35 4. El método *in vitro* de la reivindicación 2, donde dicho método se lleva a cabo con tres péptidos de BRAF, tres péptidos de PAD4, y dos péptidos de calpastatina y donde los tres péptidos de BRAF consisten en las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8 y SEC ID N° 9, los tres péptidos de PAD4 consisten en las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, y los dos péptidos de calpastatina consisten en las SEC ID N° 11 y SEC ID N° 12.

40 5. Un método *in vitro* para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

poner en contacto la muestra biológica con al menos un biomarcador durante un tiempo y bajo condiciones que permitan que se forme un complejo biomarcador-anticuerpo, donde el al menos un biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una
45 secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y
detectar cualquier complejo biomarcador-anticuerpo que se haya formado,

50 donde la detección de un complejo péptido de BRAF- anticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en la muestra biológica.

6. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el sujeto es negativo al CCP o la muestra biológica se obtiene de un sujeto negativo al CCP.

55 7. El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además la medición, en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, de la concentración de al menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en proteína C-reactiva, amiloide A sérica, interleucina 6, proteínas S100, osteopontina, factor reumatoide, metaloproteasa de la matriz 1, metaloproteasa de la matriz 3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis, y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovia.

60 8. Un kit para el diagnóstico *in vitro* de artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho kit:

65 al menos un biomarcador, donde el biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas; y

al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el péptido de BRAF y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto.

5 9. El kit de la reivindicación 8 que comprende además al menos otro biomarcador, donde el otro biomarcador se selecciona de entre el grupo constituido por:

10 péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y

péptidos de calpastatina que tienen una secuencia e aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y cualquier combinación de los mismos, y

15 al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el al menos otro biomarcador y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto.

20 10. Un kit para el diagnóstico *in vitro* de artritis reumatoide en un sujeto negativo al CCP, comprendiendo dicho kit:

al menos ocho biomarcadores que comprenden:

25 tres péptidos de BRAF seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas,

30 tres péptidos de PAD4 seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y

35 dos péptidos de calpastatina seleccionados de entre el grupo constituido por los péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas y combinaciones de las mismas, y

al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el biomarcador y un autoanticuerpo presente en una muestra biológica obtenida del sujeto, donde la detección de un complejo biomarcador-anticuerpo es indicativa de artritis reumatoide en el sujeto negativo al CCP.

40 11. Un kit para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-BRAF en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit:

45 al menos un biomarcador, donde el al menos un biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y

al menos un reactivo para detectar un complejo biomarcador-anticuerpo formado entre el péptido de BRAF y un autoanticuerpo presente en la muestra biológica, donde el autoanticuerpo es un autoanticuerpo anti-BRAF que es indicativo de artritis reumatoide.

50 12. Una matriz para diagnosticar artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicha matriz al menos un biomarcador fijado en su superficie, donde el biomarcador es un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas.

13. La matriz de la reivindicación 12 que comprende además al menos otro biomarcador fijado en su superficie, donde el otro biomarcador se selecciona de entre el grupo constituido por:

60 péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas,

65 péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas y combinaciones de las mismas, y cualquier combinación de los mismos.

14. Una matriz para el diagnóstico de artritis reumatoide en un sujeto negativo al CCP, comprendiendo dicha matriz al menos ocho biomarcadores fijados en su superficie, donde los al menos ocho biomarcadores comprenden:

5 tres péptidos de BRAF seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de BRAF que tienen una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas,
10 tres péptidos de PAD4 seleccionados de entre el grupo constituido por péptidos de PAD4 que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y
15 dos péptidos de calpastatina seleccionados de entre el grupo que consiste en los péptidos de calpastatina que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, fragmentos de las mismas y combinaciones de las mismas.

15. La matriz de cualquiera de las reivindicaciones 12-14 que comprende además al menos un biomarcador adicional fijado en su superficie, para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos de AR en una muestra biológica, preferentemente anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti CCP.

