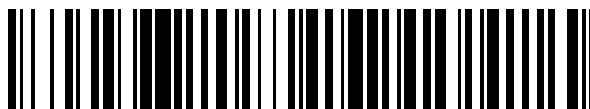


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 153**

51 Int. Cl.:

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08761599 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2161284**

54 Título: **Polipéptido quimérico fibrina-filagrina citrulinado capaz de detectar los anticuerpos generados en la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

30.04.2007 ES 200701167

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

05.05.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (50.0%)**

Serrano 117

28006 Madrid, ES y

**FUNDACIÓ CLÍNIC PER A LA RECERCA
BIOMÈDICA (50.0%)**

72 Inventor/es:

HARO VILLAR, ISABEL;

GOMARA ELENA, M^a JOSÉ;

SANMARTÍ SALA, RAIMON y

PÉREZ RODRÍGUEZ, M^a LUISA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 535 153 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).

DESCRIPCION

Polipéptido quimérico fibrina-filagrina citrulinado capaz de detectar los anticuerpos generados en la artritis reumatoide

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un polipéptido quimérico, capaz de detectar los anticuerpos generados en la artritis reumatoide, que comprende al menos dos subunidades peptídicas citrulinadas: (i) una procedente de la cadena α o β de la fibrina y (ii) una segunda procedente de la filagrina. Además, la invención comprende una composición antigénica, un método y un kit para el diagnóstico y pronóstico de la artritis reumatoide, a partir de la detección de los auto-anticuerpos generados durante el curso de dicha enfermedad.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunes más comunes, con un origen desconocido y que afecta al 0.5-1% de la población, destruyendo progresivamente las articulaciones, causándoles deformidad y pérdida de función, además de producir complicaciones sistémicas.

En esta enfermedad la terapia intensiva aplicada en estadios iniciales ofrece resultados muy positivos, siendo fundamental su diagnóstico prematuro. El criterio de clasificación para la AR según el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Arnett FC, et al. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:315-24) está basado en parámetros puramente clínicos, aunque estos criterios no son útiles para el diagnóstico temprano de la AR (Saraux A, et al. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2485-91).

En la actualidad existen diferentes métodos serológicos que permiten el diagnóstico de la AR y la distinguen de otras patologías similares en fases tempranas de su evolución. En este sentido, se conocen una serie de anticuerpos específicos para la AR, tales como: el factor antiperinuclear (APF), anticuerpos antifilagrina (AFA) y los anticuerpos antiqueratina (AKA). Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos (auto-anticuerpos anti-proteínas citrulinadas) son generados por modificaciones post-traduccionales que consisten en la deiminación de la arginina a citrulina por la enzima peptidilarginina deiminasa (Vossenaar ER, et al. *Bioessays* 2003; 25: 1106-18).

Una de las herramientas más específicas en el diagnóstico de la AR consiste en la detección de los auto-anticuerpos generados frente a péptidos o proteínas citrulinadas, constituyendo éstos uno de los marcadores serológicos más eficaces de esta patología que se conocen (Nijenhuis S, et al. *Clin. Chim. Acta* 2004; 350: 17-34). Incluso, los kits (ELISA) más efectivos y comercialmente más extendidos para el diagnóstico de la AR están basados en péptidos citrulinados (CCP-1 y CCP-2) derivados concretamente de la proteína filagrina (Nijenhuis S, et al. 2004).

Otras proteínas del tejido sinovial que pueden ser citrulinadas son las cadenas α y β de la fibrina y el antígeno Sa o vimentina citrulinada. Recientemente, Sebbag et al (Sebbag et al *Eur. J. Clin. Immunol.* 2006, 36: 2250-2263) identificó 18 péptidos derivados de la proteína fibrina, dos de los cuales, denominados como [Cit^{60,72,74}] β -fibrina (60-74) y [Cit^{38,42}] α -fibrina (36-50) y localizados en el dominio globular de la proteína, eran capaces de reaccionar frente a todos los sueros positivos para auto-anticuerpos anti-proteínas citrulinadas. Estos resultados han sido corroborados por recientes estudios (Pérez, et al *Chem. Biol. Drug Des.* 2006, 68, 194-200; US 7,022,485), donde se ha analizado la reactividad de péptidos derivados de la fibrina en el diagnóstico de AR, confirmándose así su utilidad para el desarrollo y mejora de la eficacia de los sistemas de diagnóstico actuales.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Existe un creciente interés por desarrollar tests o pruebas específicas que mejoren el diagnóstico de la AR así como su diferenciación temprana respecto a otras enfermedades reumáticas que afectan a las articulaciones y tejido conectivo, sobre todo en pacientes con un peor pronóstico o aquellos con un desarrollo más temprano de la enfermedad. La incorporación de estos tests en la práctica clínica podría permitir la identificación de aquellos pacientes que requieren terapias más intensivas desde el mismo momento del diagnóstico de la enfermedad, permitiendo así un mayor control de ésta y, consecuentemente evitar al máximo la destrucción articular y mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Los autores de la presente invención, en su afán de mejorar los sistemas de diagnóstico de la AR que se emplean actualmente, han descubierto sorprendentemente una serie de péptidos citrulinados de las cadenas α y β de la fibrina con especial sensibilidad y especificidad frente a los auto-anticuerpos anti-proteínas citrulinadas, en adelante auto-anticuerpos, que se generan durante el desarrollo de la AR. Además, uno de estos péptidos citrulinados de la cadena α de la fibrina fue unido covalentemente a un péptido cíclico de la filagrina obteniéndose un polipéptido quimérico (fibrina-filagrina) que fue capaz de complementar o mejorar los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos con péptidos CCP-1 y CCP-2 (Inmunoscan RA).

Así, un primer aspecto de la invención está referido a un polipéptido quimérico, que comprende al menos dos subunidades peptídicas citrulinadas y unidas covalentemente, capaz de interactuar con anticuerpos auto-inmunes citrulinados generados durante la AR, donde:

- a. una subunidad (a) comprende al menos un 85% de homología, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 93%, aún más preferentemente al menos un 95% y todavía más preferentemente al menos un 98%, con un fragmento de al menos 7 aminoácidos de cualquiera de las cadenas α y β de la fibrina, preferentemente de longitud entre 10 y 18 aminoácidos, y
- b. una segunda subunidad (b) ciclada que comprende al menos un 85%, preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 93%, aún más preferentemente al menos un 95% y todavía más preferentemente al menos un 98%, de homología con un fragmento de al menos 7 aminoácidos de la proteína filagrina, preferentemente de longitud entre 10 y 18 aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la subunidad b comprende al menos dos aminoácidos cisteína entre los cuales se forma un puente disulfuro para ciclar dicha subunidad. Preferentemente estas cisteínas provienen de una sustitución serina-cisteína.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención el fragmento de la filagrina a partir del cual se obtiene la subunidad b, es el comprendido entre las posiciones 306 y 324 de dicha proteína, y en una realización todavía más preferida la secuencia comprendida entre las posiciones 306 y 324 de la filagrina es la SEQ ID NO:7.

En una realización aun más preferida la subunidad (b) tiene la secuencia SEQ ID NO:1 (cfc1cyc).

En una realización más preferida de este aspecto de la invención el fragmento de fibrina a partir del cual se obtiene la subunidad a, es el comprendido entre las posiciones 617 y 631 de la α -fibrina, o bien el comprendido entre las posiciones 43 y 62 de la β -fibrina. En una realización preferente la secuencia comprendida entre las posiciones 617 y 631 de la α -fibrina es la SEQ ID NO:8. En una realización también preferente la secuencia comprendida entre las posiciones 43-62 de la β -fibrina es la SEQ ID NO:9.

En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención la subunidad (a) del polipéptido quimérico tiene la secuencia seleccionada del grupo:

- a. SEQ ID NO:2 (p18),
- b. SEQ ID NO:3 (p19), ó
- c. SEQ ID NO:4 (p22),

En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención la subunidad (a) del polipéptido quimérico tiene la secuencia SEQ ID NO:5 (p38).

En otra realización preferida de la invención el polipéptido quimérico tiene la SEQ ID NO:6 (p18-cfc1cyc).

En una realización también preferida de la invención el polipéptido quimérico, según cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, está marcado o conjugado con moléculas transportadoras.

En adelante estos polipéptidos quiméricos citrulinados serán denominados como "*polipéptido quimérico de la invención*". Dichos péptidos podrán ser obtenidos por procedimientos sobradamente conocidos en el estado de la técnica, tales como la síntesis química de péptidos en fase sólida (ver material y métodos).

Un segundo aspecto de la invención se relaciona con péptidos citrulinados de las cadenas α y β de la fibrina donde dichos péptidos tienen cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo: p18, p19, p22 y p38 o secuencias análogas (péptidos análogos), donde dichos péptidos citrulinados y péptidos análogos son capaces de interactuar con los auto anticuerpos específicos de la AR. En una realización preferida de la invención los péptidos se encuentran ciclados y en una realización la ciclación se lleva a cabo a partir de dos cisteínas, preferentemente provenientes de una sustitución serina-cisteína. En adelante estos péptidos citrulinados serán denominados como "*péptidos de la invención*".

Un tercer aspecto de la invención se relaciona con una composición antigénica para el análisis diagnóstico y/o pronóstico de la AR que comprende al menos uno de los péptidos de la invención, el polipéptido quimérico de la invención o combinaciones de los mismos. En adelante esta composición será denominada como "*composición antigénica de la invención*".

Un cuarto aspecto de la invención se relaciona con un método para la detección de auto-anticuerpos específicos de la AR en una muestra biológica que comprende:

a. Poner en contacto una muestra biológica con al menos uno de los compuestos siguientes: un péptido de la invención, un polipéptido quimérico de la invención, una composición antigénica de la invención.

b. Detectar la interacción entre los auto-anticuerpos específicos y los péptidos de la invención, el polipéptido quimérico o composición antigénica del paso (a), mediante cualquier metodología útil, como puede ser cualquiera de los numerosos y sobradamente conocidos métodos en el estado de la técnica (por ejemplo a través del marcado de los péptidos, o la medición de la densidad óptica de la muestra, etc.) o cualquier otro método.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se pone en contacto con la muestra biológica más de un polipéptido quimérico de la invención. En otra realización de la invención, la muestra biológica se pone en contacto con uno o más de los polipéptidos quiméricos de la invención y el polipéptido CCP-2.

Un quinto aspecto de la invención se relaciona con un kit de diagnóstico y pronóstico de la AR que comprende al menos uno de los péptidos de la invención, el polipéptido quimérico de la invención ó la composición antigénica de la invención (antígenos) y los reactivos y tampones necesarios para permitir la formación del complejo anticuerpo-antígeno.

Definiciones:

El término "péptido o polipéptido derivado" hace referencia a lo largo de la descripción a péptidos que se obtienen a partir de regiones o fragmentos de al menos 7 amino ácidos de la proteína filagrina o de las cadenas α y β de la fibrina. Estos péptidos derivados han podido sufrir modificaciones (ejemplo: ciclaciones, deiminaciones, etc), que hayan reducido su homología con la secuencia inicial de la proteína de la que derivan. Un ejemplo de estos péptidos son los grupos de péptidos conocidos como CCP-1 y CCP-2.

El término "péptidos CCP-1" hace referencia a lo largo de la descripción a péptidos cíclicos derivados de la filagrina.

El término "péptidos CCP-2" hace referencia a lo largo de la descripción a péptidos con un grado de sensibilidad y especificidad para la detección de la AR mayor que el alcanzado con los péptidos CCP-1. A lo largo de los ensayos, que se muestran en la descripción, los péptidos de la invención son comparados con los péptidos CCP-2 obtenidos a partir del kit comercial de ImmunSCAN (ImmunSCAN RA; Eurodiagnostica, distribuido por Diasorin, Madrid, España).

El término "péptidos o polipéptidos análogos" está referido a péptidos donde al menos uno de sus aminoácidos ha sido sustituido por otro de características similares según se indica a continuación:

- Neutros polares, hidrófilos o (polares): serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), asparagina (Asn) y glutamina (Gln).
- Neutros no polares, apolares o hidrófobos: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), metionina (Met), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr)
- Con carga negativa, o ácidos: ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu).
- Con carga positiva, o básicos: lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His).

El término "péptidos unidos covalentemente" hace referencia a péptidos entre los cuales media un enlace covalente y donde la unión puede darse con o sin espaciadores.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esta figura muestra un esquema de la estrategia de síntesis en fase sólida del péptido cíclico "cabeza-cola" (p38HT) procedente de la cadena β de la fibrina (fragmento 43-62). Reactivos y condiciones: (i) Fmoc-Asp-Odmab DCM, DIPCDI, 20min 0°C; (ii) DMAP (4-Dimetilaminopiridina), DMF, 3h; (iii) Síntesis en fase sólida (SPPS); (iv) 20% piperidina/DMF; (v) 3% hidrazina/DMF; (vi) 20% H₂O/DMF, 16 h; (vii) DMF, DCM, Metanol; (viii) 1% DIPEA/DMF; (ix) 1% HOBt/DMF (x) PyBOP/DMF, DCM, 72h; (xi) 1% DIEA/DMF; (xii) DMF/MeOH; (xiii) TFA ácido trifluoroacético/EDT/TIS (triisopropilsileno)/H₂O, 3h. Los grupos W, X y Z son grupos protectores empleados para dirigir la reacción de síntesis química de los péptidos.

Figura 2. Esta figura muestra un esquema de la estrategia de síntesis en fase sólida del péptido cíclico con puente disulfuro (p38SS). Reactivos y condiciones: (i) SPPS; (ii) 20% piperidina/DMF; (iii) TFA/EDT/TIS/H₂O, 3h; (iv) I₂/MeOH, 60min, I₂/MeOH 90 min; (v) DCM. Los grupos W, X, y Z son grupos protectores empleados para dirigir la reacción de síntesis de los péptidos.

Figura 3. Esta figura muestra un esquema de la estrategia de síntesis en fase sólida del péptido p18-cfc1cyc. Reactivos y condiciones: a) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) SPPS del péptido cfc1cyc; (iii) SPPS, síntesis peptídica en fase sólida del péptido p18; (iv) 20% piperidina/DMF; (v) TFA/EDT/TIS/H₂O; (vi) I₂/Metanol, 60 min y H₂O, 90 min; (vii) DCM.

b) Reactivos y condiciones: (i) 20% piperidina/DMF; (ii) SPPS del péptido cfc1cyc; (iii) I₂/Metanol/DCM, 4h; (iv) DMF/Metanol; (v) SPPS de p18 (vi) 20% piperidina/DMF; (vii) TFA/TIS/H₂O (90:5:5).

Figura 4. Esta figura muestra gráficas de reactividad, medida en densidades ópticas (DO₄₉₂), de péptidos derivados de las cadenas α y β de la fibrina para una muestra de 33 sueros provenientes de pacientes con AR.

Figura 5. Esta figura muestra gráficas de reactividad, medida en densidades ópticas (DO₄₉₂), del péptido derivado la cadena β de la fibrina p38 y los péptidos cíclicos p38HT y p38SS para una muestra de 110 sueros AR.

Figura 6. Análisis de curva ROC (A) y de la reactividad de los péptidos p22, p22sc y p22lc frente a auto-anticuerpos (B, C y D) para una cohorte de pacientes con AR o artritis psoriásica (PsA). A) La sensibilidad y la especificidad fue calculada para todos los potenciales valores de *cut-off* (línea de corte) y representada como curva ROC (n=111 pacientes AR positivos, n=82 pacientes PsA positivos). En las gráficas B, C y D se muestra la reactividad de p22, p22sc y p22lc frente a los anticuerpos de pacientes de AR y PsA (CONTROL), representada con los valores óptimos de *cut-off* obtenidos del análisis con la curvas ROC de cada ensayo.

Figura 7. Análisis de curva ROC (A) y de reactividad frente a anticuerpos (B, C, D y E) del péptido lineal de la β -fibrina (p38), del péptido lineal de la α -fibrina (p22), del polipéptido quimérico p38-GGG-p22 y de la mezcla de p38 y p22 para una cohorte de pacientes con AR o PsA. A) La sensibilidad y la especificidad fue calculada para todos los potenciales valores de *cut-off* y representada como curva ROC (n=111 pacientes AR positivos, n=82 pacientes PsA positivos). En las gráficas B, C D y E se muestra la reactividad de p38, p22, p38-GGG-p22 y p38+p22 frente a los auto-anticuerpos de pacientes con AR o PsA (CONTROL), representada con los valores óptimos de *cut-off* obtenidos del análisis con la curvas ROC de cada ensayo.

Figura 8. Análisis de curva ROC y de la reactividad péptidos cíclicos derivados de la filagrina (cfc1cyc) (Pérez, T. et al. J. Pept. Sci. (2006) 12 (4), 267-278.) y el polipéptido quimérico (p18-cfc1cyc) en una cohorte de pacientes con AR o PsA. A) La sensibilidad y la especificidad fue calculada para todos los potenciales valores de *cut-off* y representada como curva ROC (n=111 AR pacientes, n=82 PsA pacientes). B) En las gráficas B, C se muestra la reactividad de cfc1 y p18-cfc1cyc frente a los auto-anticuerpos de pacientes con AR o y PsA (CONTROL), representada con los valores óptimos de *cut-off* obtenidos del análisis con la curvas ROC de cada ensayo.

Figura 9. Análisis de la correlación entre los títulos de anticuerpos anti-péptido p18-cfc1cyc y anti-CCP-2.

Figura 10. Curva ROC para Anti-CCP-2

Figura 11. Curva ROC para anti-quimérico fibrina/filagrina p-18

Figura 12. Curva ROC para anti-quimérico fibrina/filagrina p-19

Figura 13. Curva ROC para anti-quimérico fibrina/filagrina p-22

Figura 14. Evolución de los valores de la Proteína C reactiva (PCR) a lo largo del seguimiento entre pacientes CCP-2 (+) y (-).

Figura 15. Evolución del índice de actividad DAS28 a lo largo del seguimiento entre pacientes CCP-2 (+) y (-).

Figura 16. Evolución de los valores de la Proteína C reactiva (PCR) a lo largo del seguimiento entre pacientes con anti-quiméricos anti-p-18 (+) y (-).

Figura 17. Evolución del índice de actividad DAS28 a lo largo del seguimiento entre pacientes anti-quiméricos anti-p-18 (+) y (-).

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

A continuación se detallan los materiales y métodos que fueron empleados para el desarrollo de la presente invención, así como sus ejemplos de realización. Dichos ejemplos no limitan la invención, sino que su finalidad es ilustrarla, poniendo de manifiesto la sensibilidad y especificidad de los polipéptidos quiméricos y péptidos de la invención.

Material y métodos**Síntesis de péptidos**

Las síntesis de los péptidos pertenecientes a las cadenas α y β de la proteína fibrina, con distinto grado de deiminación (Tabla 1a-b), fueron realizadas mediante un proceso de síntesis de péptidos en fase sólida empleando una resina Tentagel RAM (Rapp Polymere GmbH, Germany) (100 mg, 0.28 meq/g). La síntesis se realizó en un sintetizador semiautomático de péptidos (SAM, MultisynTech, Germany) y se obtuvieron las secuencias en forma de carboxamidas C-terminales. Se siguió una estrategia Fmoc/tBut y las reacciones de acoplamiento entre aminoácidos se realizaron por duplicado, empleando como agentes de condensación 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), y concentraciones tres veces superiores a las anteriores. La etapa de desprotección del grupo protector Fmoc se realizó también por duplicado empleando piperidina (20%) en dimetilformamida (DMF) durante 10 minutos.

Tabla 1a. Secuencias de los péptidos derivados de la α -fibrina

Nombre	Péptido	Secuencia
p1	α fib(185-202)	S R A L A R E V D L K D Y E D Q Q K
p2	[Cit ¹⁹⁰] α fib(185-202)	S R A L A <u>X</u> E V D L K D Y E D Q Q K
p3	[Cit ^{186,190}] α fib(185-202)	S <u>X</u> A L A <u>X</u> E V D L K D Y E D Q Q K
p4	[Cit ¹⁸⁶] α fib(185-202)	S <u>X</u> A L A R E V D L K D Y E D Q Q K
p5	α fib(208-225)	I A K D L L P S R D R Q H L P L I K
p6	[Cit ²¹⁸] α fib(208-225)	I A K D L L P S R D <u>X</u> Q H L P L I K
p7	[Cit ^{216,218}] α fib(208-225)	I A K D L L P S <u>X</u> D <u>X</u> Q H L P L I K
p8	[Cit ²¹⁶] α fib(208-225)	I A K D L L P S <u>X</u> D R Q H L P L I K
p9	α fib(418-435)	G N V S P G T R R E Y H T E K L V T
p10	[Cit ⁴²⁶] α fib(418-435)	G N V S P G T R <u>X</u> E Y H T E K L V T
p11	[Cit ^{425,426}] α fib(418-435)	G N V S P G T <u>X</u> <u>X</u> E Y H T E K L V T
p12	[Cit ⁴²⁵] α fib(418-435)	G N V S P G T <u>X</u> R E Y H T E K L V T
p13	α fib(501-518)	S G I G T L D G F R H R H P D E A A
p14	[Cit ⁵¹²] α fib(501-518)	S G I G T L D G F R H <u>X</u> H P D E A A
p15	[Cit ⁵¹⁰] α fib(501-518)	S G I G T L D G F <u>X</u> H R H P D E A A
p16	[Cit ^{510,512}] α fib(501-518)	S G I G T L D G F <u>X</u> H <u>X</u> H P D E A A
p17	α fib(617-631)	H S T K R G H A K S R P V R G
p18	[Cit ⁶³⁰] α fib(617-631)	H S T K R G H A K S R P V <u>X</u> G
p19	[Cit ^{627,630}] α fib(617-631)	H S T K R G H A K S <u>X</u> P V <u>X</u> G
p20	[Cit ⁶²⁷] α fib(617-631)	H S T K R G H A K S <u>X</u> P V R G
p21	[Cit ⁶²¹] α fib(617-631)	H S T K <u>X</u> G H A K S R P V R G
p22	[Cit ^{621,630}] α fib(617-631)	H S T K <u>X</u> G H A K S R P V <u>X</u> G
p23	[Cit ^{621,627}] α fib(617-631)	H S T K <u>X</u> G H A K S <u>X</u> P V R G
p24	[Cit ^{621,627,630}] α fib(617-631)	H S T K <u>X</u> G H A K S <u>X</u> P V <u>X</u> G

Tabla 1b. Secuencias de los péptidos derivados de la β -fibrina

Nombre	Péptido	Secuencia
p25	β fib(40-57)	FFSARGHRPLDKKREEAP
p26	[Cit ⁵³] β fib(40-57)	FFSARGHRPLDKK $\underline{X}$ EEAP
p27	[Cit ⁴⁷] β fib(40-57)	FFSARGH $\underline{X}$ PLDKKREEAP
p28	[Cit ^{47,53}] β fib(40-57)	FFSARGH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAP
p29	[Cit ^{44,47,53}] β fib(40-57)	FFSA $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAP
p30	[Cit ^{44,47}] β fib(40-57)	FFSA $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKKREEAP
p31	[Cit ^{44,53}] β fib(40-57)	FFSA $\underline{X}$ GHRPLDKK $\underline{X}$ EEAP
p32	[Cit ⁴⁴] β fib(40-57)	FFSA $\underline{X}$ GHRPLDKKREEAP
p33	β fib(43-62)	ARGHRPLDKKREEAPSLRPA
p34	[Cit ⁶⁰] β fib(43-62)	ARGHRPLDKKREEAPSL $\underline{X}$ PA
p35	[Cit ⁵³] β fib(43-62)	ARGHRPLDKK $\underline{X}$ EEAPSLRPA
p36	[Cit ^{53,60}] β fib(43-62)	ARGHRPLDKK $\underline{X}$ EEAPSL $\underline{X}$ PA
p37	[Cit ^{47,53,60}] β fib(43-62)	ARGH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAPSL $\underline{X}$ PA
p38	[Cit ^{47,60}] β fib(43-62)	ARGH $\underline{X}$ PLDKKREEAPSL $\underline{X}$ PA
p39	[Cit ^{47,53}] β fib(43-62)	ARGH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAPSLRPA
p40	[Cit ⁴⁷] β fib(43-62)	ARGH $\underline{X}$ PLDKKREEAPSLRPA
p41	[Cit ^{44,47,53,60}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAPSL $\underline{X}$ PA
p42	[Cit ^{44,47,53}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKK $\underline{X}$ EEAPSLRPA
p43	[Cit ^{44,47,60}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKKREEAPSL $\underline{X}$ PA
p44	[Cit ^{44,47}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GH $\underline{X}$ PLDKKREEAPSLRPA
p45	[Cit ^{44,53,60}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GHRPLDKK $\underline{X}$ EEAPSL $\underline{X}$ PA
p46	[Cit ⁴⁴] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GHRPLDKKREEAPSLRPA
p47	[Cit ^{44,53}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GHRPLDKK $\underline{X}$ EEAPSLRPA
p48	[Cit ^{44,60}] β fib(43-62)	A $\underline{X}$ GHRPLDKKREEAPSL $\underline{X}$ PA
p49	β fib(72-89)	RARPAKAAATQKKVERKA
p50	[Cit ⁸⁷] β fib(72-89)	RARPAKAAATQKKVE $\underline{X}$ KA
p51	[Cit ⁷⁴] β fib(72-89)	RA $\underline{X}$ PAKAAATQKKVERKA
p52	[Cit ^{74,87}] β fib(72-89)	RA $\underline{X}$ PAKAAATQKKVE $\underline{X}$ KA
p53	[Cit ^{72,74,87}] β fib(72-89)	$\underline{X}$ A $\underline{X}$ PAKAAATQKKVE $\underline{X}$ KA
p54	[Cit ^{72,74}] β fib(72-89)	$\underline{X}$ A $\underline{X}$ PAKAAATQKKVERKA
p55	[Cit ^{72,87}] β fib(72-89)	$\underline{X}$ ARPAKAAATQKKVE $\underline{X}$ KA
p56	[Cit ⁷²] β fib(72-89)	$\underline{X}$ ARPAKAAATQKKVERKA
p57	β fib(151-168)	LKDLWQKRQKQVKDNENV
p58	[Cit ¹⁵⁸] β fib(151-168)	LKDLWQK $\underline{X}$ QKQVKDNENV
p59	β fib(365-383)	ANKYQISVNKYRGTAGNAL
p60	[Cit ³⁷⁶] β fib(365-383)	ANKYQISVNKY $\underline{X}$ GTAGNAL
p61	β fib(365-390)	ANKYQISVNKYRGTAGNALMDGASQL
p62	[Cit ³⁷⁶] β fib(365-390)	ANKYQISVNKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQL
p63	β fib(367-396)	KYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGENRT
p64	[Cit ³⁹⁵] β fib(367-396)	KYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGEN $\underline{X}$ T
p65	[Cit ³⁷⁶] β fib(367-396)	KYQISVNKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQLMGENRT
p66	[Cit ^{376,395}] β fib(367-396)	KYQISVNKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQLMGEN $\underline{X}$ T
p67	β fib(373-390)	NKYRGTAGNALMDGASQL
p68	[Cit ³⁷⁶] β fib(373-390)	NKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQL
p69	β fib(373-390)*	NKYRGTAGNALMDGASQL
p70	[Cit ³⁷⁶] β fib(373-390)*	NKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQL
p71	palm- β fib(373-390)	palm-NKYRGTAGNALMDGASQL
p72	palm-[Cit ³⁷⁶] β fib(373-390)	palm-NKY $\underline{X}$ GTAGNALMDGASQL

Citrulina = X

* péptidos ácidos

Los péptidos fueron desprotegidos y simultáneamente desanclados de la resina en una única etapa empleando una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)/ triisopropilsilano (TIS)/H₂O (95/2.5/2.5). Los péptidos se precipitaron con éter dietílico frío, se centrifugaron y liofilizaron en un 10% de ácido acético. Los péptidos así obtenidos se analizaron por HPLC analítica a 215 nm. Su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Ciclación de péptidos

Para obtener el péptido cíclico “cabeza-cola” p38HT cuya secuencia aparece indicada en la Tabla 2, se empleó una protección estándar de los aminoácidos. p38HT se obtuvo por síntesis manual en una resina Novasyn® TGA (Novabiochem Ltd., Switzerland) (0.25 mmol/g) en forma de ácido C-terminal, siguiendo el procedimiento indicado en la Figura 1. La resina se suministra comercialmente funcionalizada con ácido hidroximetilfenoxiacético (HMPA). La primera etapa consistió en la acilación de la resina con el anhídrido isómero del Fmoc-Asp-ODmab vía su cadena lateral. La síntesis del péptido se continuó empleando una estrategia estándar Fmoc/tBut. Tras completar la síntesis del péptido, se eliminó el grupo terminal Fmoc con un 20% de piperidina en DMF. La eliminación del grupo Dmab se realizó por tratamiento con un 3% de hidracina en DMF, seguido de tratamiento con un 20% de agua en DMF.