20 16. Un biomarcador de artritis reumatoide, donde el biomarcador es:

25 Un péptido de BRAF que tiene una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, y donde el biomarcador es reconocido por un autoanticuerpo anti-BRAF.

30 17. Un kit de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 o una matriz de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde los péptidos de PAD4 y los péptidos de calpastatina son péptidos de menos de 50 aminoácidos.

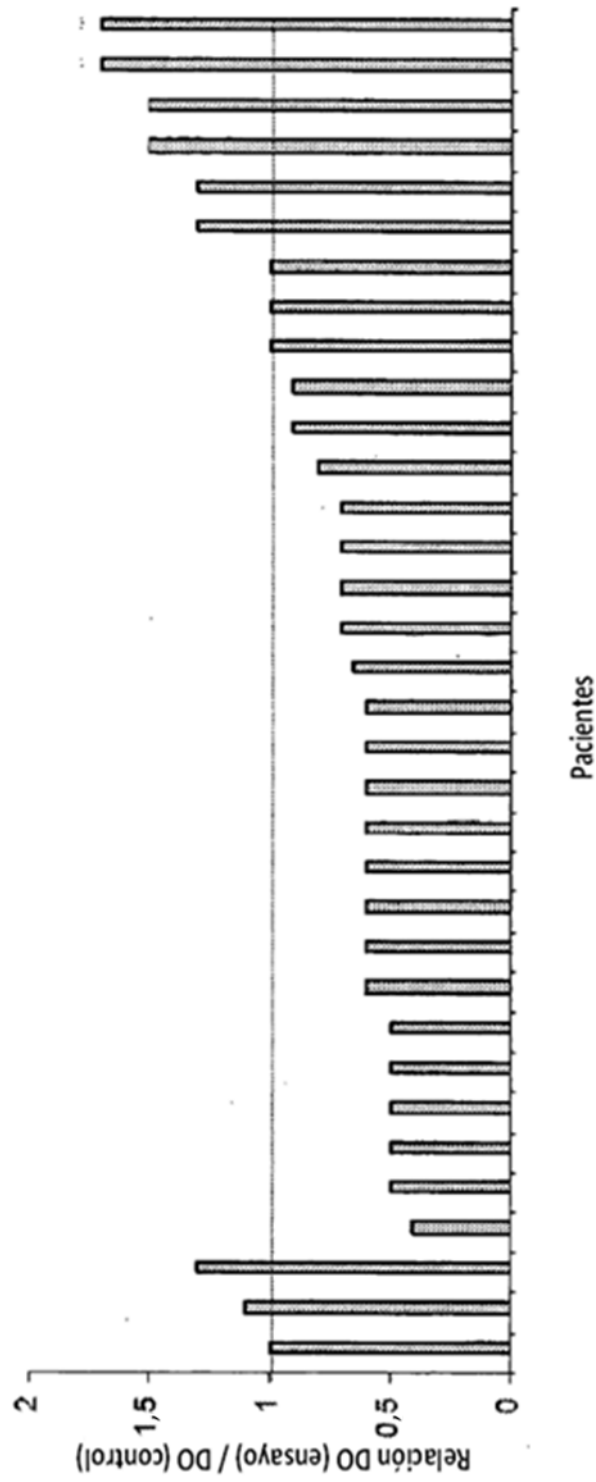


Figura 1