Tabla 2. Péptidos de β fibrina ciclados

Nombre	secuencia
p38HT	—ARGH <u>X</u> PLDKKREEAPSL <u>X</u> PAD—
p38SS	GFFCARGH <u>X</u> PLDKKREEAPCL <u>X</u> PA

La resina desprotegida se trató con un 1% de DIPEA-DMF seguido de un 1% de HOBt-DMF. La reacción de macrociclación se realizó en la resina empleando 3 equivalentes de PyBOP a temperatura ambiente durante 72 horas. Finalmente se liberó el péptido de la resina por tratamiento ácido con una mezcla de TFA/1,2-etanoditiol (EDT)/TIS/H₂O (95/2/1/2). La construcción cíclica se aisló por precipitación con éter dietílico frío, disolviéndose el residuo final en un 10% de ácido acético y siendo éste finalmente liofilizado. El crudo peptídico se purificó por HPLC en fase reversa y se identificó por espectrometría de masas electrospray (ES-MS).

Para obtener los péptidos cíclicos en forma de disulfuro, que se muestran en las Tablas 2 y 3 (p38SS, p18-sc, p19-sc, p22-sc, p18-lc, p19-lc and p22-lc), fue necesario sustituir dos residuos de serina de la secuencia peptídica original por dos residuos de cisteína protegidos como Cys(Acm). Los péptidos lineales correspondientes se sintetizaron en forma de carboxamidas C-terminales tal y como se ha descrito con anterioridad y finalmente se liberaron de la resina por tratamiento con TFA/EDT/H₂O (95/2.5/2.5) y se precipitaron con éter dietílico frío. Finalmente se disolvieron en un 10% de ácido acético y se liofilizaron. La caracterización de los péptidos resultantes se realizó por MALDI-TOF y HPLC analítica. La ciclación se llevó a cabo disolviendo los péptidos en ácido acético y adicionando una solución de yodo en metanol, para obtener el enlace disulfuro. Tras 60 minutos de agitación, se adicionó agua para acelerar la liberación del grupo protector Acm. La solución resultante se agitó durante 90 minutos más y finalmente el yodo fue extraído con diclorometano. La fase acuosa se diluyó tres veces con agua y se liofilizó. Los crudos peptídicos se caracterizaron por HPLC analítica y finalmente fueron purificados por HPLC preparativa y caracterizados por ES-MS. En la Figura 2 se ilustra el procedimiento sintético seguido para la preparación de uno de los péptidos cíclicos con puentes disulfuro (p38SS).

**Tabla 3. Péptidos α fibrina
secuencia**

Nombre

p18-sc	H C T K R G H A K C R P V X G
p19-sc	H C T K R G H A K C X P V X G
p22-sc	H C T K X G H A K C R P V X G
p18-lc	H C T K R G H A K S R P V X G I H T C P L
p19-lc	H C T K R G H A K S X P V X G I H T C P L
p22-lc	H C T K X G H A K S R P V X G I H T C P L

sc: ciclo pequeños (“small cycle”); lc: ciclo largo (“large cycle”)

Péptidos quiméricos

Para llevar a cabo la síntesis de los péptidos quiméricos lineales que contienen tres residuos de glicina entre los péptidos seleccionados de α - y β -fibrina (Tabla 4a), se siguió el procedimiento general anteriormente descrito.

Para llevar a cabo la síntesis del (poli)péptido quimérico α -fibrina-filagrina (p18-cfc1cyc) cuya secuencia primaria se indica en la Tabla 4b, se emplearon dos estrategias sintéticas diferentes. La primera (Figura 3a) consistió en la síntesis de la secuencia quimérica lineal en fase sólida y su posterior ciclación en solución, mediante la formación de un puente disulfuro. En la segunda estrategia (Figura 3b), la ciclación de la región correspondiente al péptido de la filagrina se realizó en fase sólida y posteriormente, sobre la peptidil resina con el péptido de filagrina ya ciclado, se completó la síntesis de la secuencia correspondiente a la α -fibrina. El desanclaje y desprotección final del polipéptido quimérico se realizó preservando el enlace disulfuro ya formado.

Tabla 4. Polipéptidos quiméricos**4a) α -fibrina- β -fibrina****4b) α -fibrina-filagrina**

Nombre	secuencia
(a)	
p38-GGG-p18	ARGH <u>X</u> PLDKKREEAPSL <u>X</u> PAGGGHSTKRGHAKSRPV <u>X</u> G
p38-GGG-p19	ARGH <u>X</u> PLDKKREEAPSL <u>X</u> PAGGGHSTKRGHAKS <u>X</u> PV <u>X</u> G
p38-GGG-p22	ARGH <u>X</u> PLDKKREEAPSL <u>X</u> PAGGGHSTK <u>X</u> GHAKSRPV <u>X</u> G
(b)	
p18-cfc1cyc	HSTKRGHAKSRPV <u>X</u> GHQCHQEST <u>X</u> GRSRGRRCGRSGS

Muestras de suero

Las muestras de suero analizadas procedieron de pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico de Barcelona. Se trabajó con un total de 193 muestras de suero, de las cuales 111 correspondían a pacientes diagnosticados con AR, según los criterios revisados de la Asociación Americana de Reumatología de 1987 (ahora Colegio Americano de Reumatología). Las muestras fueron previamente testadas por ELISA con el kit con anticuerpos CCP-2 (Immunoscan RA; Eurodiagnostica, distribuido por Diasorin, Madrid, Spain) para conocer la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CCP2. Los 82 sueros restantes se obtuvieron de pacientes diagnosticados de PsA no preseleccionados y se emplearon como control negativo.

Ensayos de ELISA

Las secuencias peptídicas se unieron covalentemente a placas de titulación de ELISA (Costar Corp., DNA-bind N-oxysuccinimide surface, Cambridge, MA), como se ha descrito previamente (Pérez, T.; Gómez, et al. *Lett. Peptide Sci.* 2002, 9, 291-300).

Brevemente, se diluyeron los péptidos a una concentración de 10 mg/mL en tampón carbonato/bicarbonato (pH 9.6) 0.05 M. Se adicionaron 100 μ L de solución peptídica a cada pocillo de la placa de microtitulación y se incubó toda la noche a 4°C. Cada placa contenía pocillos control que incluían todos los reactivos excepto la muestra de suero, para estimar el ruido de fondo, y pocillos que incluían todos los reactivos excepto el péptido, para evaluar así las reacciones no específicas del suero. En los controles, los pocillos se bloquearon con 2 mg BSA/pocillo. Tras la incubación, las placas se bloquearon con 2% de BSA en tampón carbonato/bicarbonato (pH 9.6) 0.05 M durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sueros se diluyeron 200 veces en tampón RIA (1% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% vol/vol Triton X-100, 0.5% wt/vol Na-deoxicolato, 0.1% SDS) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se adicionaron 100 μ L/pocillo y se incubaron durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Tras realizar seis lavados con PBS/0.05% Tween-20, se adicionaron 100 μ L/pocillo de IgG anti-humana conjugada a peroxidasa, diluida 1:1000 en tampón RIA. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las placas seis veces con PBS/0.05% Tween-20 y los anticuerpos unidos se detectaron con dihidrocloruro de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma Chemical Company) y 0.8 mL/mL de 30% de peróxido de hidrógeno. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 mL de H₂SO₄ 2N y los valores de absorbancia obtenidos fueron medidos a una longitud de onda de 492 nm. Todos los sueros se testaron por duplicado. También se incluyeron sueros control para monitorizar las variaciones inter- e intra-ensayos.

Los ensayos de ELISA llevados a cabo con el lipopéptido p66 o con las mezclas físicas de péptidos de fibrina, se realizaron tras la adsorción pasiva de las secuencias a la superficie sólida (Maxisorp, 96F Nunc, Roskilde, Denmark), siguiendo la metodología ya descrita (Gomara, M. J. at al *J Immunol Methods* 2000, 234 (1-2), 23-34.). El péptido p65 se analizó empleando placas Covalink NH (Nunc, Roskilde, Denmark), que permiten la unión covalente de los péptidos a través de su región C-terminal. El procedimiento general fue el siguiente:

Se preparó una solución de péptido de 10 µg/mL en agua destilada que contenía sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) a concentración 8 mM. Se adicionaron 100 µL de la solución de péptido/sulfo-NHS a cada pocillo. Asimismo se preparó una solución de un 2% de BSA/sulfo-NHS para adicionar al pocillo control. La reacción covalente se inició tras la adición de 50 µL de una solución 16 mM de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) a cada pocillo. Se incubaron las placas durante la noche a temperatura ambiente y se realizó el resto del ensayo ELISA siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para las placas Costar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS versión 12.0. Para establecer la sensibilidad/especificidad de los diferentes tests ELISA en las distintas patologías se realizó un estudio de curvas ROC. Para la comparación de proporciones se usó el test de ji cuadrado (Chi-square test) o el test de Fischer y para el análisis bivalente de las variables continuas el test de la t de Student o el de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para las comparaciones múltiples, se utilizó el análisis de la varianza o el test de Kruskal-Wallis. Para la aplicación de las pruebas paramétricas se realizaron previamente contrastes de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y de homocedasticidad (tests de Levene).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1: Identificación de epítomos de α -fibrina y β -fibrina

Con el objeto de detectar aquéllos péptidos de la proteína fibrina que fuesen más reactivos frente a sueros positivos para AR (en adelante sueros AR), se procedió a analizar la influencia del grado de deiminización mediante la síntesis de péptidos derivados de la fibrina con distinta relación arginina/citrulina. La identificación de las regiones de las cadenas α -fibrina y β -fibrina que serían empleadas en los ensayos fue llevada a cabo por predicciones de antigenicidad realizadas por ordenador. Se emplearon las escalas de hidrofilia de Hopp y Woods, de accesibilidad de Janin y de antigenicidad de Welling. Además se tuvo en cuenta qué regiones presentaban una mayor probabilidad de formar giros beta y que por tanto se deberían localizar en una zona más externa de la proteína, teniendo con ello una mayor facilidad para interaccionar con los anticuerpos. Los péptidos finalmente fueron sintetizados en fase sólida y caracterizados por su secuencia, HPLC y espectrometría de masas MALDI-Tof.

Estos péptidos fueron ensayados mediante inmunoensayo (ELISA) para determinar su capacidad de reconocer auto-anticuerpos presentes en sueros positivos para AR. Para identificar qué péptidos eran el mejor sustrato para los auto-anticuerpos todos los péptidos sintetizados fueron inicialmente ensayados con 33 sueros positivos para AR y con 40 sueros control. Tal y como se muestra en la Figura 4 se observó un considerable aumento de la sensibilidad para los péptidos p18, p19 y p22 derivados de la cadena α -fibrina, donde la arginina había sido sustituida en la posición 630. Aunque p24 también presenta una citrulina en esta posición específica, se trata de una versión totalmente citrulinada de la región 617-631. De acuerdo con resultados anteriores de los inventores de la presente invención, una carga neta positiva podría ser un factor adicional que contribuyera a la reactividad del péptido. Según la experiencia de los inventores, un adecuado balance de residuos Arg/Cit en los péptidos puede favorecer una conformación con mayor capacidad de unión a los auto-anticuerpos, lo cual mejora su utilidad analítica, diagnóstica y pronóstica.

El resto de péptidos correspondientes a la región 617-631 de la α -fibrina con una arginina sin modificar en la misma posición mostraron una reactividad menor. Para los péptidos derivados de la cadena de β -fibrina, de aquellos obtenidos a partir de la región definida entre las posiciones 43-62, el p38 fue el que ofreció los mejores resultados de absorbancia (DO_{492}), es decir una mayor unión a los auto-anticuerpos.

EJEMPLO 2: Ensayos de detección de auto-anticuerpos mediante péptidos ciclados

Péptidos ciclados de la β -fibrina.