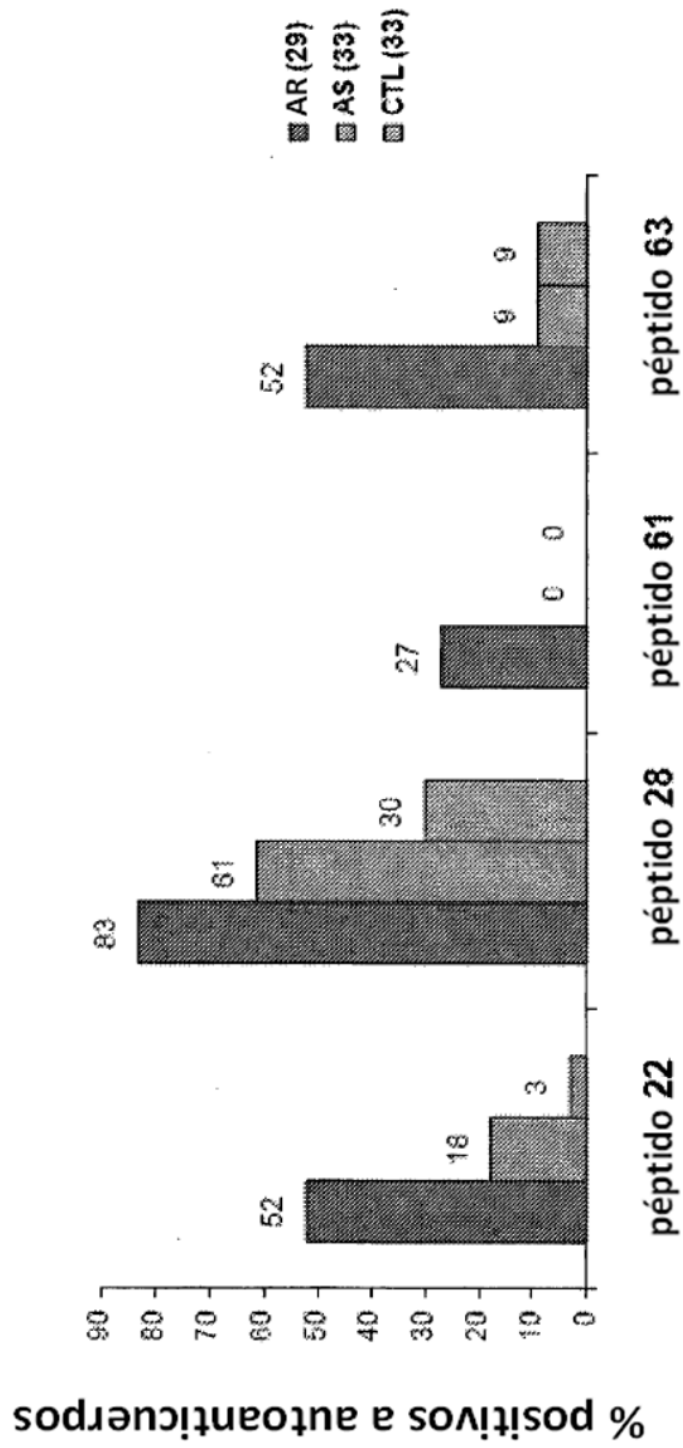


Figura 2

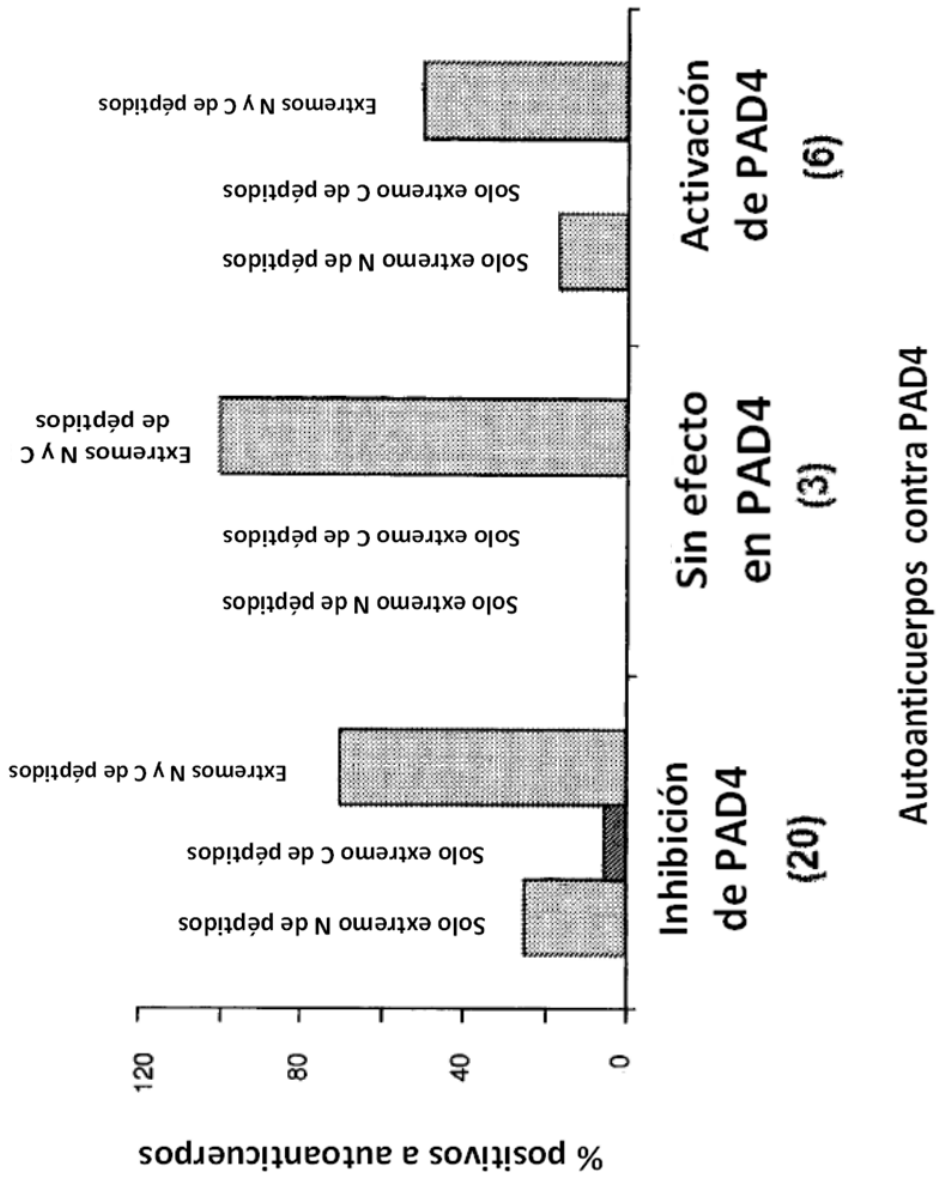


Figura 3

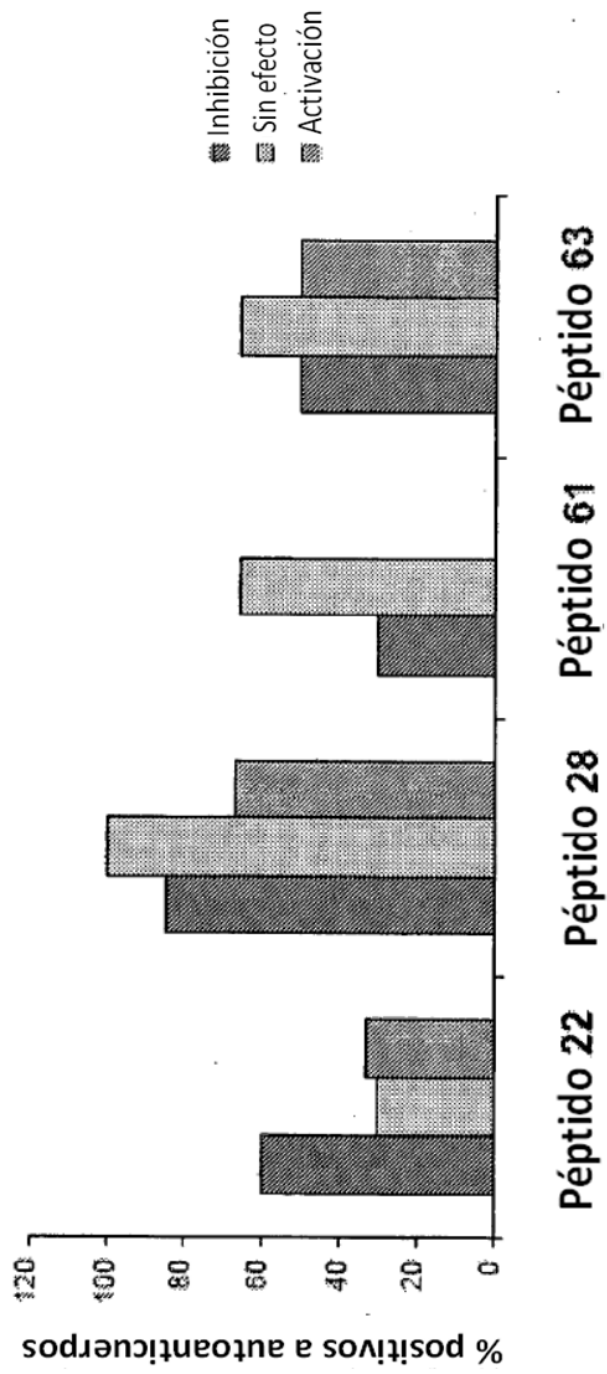
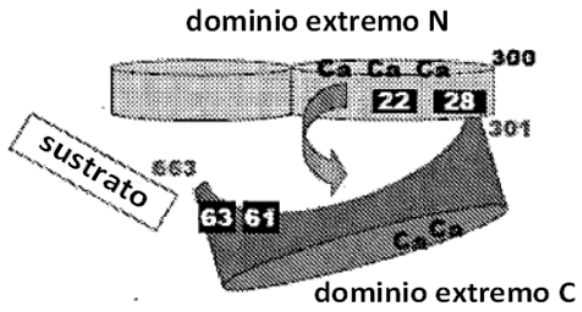


Figura 4

A



B



C

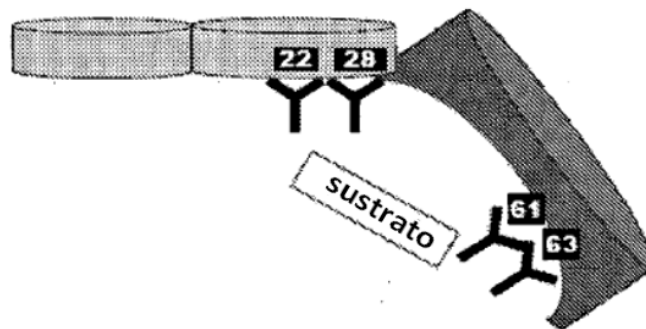


Figura 5

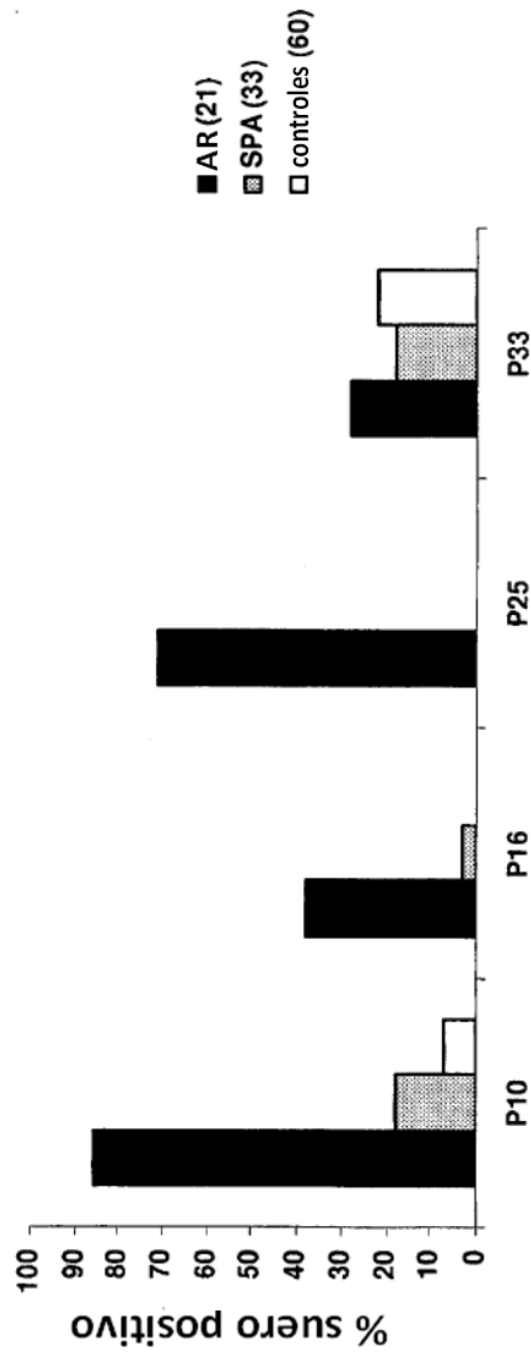


Figura 6

AR	CCP	Péptidos de BRAF		
		P10	P16	P25
AR1	neg			
AR2	neg			
AR3	neg			
AR4	neg			
AR5	neg			
AR6	neg			
AR7	neg			
AR8	neg			
AR9	neg			
AR10	neg			
AR11	neg			
AR12	neg			
AR13	neg			
AR14	neg			
AR15	neg			
AR16	neg			
AR17	neg			
AR18	neg			
AR19	neg			
AR20	neg			
AR21	neg			
AR22	neg			
AR23	neg			
AR24	neg			
AR25	neg			
AR26	neg			
AR27	neg			
AR28	neg			
AR29	neg			