A partir de la región 43-62 de la β -fibrina se procedió a la ciclación de péptidos derivados de dicha región para determinar si este tratamiento, la ciclación, conseguía aumentar su afinidad por los auto-anticuerpos. Así, se prepararon dos versiones de péptidos cíclicos a partir de la región 43-62 de la β -fibrina (Tabla 2). La primera de estas versiones, p38HT (del inglés "*head to tail*" o *cabeza-cola*), se correspondía con el péptido p38 ciclado, que fue obtenido en fase sólida mediante la formación de un enlace amida entre el extremo N-terminal del péptido y el grupo

carboxilo de un residuo Asp introducido en el extremo C-terminal de la secuencia del péptido protegida por el grupo Odmab (del inglés - 4[N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylideno)-3-methylbutylamino]benzyloxy) (Figura 1). La segunda versión de los péptidos preparada, p38SS, fue obtenida mediante sustitución de dos residuos de serina por dos cisteínas en la región 43-62 de la β -fibrina y la ciclación fue llevada a cabo por oxidación en solución de yodo/metanol (Figura 2).

Las dos versiones de péptidos ciclados fue testada por ELISA con 110 sueros positivos para AR y 80 sueros control. Tal y como se muestra en la figura 5, la capacidad de los péptidos lineales para detectar auto-anticuerpos fue significativamente superada por los péptidos cíclicos ($p < 0.05$), aunque entre p38HT y p38SS las diferencias no fueron significativas ($p = 162$).

Péptidos ciclados de la α -fibrina.

Al igual que con la β -fibrina, se desarrollaron péptidos ciclados derivados de la α -fibrina, a partir de aquellos que habían ofrecido unos valores más elevados de antigenicidad, p18, p19 y p22. De este modo, se prepararon dos versiones cicladas de cada uno de los péptidos, una larga y otra corta, según se indica en la Tabla 3, y se ensayaron con 110 sueros positivos para AR y 70 positivos para PsA. Los análisis de curva ROC mostraron unos valores de área bajo la curva (AUC) mayores para los péptidos cíclicos cortos (0.829, 0.745 y 0.703 para p18-sc, p19-sc y p22-sc respectivamente) en comparación con los largos (0.738, 0.703, 0.685 para p18-lc, p19-lc y p22-lc respectivamente). Como se muestra en la Figura 6 los valores más elevados de AUC y sensibilidad ($p = 0.008$) fueron obtenidos para el péptido p22-sc, cuando el tamaño del anillo de ciclación era más pequeño.

Por otro lado, cabe destacar que los péptidos de fibrina empleados en los ensayos no dieron lugar a falsos positivos con muestras positivas para PsA, a diferencia de lo que sucede con otros métodos de detección de AR. Consecuentemente, y tal y como describen diversos autores (21, 22), que afirman que los auto-anticuerpos detectados en el test anti-CCP son más frecuentes poblaciones afectadas por la PsA, los péptidos ciclados de la α -fibrina descritos en este apartado pueden ser de gran relevancia para mejorar los sistemas de detección de AR.

EJEMPLO 3: Ensayos de detección de auto-anticuerpos AR mediante péptidos quiméricos α -fibrina- β -fibrina y fibrina-filagrina.

A partir de los datos de especificidad y selectividad obtenidos para las diferentes regiones de los polipéptidos derivados de la α -fibrina y β -fibrina se procedió al diseño y síntesis en fase sólida de péptidos quiméricos (Tabla 4).

Los análisis ELISA mostraron que los polipéptidos quiméricos α -fibrina y β -fibrina analizados por curvas ROC ofrecían unos valores de AUC moderadamente más elevados que los correspondientes a péptidos monoméricos (Fig. 7). Sorprendentemente, cuando los mismos ensayos se realizaron con polipéptidos quiméricos fibrina-filagrina, donde el péptido de filagrina se encontraba ciclado, los resultados de sensibilidad y especificidad fueron mejores.

Para la elaboración de este último ensayo se elaboraron dos péptidos: cfc1cyc, perteneciente al grupo de los péptidos conocidos como CCP-1 (15), y p18-cfc1cyc, resultante de la unión covalente del primero con p18. La relación entre la sensibilidad y especificidad de ambos péptidos se presenta en la Figura 8. La sensibilidad del ELISA con p18-cfc1cyc fue del 82%, significativamente más elevada que la alcanzada por el ELISA con cfc1cyc (65,8%; $p = 0.002$). La especificidad fue muy elevada en ambos casos (93%). Esta elevada sensibilidad sin pérdida de especificidad es bastante relevante teniendo en cuenta que el grupo empleado como control consistía en pacientes afectados por PsA, una enfermedad inflamatoria con un cuadro clínico que puede simular la AR. Por otro lado, la frecuencia de auto-anticuerpos contra el polipéptido p18-cfc1cyc (6%) en la población control (PsA) es similar a la descrita por otros autores que emplean el test comercial basado en CCP-2, habiéndose reportado una prevalencia de un 5.6-7.8%.

EJEMPLO 4: Ensayos de detección de auto-anticuerpos AR polipéptidos quiméricos mediante mezclas de péptidos.

Con el objetivo de mejorar los métodos de detección de AR basados en péptidos derivados de la fibrina, se prepararon diferentes mezclas de los mismos.

Se empleó un panel de 23 muestras de suero para las que el test comercial basado en CCP-2 había ofrecido resultados negativos y se estudió su reactividad frente a diversas mezclas de péptidos escogidos de entre los que habían resultado antigénicamente más relevantes (Tabla 5). Estas mezclas de péptidos fueron únicamente capaces de detectar 4 de las 23 muestras AR positivas. Sin embargo, el polipéptido quimérico p18-cfc1cyc fue capaz de detectar auto-anticuerpos AR en 8 sueros, alcanzándose por lo tanto una reactividad del 33% frente a unos máximos del 21% y 17% obtenidos con el resto de métodos ensayados. Estos resultados demuestran que los péptidos quiméricos fibrina-filagrina son capaces de mejorar la sensibilidad de los métodos de detección de AR.

Tabla 5:

Muestra de suero	p38*	p18cfc1cyc**	α -fib+ β -fib+ cfc1cyc
1	+	+	-
2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	+	+
9	-	+	+
10	-	+	+
11	-	-	-
12	-	+	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	+	+	-
20	-	+	-
21	-	-	-
22	+	-	-
23	-	-	-
(4/23) 17% (8/23) 34.8% (4/23) 17%			

* p38: péptido derivado de la β -fibrina

** p18cfc1cyc: polipéptido quimérico α -fibrina- β -fibrina

Es importante mencionar que los polipéptidos quiméricos fibrina-filagrina y, más concretamente, el polipéptido p18-cfc1cyc, han sido capaces de ofrecer resultados de sensibilidad superiores a los de cfc1cyc e incluso de detectar sueros positivos para AR allí donde el test CCP-2 ofrecía falsos negativos. De hecho, más del 46% de los sueros negativos para el test CCP-2 reaccionó con p18-cfc1cyc y/o p38, indicando que los péptidos derivados de fibrina y los polipéptidos quiméricos fibrina-filagrina pueden permitir el desarrollo de tests de detección de auto-anticuerpos de AR con mejores resultados que los tests anteriores a la presente invención.

Durante la realización de estos ensayos se comprobó incluso la existencia de una correlación entre p18-cfc1cyc y CCP-2, tal y como se muestra en la Figura 9 ($r=0.86$, $p<0.001$). Estos resultados refuerzan la utilidad de los péptidos fibrina-filagrina para robustecer los métodos diagnósticos y pronósticos de la AR.

EJEMPLO 5: Sensibilidad y especificidad diagnóstica de los anticuerpos anti-CCP2 y antipéptidos citrulinados quiméricos (fibrina/filagrina) (antiquiméricos fb/f (fibrina/filagrina))

Para llevar a cabo este análisis se determinaron los valores de los autoanticuerpos anti-CCP2 y anti-quiméricos fb/f (p18, p19, p22) por la técnica de ELISA. Para ello, se emplearon pacientes con artritis reumatoide (AR) (criterios de la ACR, 1987) ($n = 322$) y controles del banco de sangre del Hospital Clínico ($n = 307$) de cara a evaluar su sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo para el diagnóstico de AR. Para ello se efectuó un análisis de curvas ROC que demuestra con una especificidad del 98%, los siguientes valores de línea de corte o cutoff para los diferentes antígenos:

Anti-CCP2: 29 UI/l
 Anti-quimérico fb/f – p18: 0.241
 Anti-quimérico fb/f – p19: 0.229
 Anti-quimérico fb/f – p22: 0.280

A continuación se detallan las curvas ROC para el diagnóstico de AR entre las poblaciones con AR (n = 322) y población control del banco de sangre (n= 307).

Tabla 6: Curva ROC para anti CCP2

Sensibilidad	238/322	73.91%
Especificidad	301/307	98.05%
Valor predictivo positivo	238/244	97.54%
Valor predictivo negativo	301/385	78.18%

Ver fig. 10

Tabla 7: Curva ROC para anti-quimérico fb/f-p18

Sensibilidad	232/322	72.05%
Especificidad	301/307	98.05%
Valor predictivo positivo	232/238	97.48%
Valor predictivo negativo	301/391	76.98%

Ver fig. 11

Tabla 8: Curva ROC para anti-quimérico fb/f-p19

Sensibilidad	251/322	77.95%
Especificidad	301/307	98.05%
Valor predictivo positivo	251/257	97.67%
Valor predictivo negativo	301/372	80.91%

Ver fig. 12

Tabla 9: Curva ROC para anti-quimérico fb/f-p22

Sensibilidad	230/322	71.43%
Especificidad	303/307	98.70%
Valor predictivo positivo	230/234	98.29%
Valor predictivo negativo	303/395	76.71%

Ver fig. 13

Con este ensayo, se vuelve a demostrar que en el suero de pacientes con AR existen anticuerpos que reaccionan contra péptidos citrulinados quiméricos fibrina/filagrina, reforzando la idea de que los epítomos de la cadena alfa de la fibrina humana, presente en la sinovial reumatoide podrían constituirse en los principales antígenos que desencadenen la respuesta inmunológica con la formación de estos auto-anticuerpos, en pacientes con AR.

En el análisis de sensibilidad/especificidad de estos anticuerpos, se ha demostrado que tienen una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de AR. De hecho, empleando una población de 322 pacientes con AR y 307 controles (banco de sangre) y manteniendo una especificidad del 98%, la sensibilidad de los tres péptidos quiméricos fibrina/filagrina (fb/f) (p18, p19, p22) ha sido del 72%, 78% y 71% respectivamente, una sensibilidad pareja a la observada con los anti-CCP-2 comerciales (74%). De forma interesante, y aunque la correlación entre los diferentes anticuerpos es muy estrecha, hay un porcentaje notable de discrepancias entre ellos (entre 13-15% de sueros discordantes), lo que manifiesta que la determinación de más de un anticuerpo incrementa la sensibilidad (hasta un 81%) sin prácticamente perder especificidad (96-97%).

De hecho, se observa un número relativamente importante de pacientes con valores no concordantes. El 13.9% de los pacientes tienen discrepancias en la positividad del anticuerpo CCP-2 y el anti-quimérico fb/f p-18.

Tabla 10

	Quimérico fb/f-p18 -	Quimérico fb/f-p18+	Total
CCP-2 -	22	8	30
CCP-2 +	6	65	71

5 Cuando se efectúa el análisis entre anti-CCP-2 y los anticuerpos contra péptidos quiméricos fb/f p-19 y p-22, se observan también discrepancias del 13.3% y del 15.3% respectivamente. Incluso entre los tres anticuerpos quiméricos fb/f, el nivel de discrepancias es también de 13.9%, con un mayor número de sueros discrepantes positivos por anticuerpos quiméricos fb/f, tal como se ilustra en la Tabla 11:

Tabla 11

	Quiméricos fb/f -	Quiméricos fb/f +	Total
CCP2-	18	12	30
CCP2 +	2	69	71

10 EJEMPLO 6: Sensibilidad/Especificidad de los anticuerpos frente a péptidos citrulinados (CCP-2 y quiméricos fb/f) en diferentes patologías

15 Posteriormente y utilizando los puntos de corte calculados para definir la positividad a través de las curvas ROC entre pacientes con AR y el grupo control del banco de sangre, se han estudiado sueros de pacientes de tres patologías diferentes:

1. Lupus eritematoso sistémico (LES): n = 119
2. Artritis psoriásica: (PsA): n = 133
3. Hepatitis crónica por virus de la hepatitis C (HCVC): n = 84

25 La sensibilidad o positividad de los diferentes anticuerpos es muy baja en las tres patologías, lo que de acuerdo con la Tabla 12, demuestra la especificidad de los cuatro anticuerpos utilizados y su valor en el diagnóstico de la AR. En dicha tabla se muestran los datos referentes a la especificidad de los anticuerpos anti-CCP-2 y anti-quiméricos fb/f p18

Tabla 12

	Anti CCP2	Antiquimérico fb/f-p18
LES	110/119 (92.4%)	109/119 (91.6%)
Artritis psoriásica	129/133 (98%)	130/133 (97.7%)
Hepatitis crónica virus C	82/84 (97.6%)	82/84 (97.6%)

30 Tal y como se puede comprobar en la tabla, la especificidad es muy alta (97-98%), tanto con los anti-CCP-2 como en los quiméricos en las patologías artritis psoriásica y hepatitis crónica por virus C, con muy pocos casos falsos positivos.

35 Por tanto, en este estudio de especificidad de los diferentes auto-anticuerpos en otras patologías donde se observan fenómenos autoinmunitarios (Lupus eritematoso sistémico, hepatitis crónica por virus C) o que tienen un cuadro clínico similar a la AR (artritis psoriásica), queda claramente comprobado que los anticuerpos anti-quiméricos fb/f son sumamente específicos.

40 EJEMPLO 7: SIGNIFICADO PRONÓSTICO

45 El objetivo de este análisis era analizar el valor pronóstico de los anticuerpos citrulinados derivados de dominios de fibrina humana en la AR y compararlo con los que se determinan en la práctica clínica con el kit comercial de segunda generación (CCP2, Eurodiagnostica). Tal y como ya se ha visto a lo largo de la presente invención, los péptidos que han demostrado un mejor balance sensibilidad/especificidad son los quiméricos fb/f p18, p19 y p22; es por esto que son éstos los que se han empleado para el estudio sobre su significación pronóstica.

50 Para efectuar el presente análisis se han estudiado 118 pacientes con AR de más de dos años de evolución y que después de iniciar un protocolo terapéutico con fármacos antirreumáticos, han estado en seguimiento durante dos años. Se ha tomado como medida de desenlace principal el grado de destrucción articular (progresión radiológica) al final de los dos años de seguimiento. Se ha podido comprobar que diferentes variables clínicas, biológicas e inmunogenéticas han estado asociadas a una mayor destrucción articular, entre ellas la presencia de anticuerpos específicos frente a péptidos citrulinados cíclicos. Especialmente en el caso de los anticuerpos anti-CCP-2 y el antiquimérico fb/f p18, se ha asociado de manera más clara su presencia en el momento basal a una mayor lesión

radiológica a los dos años de seguimiento.

No obstante, es muy importante resaltar que aquellos pacientes anti CCP-2 negativos pero positivos para los anticuerpos, mostraban un grado de destrucción articular similar a los antiCCP positivos, demostrando que estos anticuerpos pueden dar información pronóstica adicional.

A continuación se aportan los datos obtenidos para llegar a las conclusiones ya comentadas. En primer lugar se aportan las diferentes características de los pacientes analizados:

10	Mujeres (%)	82.2
	Edad (años), $\pm$ S.D.	53.8 $\pm$ 15
	Duración enfermedad (meses), $X \pm$ S.D.	10 $\pm$ 6.7
	Dolor EAV (mm), $X \pm$ S.D.	50.6 $\pm$ 21
	VGPaciente (mm), $X \pm$ S.D.	57.6 $\pm$ 15.8
15	VGMedio (mm), $X \pm$ S.D.	55.7 $\pm$ 14
	NAD28, $X \pm$ S.D.	9.8 $\pm$ 5.5
	NAI28, $X \pm$ S.D.	8.1 $\pm$ 4.2
	DAS 28, $X \pm$ S.D.	5.7 $\pm$ 0.9
	DAS 28 > 5.1 (%)	75.4
20	mHAQ, $X \pm$ S.D.	0.9 $\pm$ 0.5
	VSG (mm/h), $X \pm$ S.D.	39.7 $\pm$ 24.4
	CRP (mm/dL), $X \pm$ S.D.	2.8 $\pm$ 2.3
	Hemoglobina (mg/dL), $X \pm$ S.D.	12.7 $\pm$ 1.4
25	Factor reumatoide positivo (>25U)	73.7
	Anti-CCP-2 positivo (>50 U) (%)	69.7
	Epitopo reumatoide (%)	72.5
	Epitopo reumatoide homocigoto (%)	19.3
	HLA-DRB1-04 (%)	44.5

En cuanto a la detección de anticuerpos específicos frente a péptidos citrulinados sintéticos quiméricos en este ensayo (anticuerpos fb/f) (ELISA), los resultados fueron los siguientes:

Tabla 13

Antiquimérico fb/f-p18 (n=112)	72.3%
Antiquimérico fb/f-p19 (n=109)	75.5%
Antiquimérico fb/f-p22 (n=109)	73.5%

En la Tabla 14 se pueden observar los valores del daño radiológico (basal y a los dos años) en función de la presencia o ausencia de los diferentes auto-anticuerpos específicos frente a los péptidos citrulinados.

Tabla 14

	CCP-2+ (n=74)	CCP-2- (n=35)	Q-p18+ (n=84)	Q-p18- (n=17)	Q-p19+ (n=80)	Q-p19- (n=18)	Q-p-22+ (n=85)	Q-p-22- (n=13)
Larsen basal	1.5 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.4*	0.3 $\pm$ 0.2*	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3
Larsen final	6.9 $\pm$ 1.2*	3.5 $\pm$ 1.3	7 $\pm$ 1.2**	3.1 $\pm$ 1.1**	6.5 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 1	5.4 $\pm$ 2.2
Delta Larsen	5.4 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 1.2	5.4 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 1.1	5 $\pm$ 1.8	3.8 $\pm$ 1.8	5 $\pm$ 2.2	4.6 $\pm$ 0.9

*:p=0.006; **:p=0.022. Delta: valor de la diferencia entre Larsen final y basal.

Tal y como ya se ha mencionado para valorar la capacidad pronóstica de las diferentes variables a la hora de predecir la destrucción articular, se catalogó la presencia de progresión de la destrucción, cuando al final del seguimiento (24 meses) hubo un incremento en el valor de Larsen superior o igual a 4 puntos (entre el mes 0 y el mes 24). Siguiendo este criterio, 39 de los 118 pacientes (33%) presentaron progresión de la destrucción articular y 79 (67%) no.

Por otro lado, el análisis bivalente de los tres anticuerpos contra péptidos citrulinados quiméricos (antiquiméricos fb/f) dio lugar a los resultados que se exponen en la Tabla 15.

Tabla 15

Anti péptidos quiméricos	No progresión	progresión	valor de p
Antiquimérico fb/f-p18+	65.7%	85.3%	0.037
Antiquimérico fb/f-p19+	70.8%	84.8%	0.126
Antiquimérico fb/f-p22+	69.2%	81.8%	0.182

Estos resultados demuestran que la proporción de pacientes con anticuerpos contra péptidos citrulinados quiméricos fibrina/filagrina es más elevada en pacientes con progresión radiológica que en pacientes que no la presentan. Es más, si atendemos a los resultados ya expuestos en el ejemplo 5 cuando se analizan los datos de progresión radiológica entre pacientes antiCCP-2 positivos y negativos (con antiquiméricos fb/f positivos o negativos), se observa cómo el comportamiento del grupo CCP-2-/quimérico+ es similar al grupo CCP-2+ (es decir, con mayor progresión radiológica) y no al grupo CCP-2-. Esto indica que la presencia de estos anticuerpos quiméricos determinan una mayor progresión radiológica, también en pacientes antiCCP-2 negativos. De ahí, la importancia en el diagnóstico y en el pronóstico de la enfermedad de la utilización de los péptidos quiméricos de la presente invención.

Por tanto, se puede comprobar a raíz de estos datos, como los anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos, especialmente los anticuerpos anti CCP-2 y el antiquimérico fb/f p18, están asociados a una mayor destrucción articular y como su presencia en el momento basal va asociada a una mayor lesión radiológica a los dos años de seguimiento.

EJEMPLO 8: Análisis de la asociación entre anticuerpos contra péptidos citrulinados y genotipo HLADRB.

En la Tabla 16 se puede observar la frecuencia de los diferentes alelos DRB04 y DRB03, así como del epitopo reumatoide en pacientes con anticuerpos específicos frente a péptidos citrulinados.

Tabla 16

	CCP-2+	CCP-2-	p	Quimérico-fb/f-p18 +	Quimérico-fb/f-p18 -	p
DRB04	54.2%	17.2%	0.001	52.2%	20.8%	0.008
DRB04 homocigoto	6.9%	0%	NS	5.8%	0%	NS
Epitopo reumatoide	81.9%	48.3%	0.001	78.3%	62.5%	NS
Epitopo reumatoide homocigoto	25%	3.4%	0.012	23.2%	0%	0.009
DRB03	11.6%	14.3%	NS	11.9%	13%	NS

En la tabla 16 se demuestra la asociación entre DRB04 y los anticuerpos antiCCP-2 y antiquimérico fb/f p18.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> Polipéptido quimérico fibrina-filagrina citrulinado capaz de detectar los anticuerpos generados en la artritis reumatoide

<130> ES1641.8

10 <160> 9

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial (cfc1cyc)

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X = Citrulina

25 <400> 1

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

30

Gly Arg Ser Gly Ser
20

35

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial (p18)

40

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

45 <223> X = citrulina

<400> 2

His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Arg Pro Val Xaa Gly
1 5 10 15

50 <210> 3

<211> 15

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial (p19)

60 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X = citrulina

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = citrulina

5 <400> 3

His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Xaa Pro Val Xaa Gly
 1 5 10 15

10

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial (p22)

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = citrulina

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = citrulina

25

<400> 4

His Ser Thr Lys Xaa Gly His Ala Lys Ser Arg Pro Val Xaa Gly
 1 5 10 15

30

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial (p38)

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = citrulina

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X = citrulina

45

<400> 5

50

Ala Arg Gly His Xaa Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser
 1 5 10 15

55

Leu Xaa Pro Ala
 20

60

<210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial (p18-cfc1cyc)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X = citrulina
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> X = citrulina
 10
 <400> 6
 His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Arg Pro Val Xaa Gly His
 1 5 10 15
 15
 Gln Cys His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Arg Ser Arg Gly Arg Cys Gly
 20 25 30
 20
 Arg Ser Gly Ser
 35
 25
 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(19)
 <223> region 306-324 de la proteina filagrina
 35
 <400> 7
 Ser His Gln Glu Ser Thr Arg Gly Arg Ser Arg Gly Arg Ser Gly Arg
 1 5 10 15
 40
 Ser Gly Ser
 45
 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 50
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(15)
 <223> región 617-631 de la alfa fibrina
 55
 <400> 8
 60
 His Ser Thr Lys Arg Gly His Ala Lys Ser Arg Pro Val Arg Gly
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 20

<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(20)
<223> región 43-62 de la beta fibrina

10 <400> 9

Ala Arg Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser
1 5 10 15

15 Leu Arg Pro Ala
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido quimérico, que comprende al menos dos subunidades peptídicas citrulinadas (a) y (b), unidas covalentemente, que tiene sustituido al menos una arginina de cada subunidad peptídica por citrulina, donde:
 - 10 a. la subunidad (a) tiene al menos un 85% de homología con un fragmento citrulinado de al menos 7 amino ácidos:
 - i. del fragmento SEQ ID NO: 8 que va de la posición 617 a 631 de la proteína α -fibrina, y donde al menos la arginina ha sido sustituida por citrulina en la posición 630, o
 - ii. del fragmento SEQ ID NO: 9 que va de la posición 43 a 62 de la proteína β -fibrina, y
 - b. la segunda subunidad (b) está ciclada entre al menos dos aminoácidos cisteína formando un puente disulfuro, y tiene al menos un 85% de homología con un fragmento citrulinado de al menos 7 aminoácidos de la proteína filagrina,
- 15 donde dicho polipéptido quimérico es capaz de interactuar con anticuerpos autoinmunes generados durante la artritis reumatoide.
- 20 2. Polipéptido quimérico según la reivindicación 1, donde la subunidad (b) se obtiene del fragmento SEQ ID NO: 7 que va de la posición 306 a 324 de la proteína filagrina.
3. Polipéptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la subunidad (b) comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 4. Polipéptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la subunidad (a) comprende una secuencia seleccionada entre:
 - 30 a. SEQ ID NO:2 ,
 - b. SEQ ID NO:3,
 - c. SEQ ID NO:4, o
 - d. SEQ ID NO:5.
5. Polipéptido quimérico según la reivindicación 4, donde la subunidad (a) está ciclada entre al menos dos aminoácidos cisteína formando un puente disulfuro.
- 35 6. Polipéptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polipéptido quimérico es SEQ ID NO: 6.
7. Composición que comprende un polipéptido quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Método para la detección de auto-anticuerpos específicos de la artritis reumatoide en una muestra biológica que comprende:
 - 45 a. Poner en contacto la muestra biológica con al menos uno de los polipéptidos quiméricos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 ó la composición de la reivindicación 7, y
 - b. Detectar la interacción entre los auto-anticuerpos específicos y los polipéptidos quiméricos o la composición del paso (a).
- 50 9. Kit de diagnóstico o pronóstico de la artritis reumatoide que comprende al menos uno de los polipéptidos quiméricos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de la reivindicación 7, y los reactivos y/o tampones necesarios para permitir la formación del complejo anticuerpo-antígeno.