Figura 7

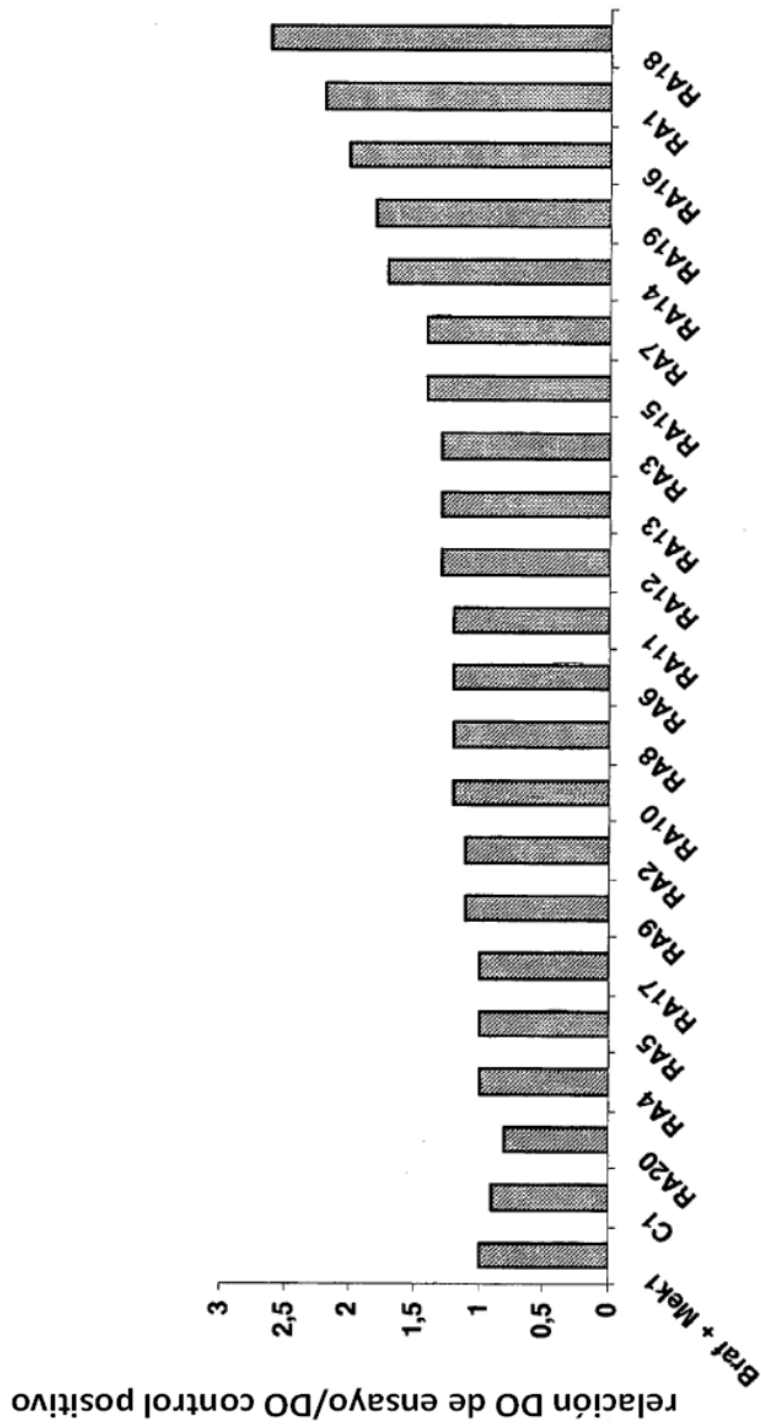


Figura 8

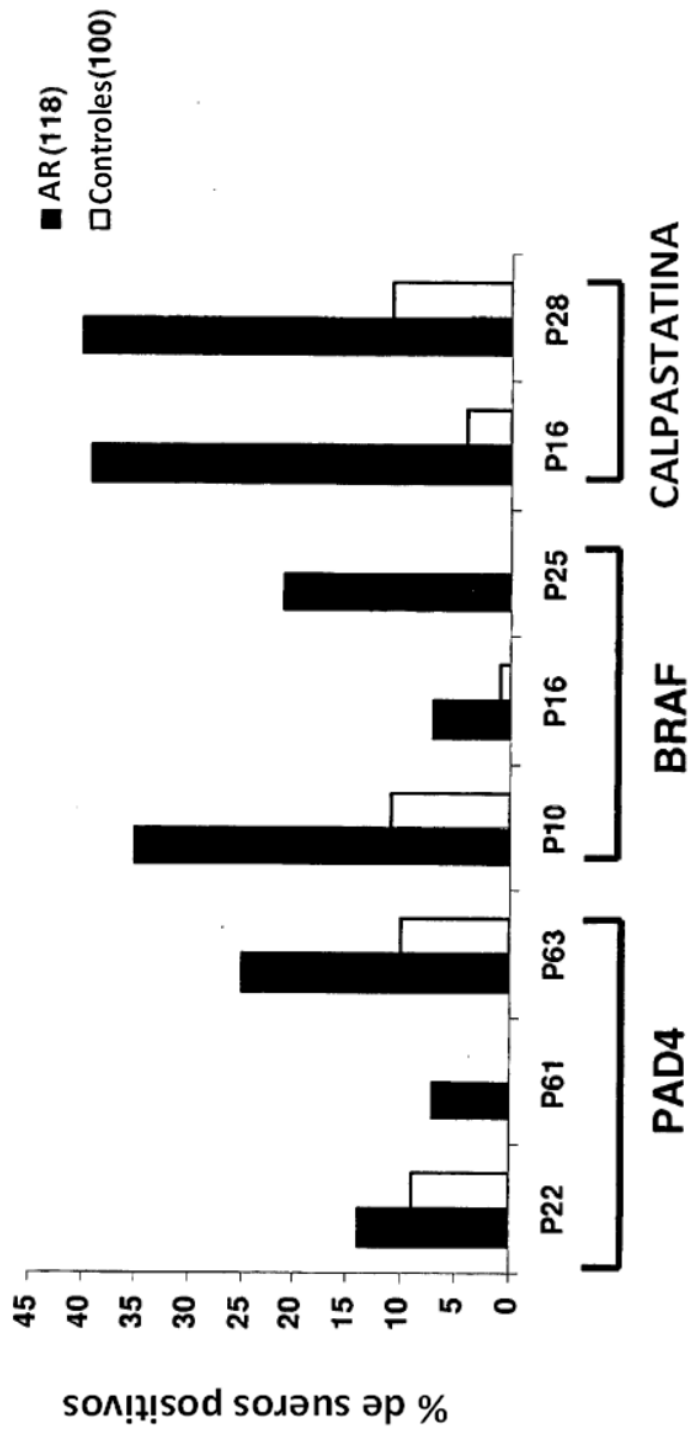


Figura 9

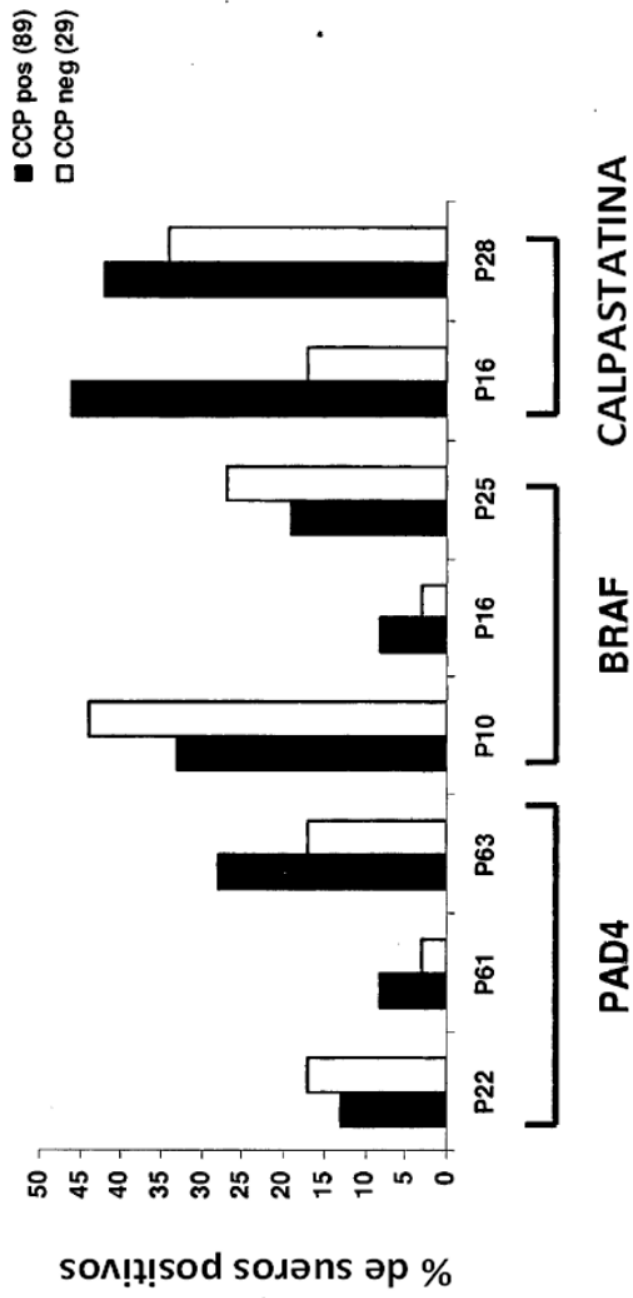


Figura 10