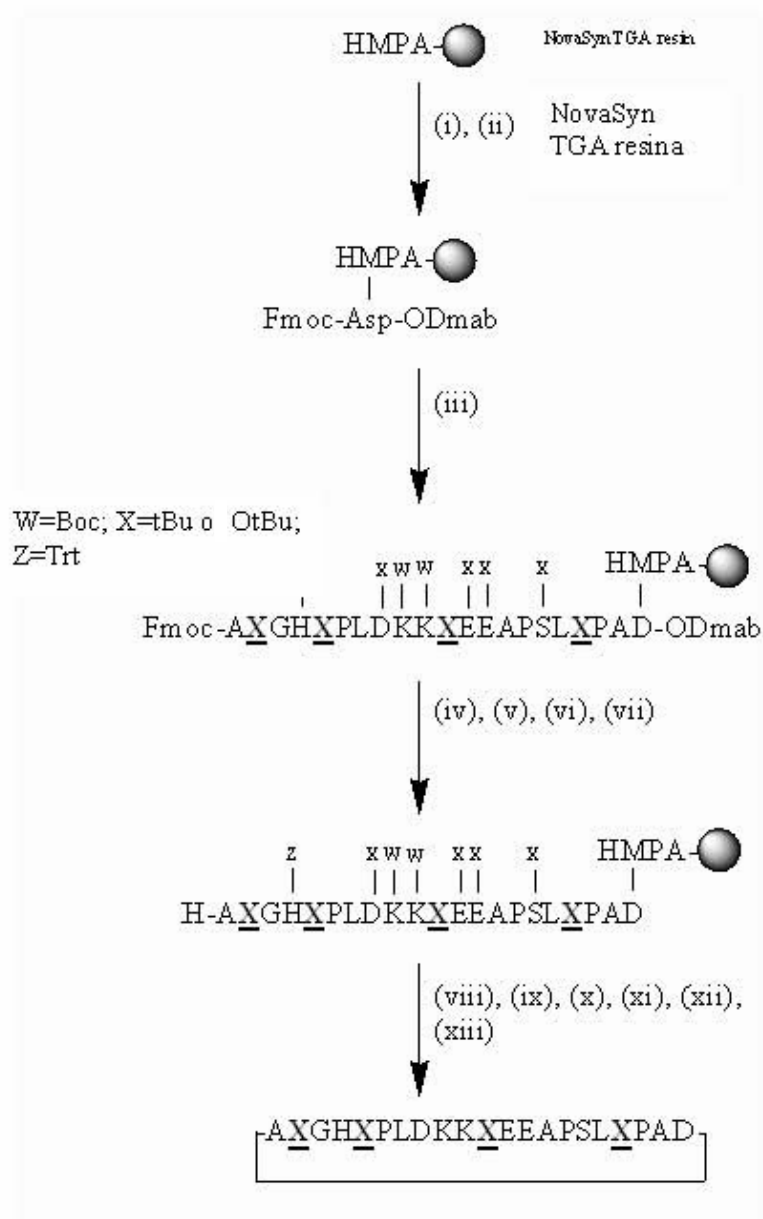
FIG. 1

FIG. 2

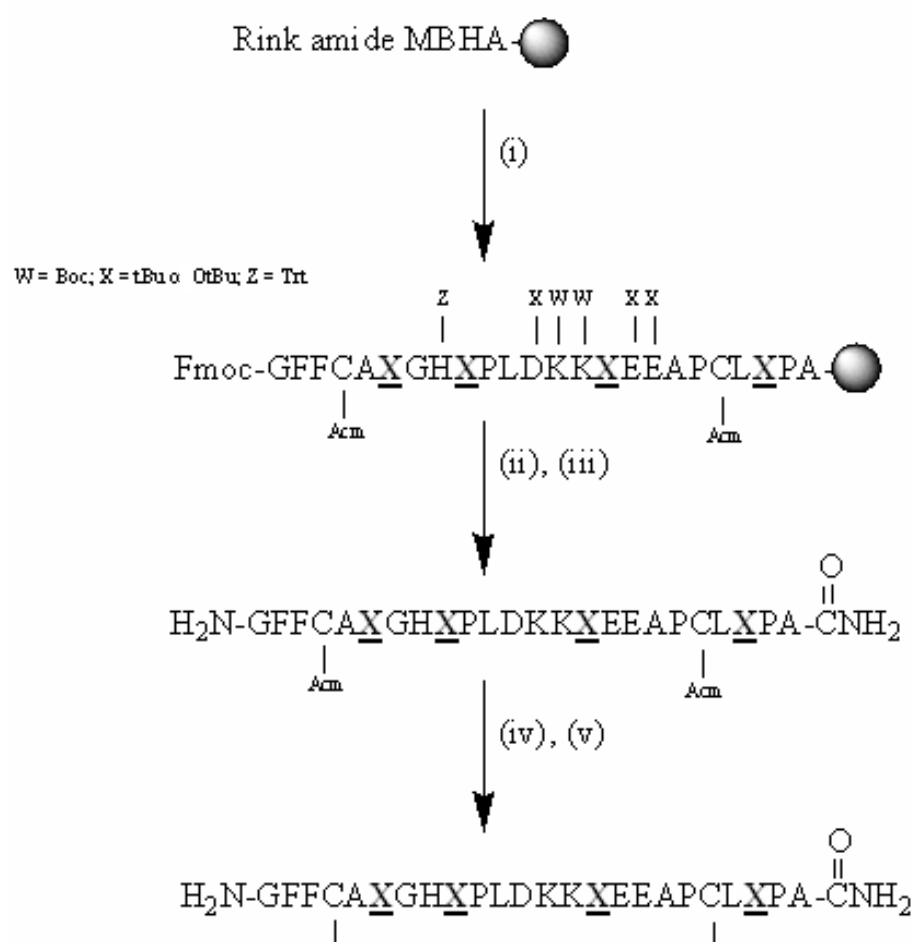


FIG. 3A

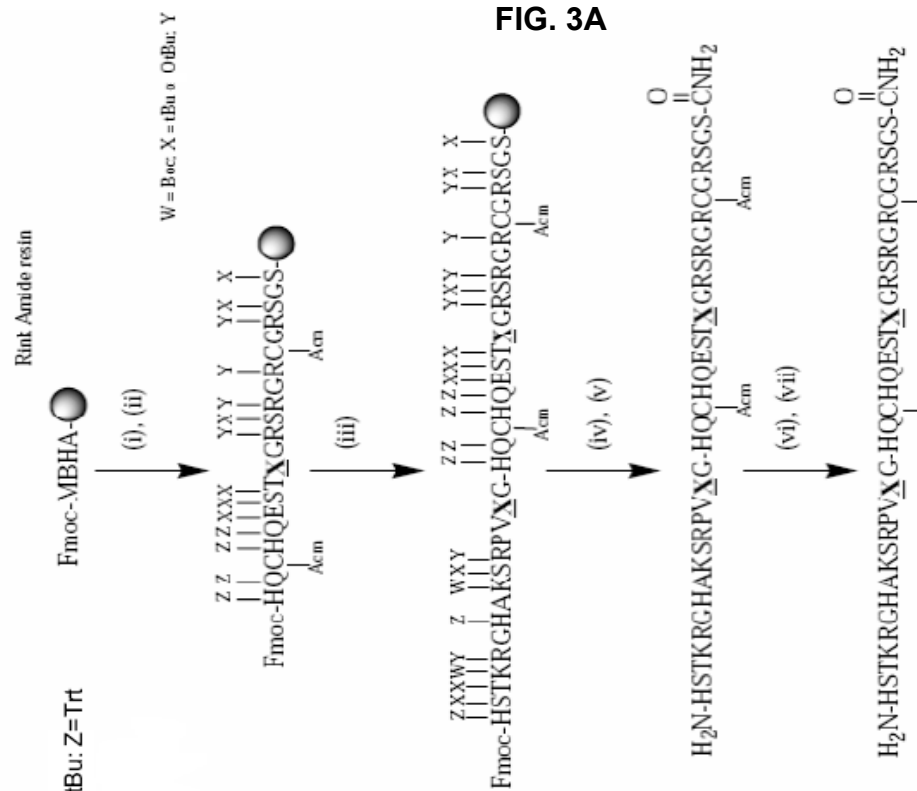


FIG. 3B

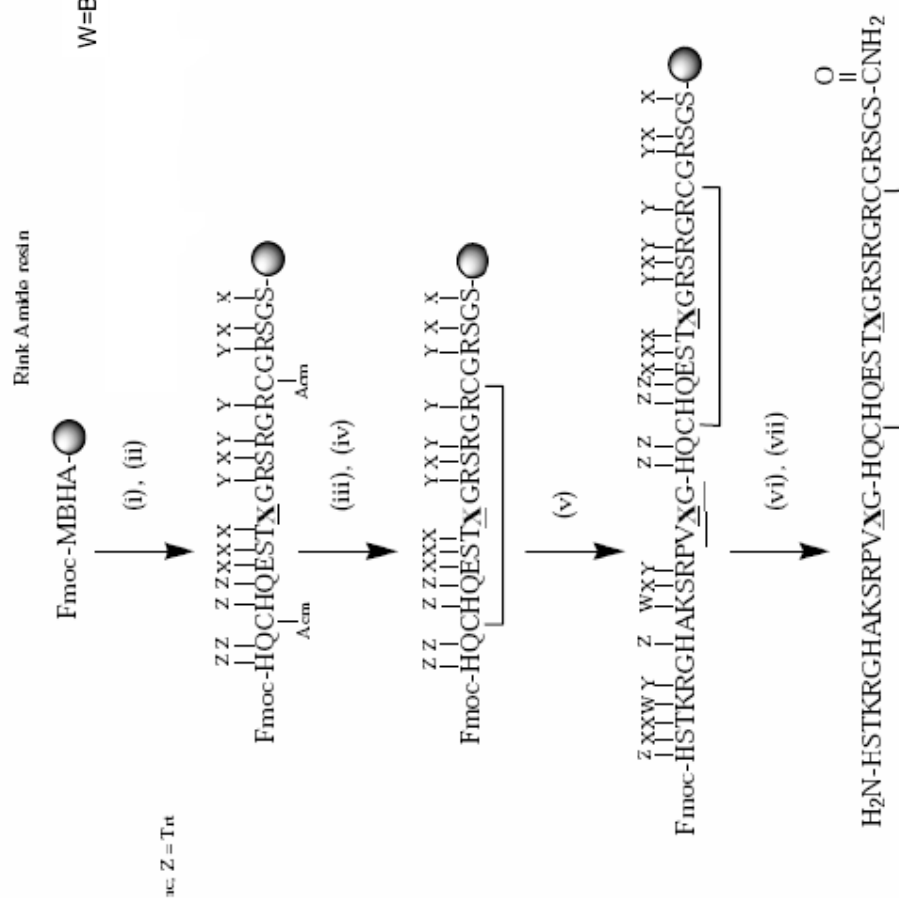


FIG. 4

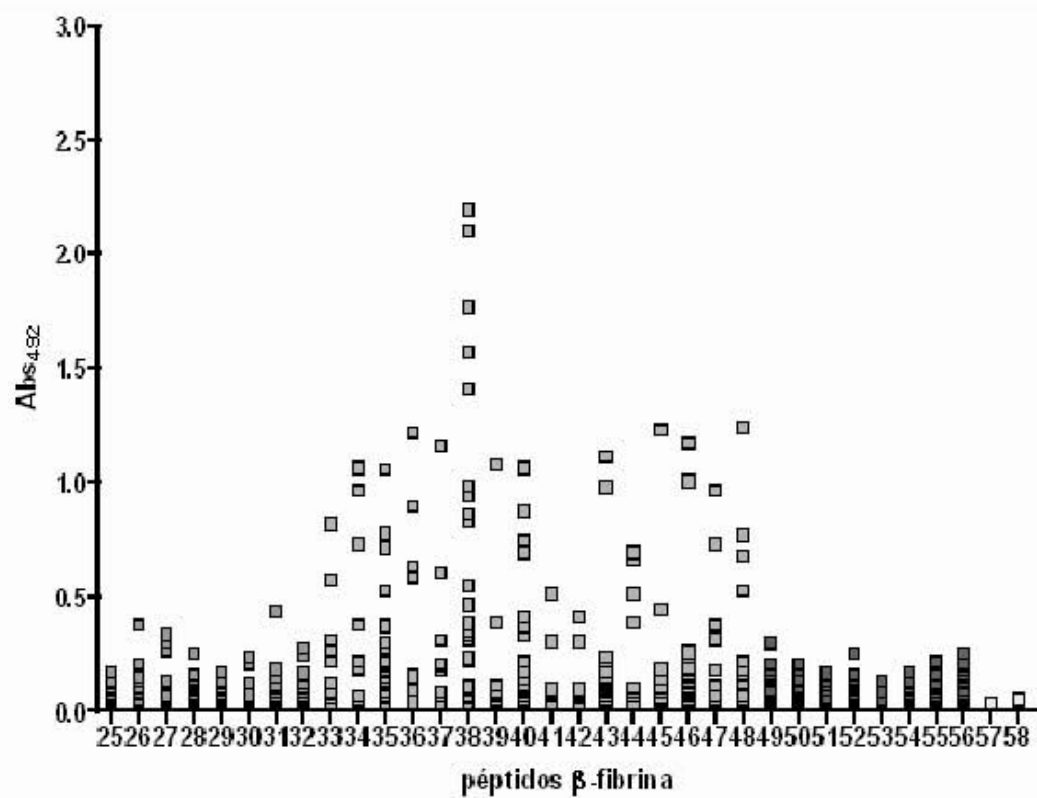
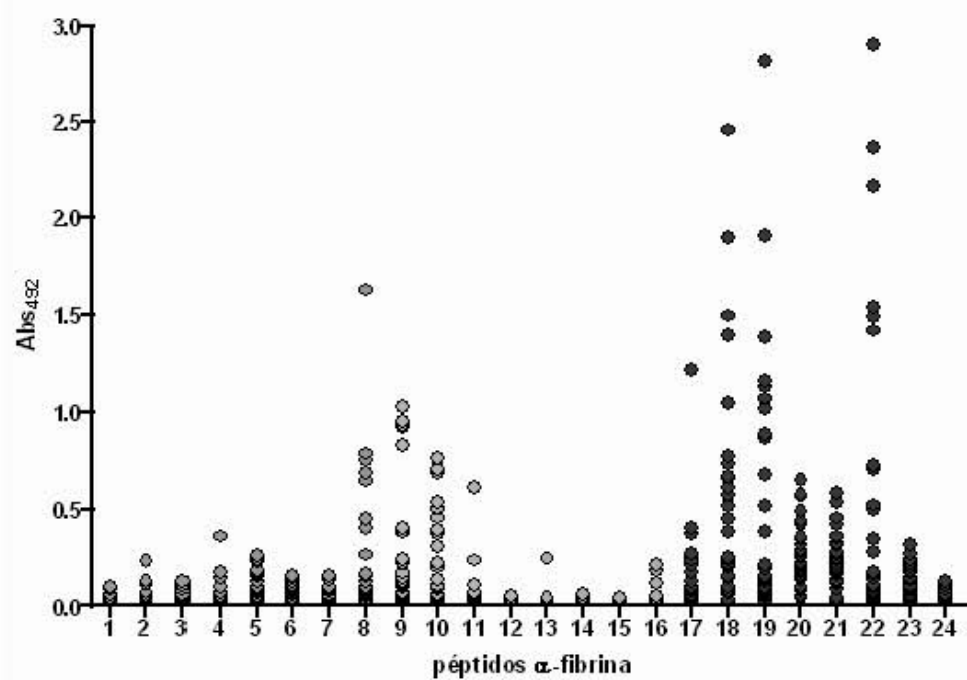


FIG. 5

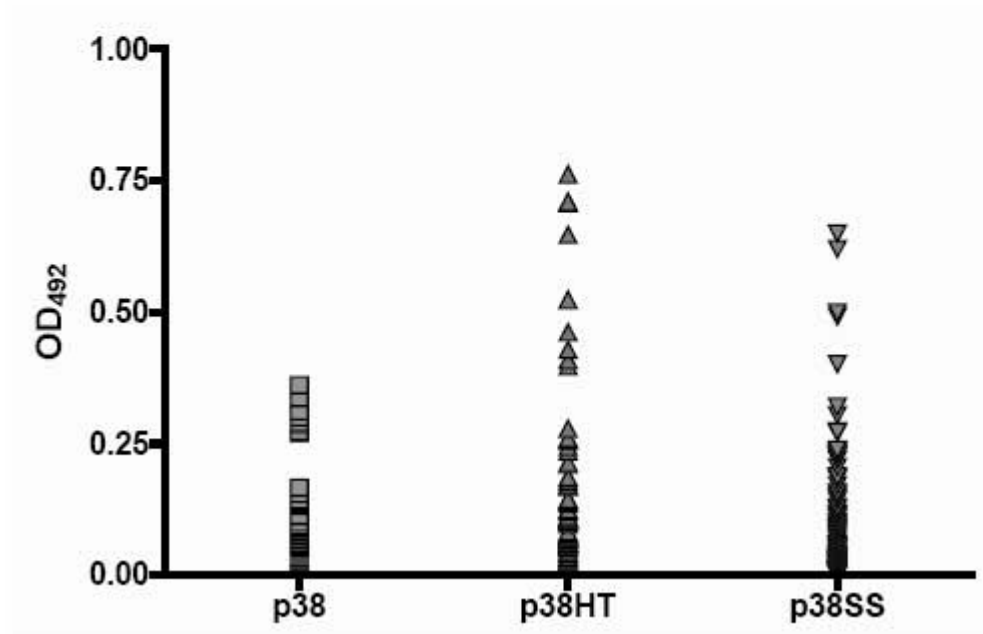
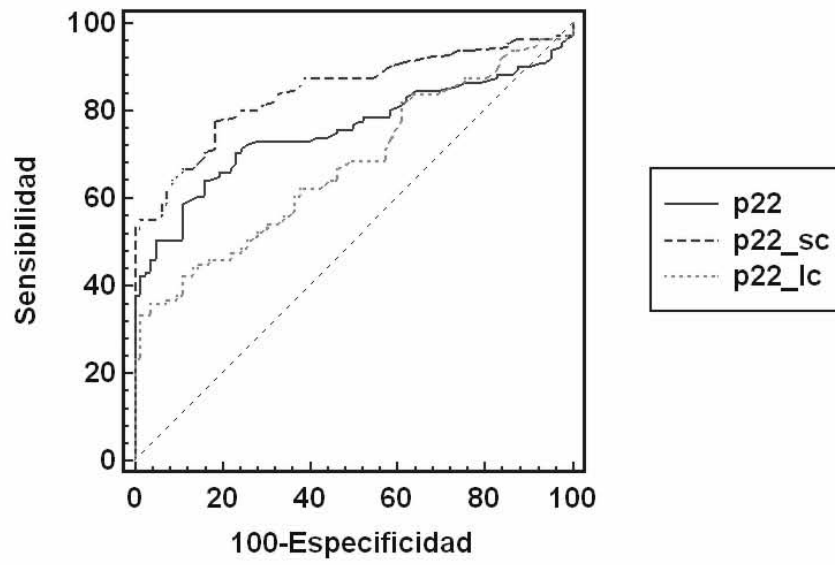


FIG. 6

A



B

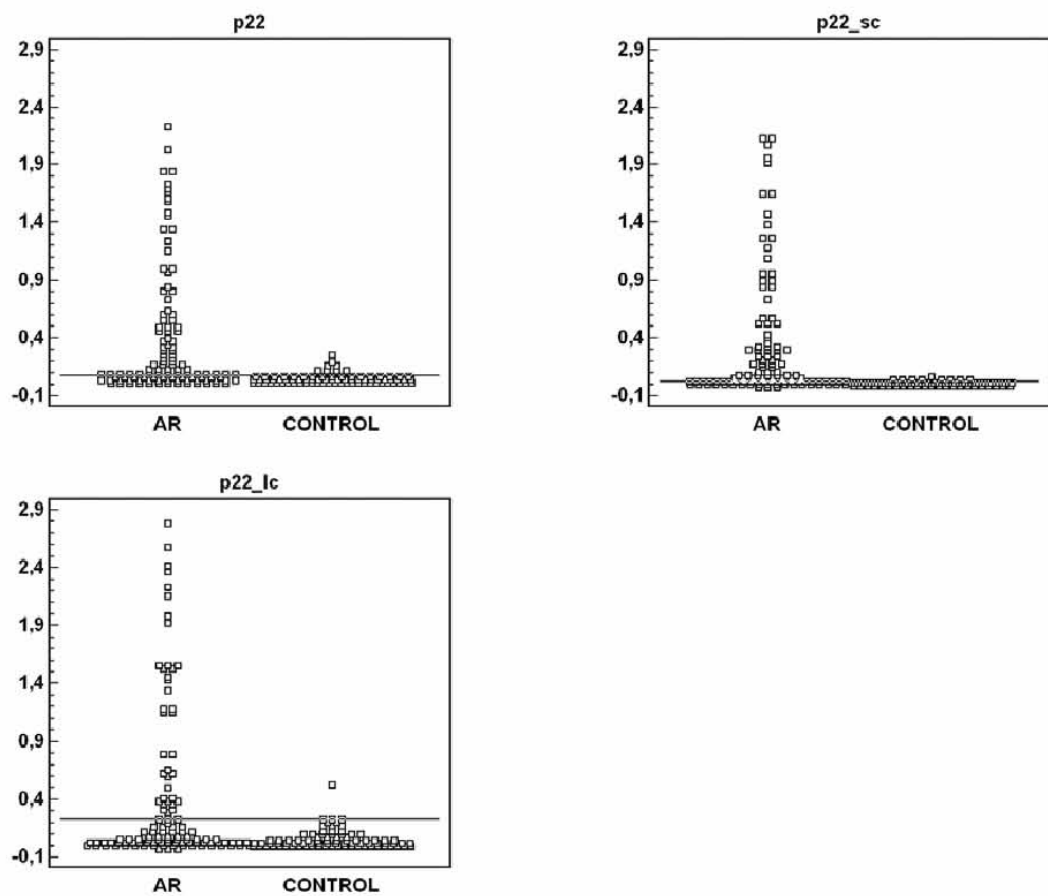
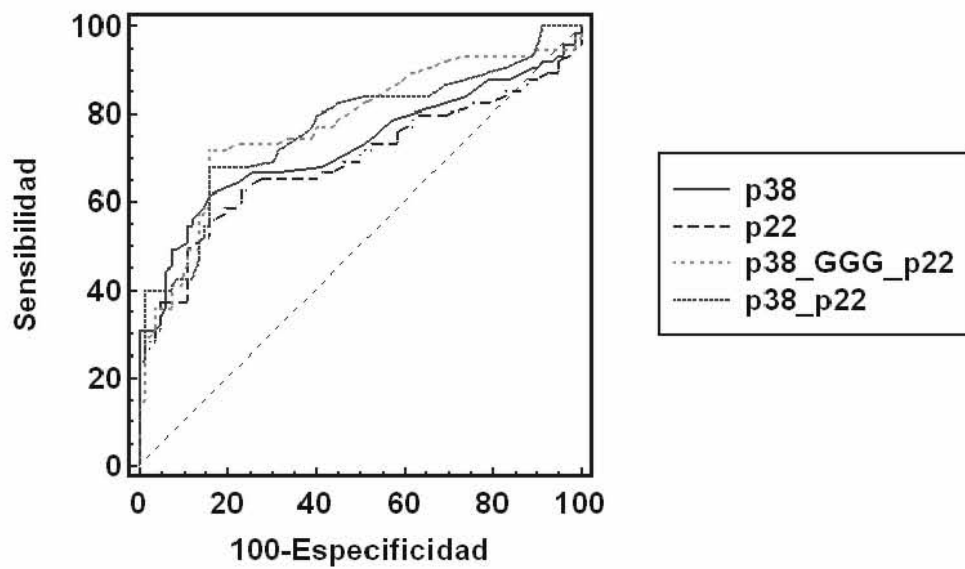


FIG. 7

A



B

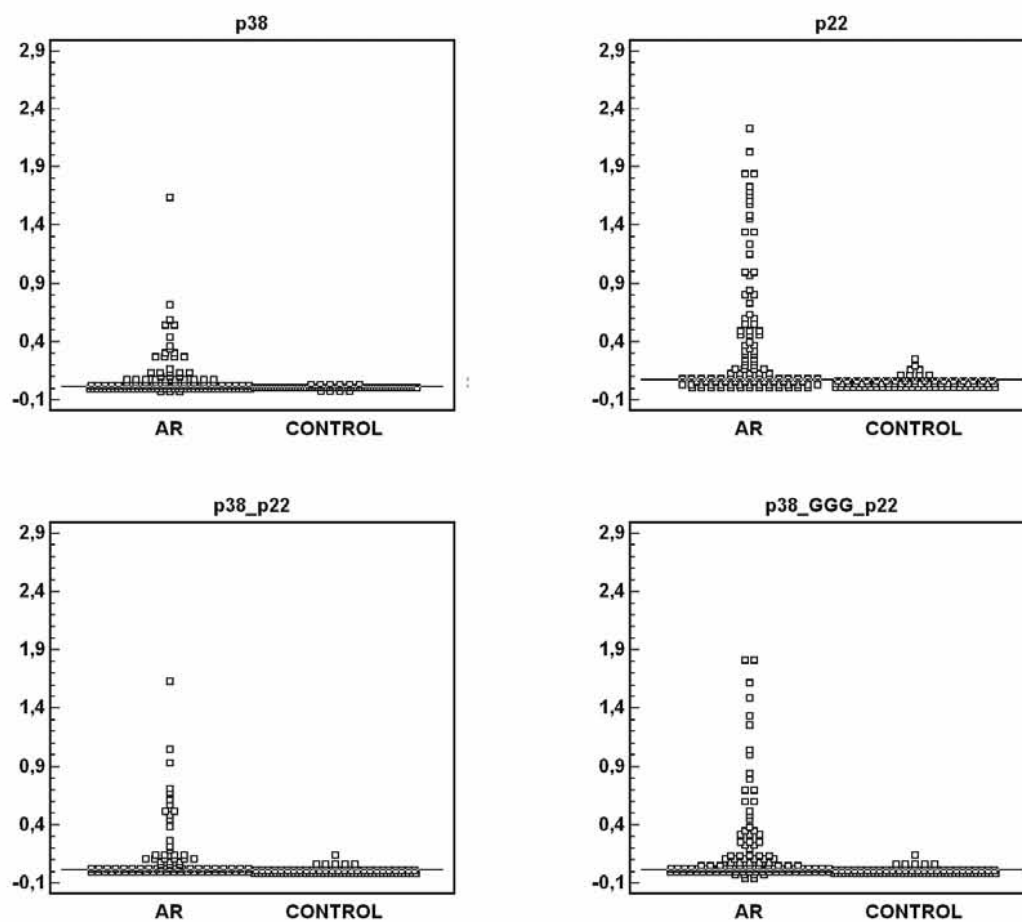
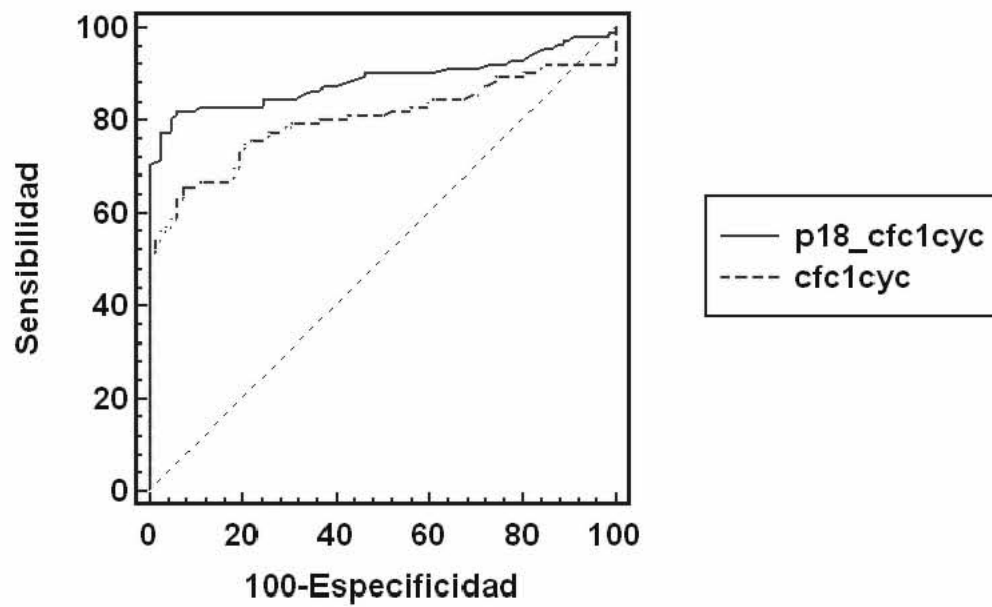


FIG. 8

A



B

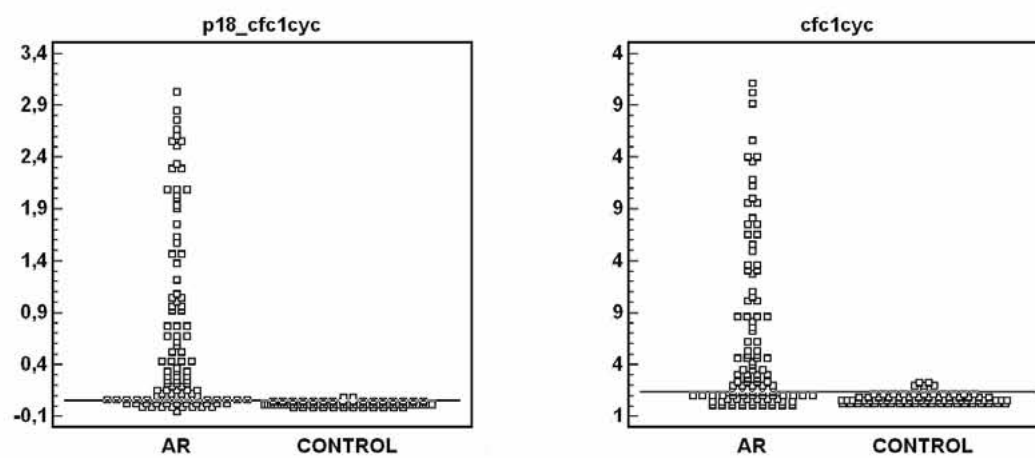


FIG. 9

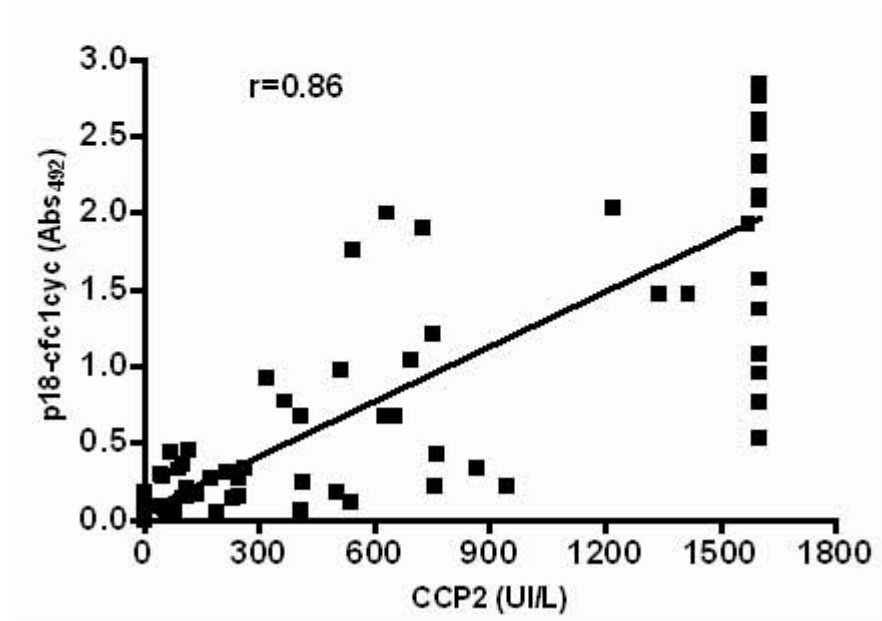


FIG 10

Curva ROC

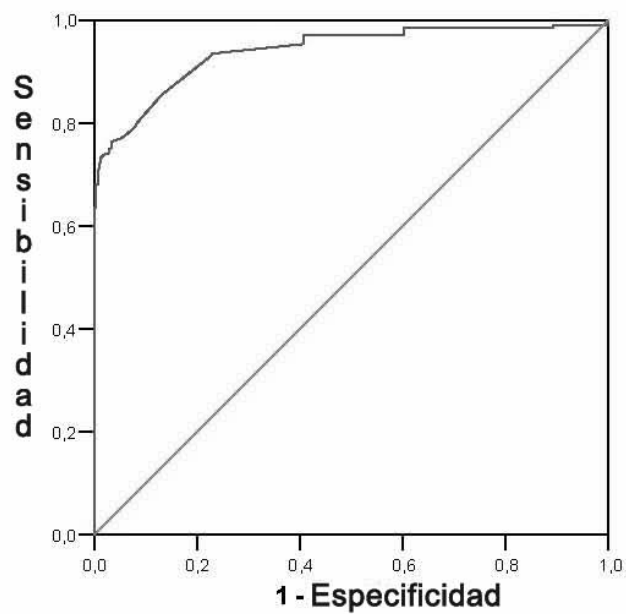


FIG 11

Curva ROC

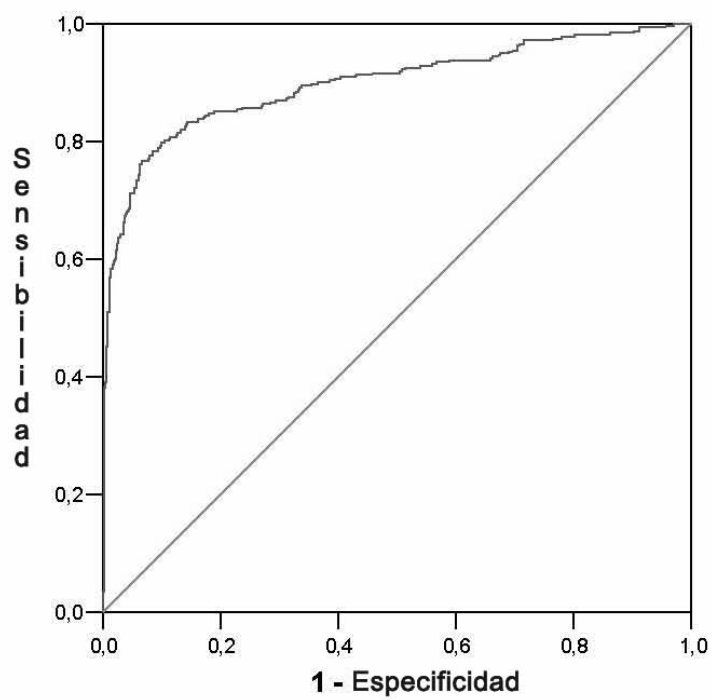


FIG 12

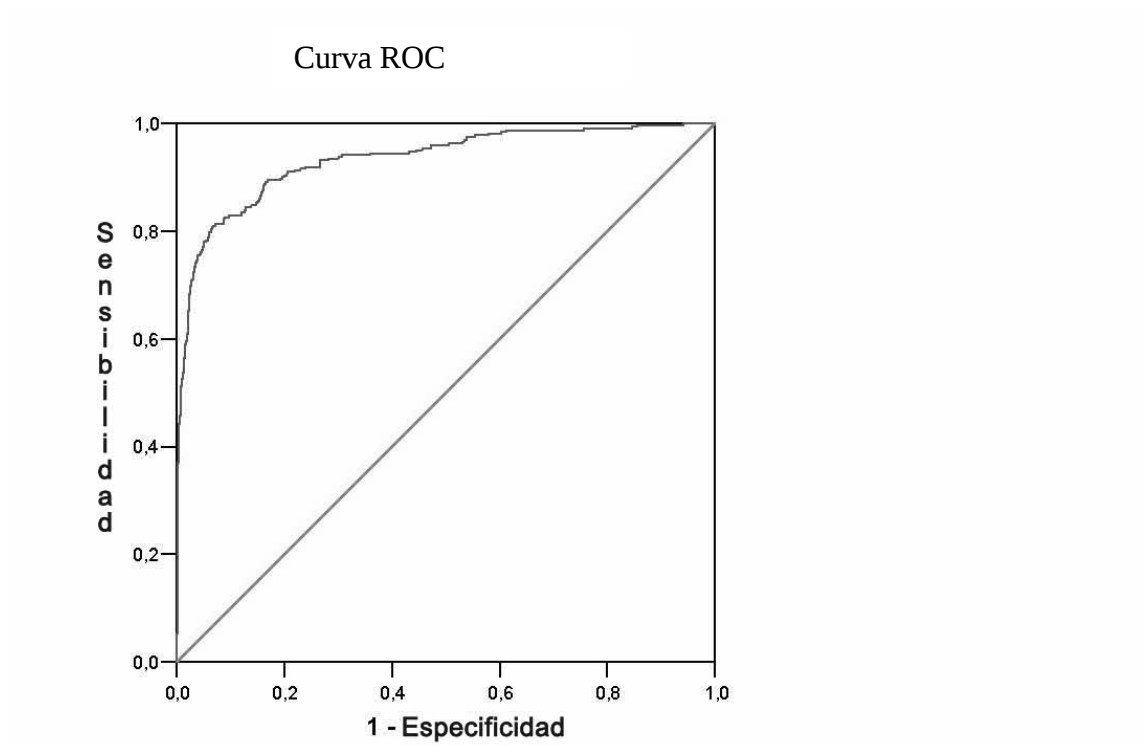


FIG 13

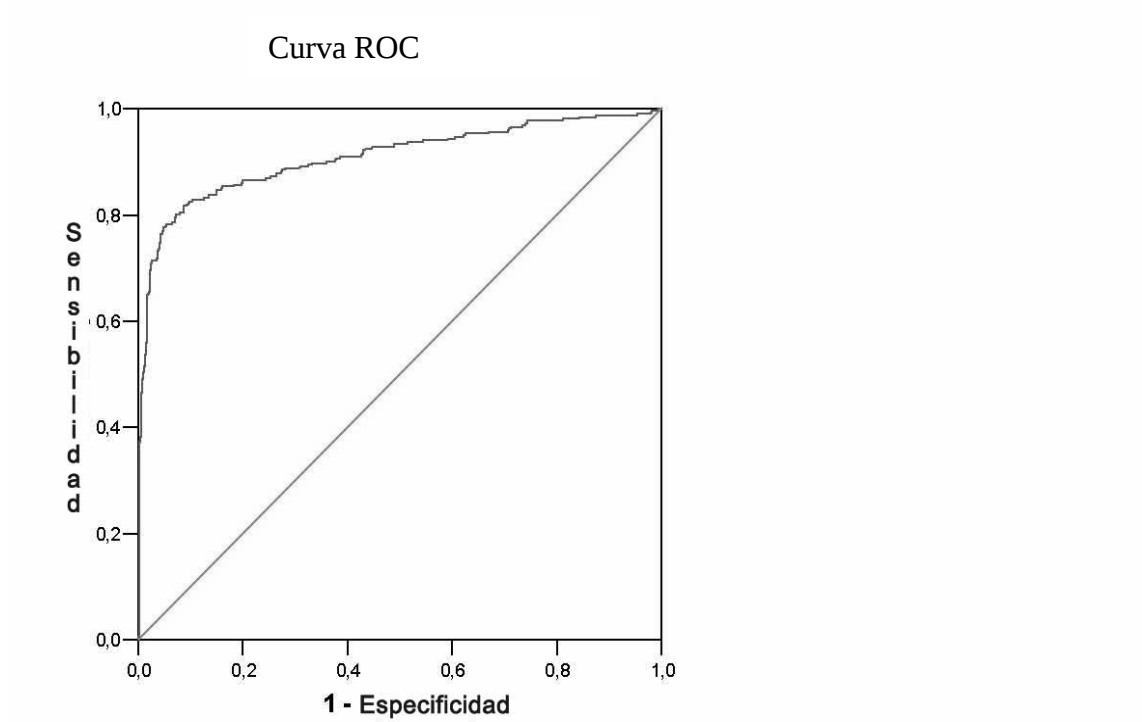


FIG 14

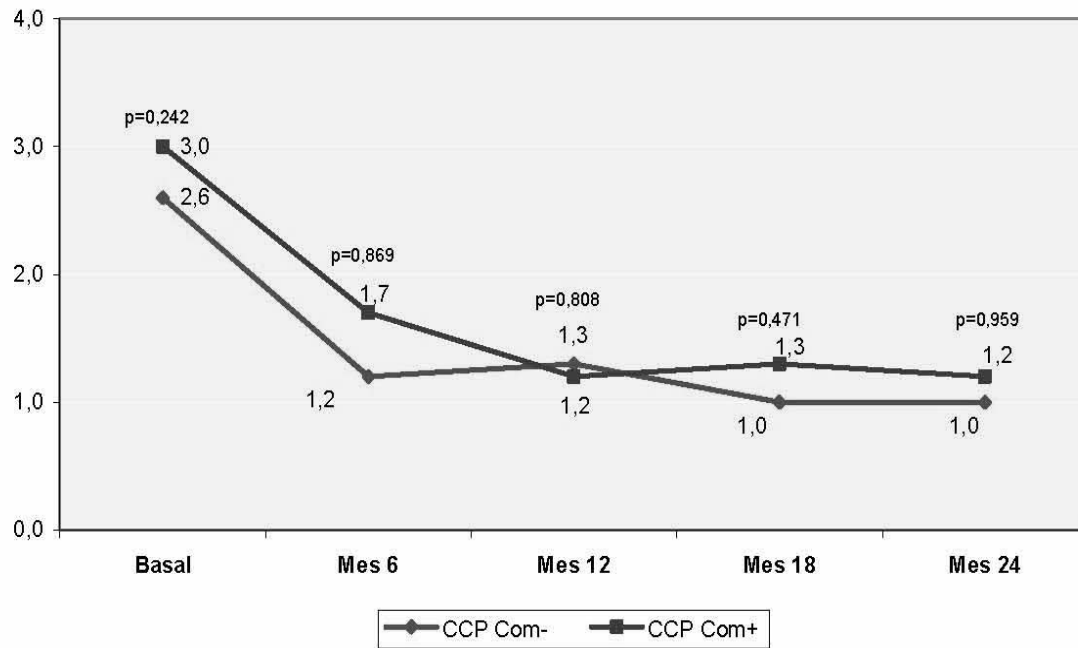


FIG 15

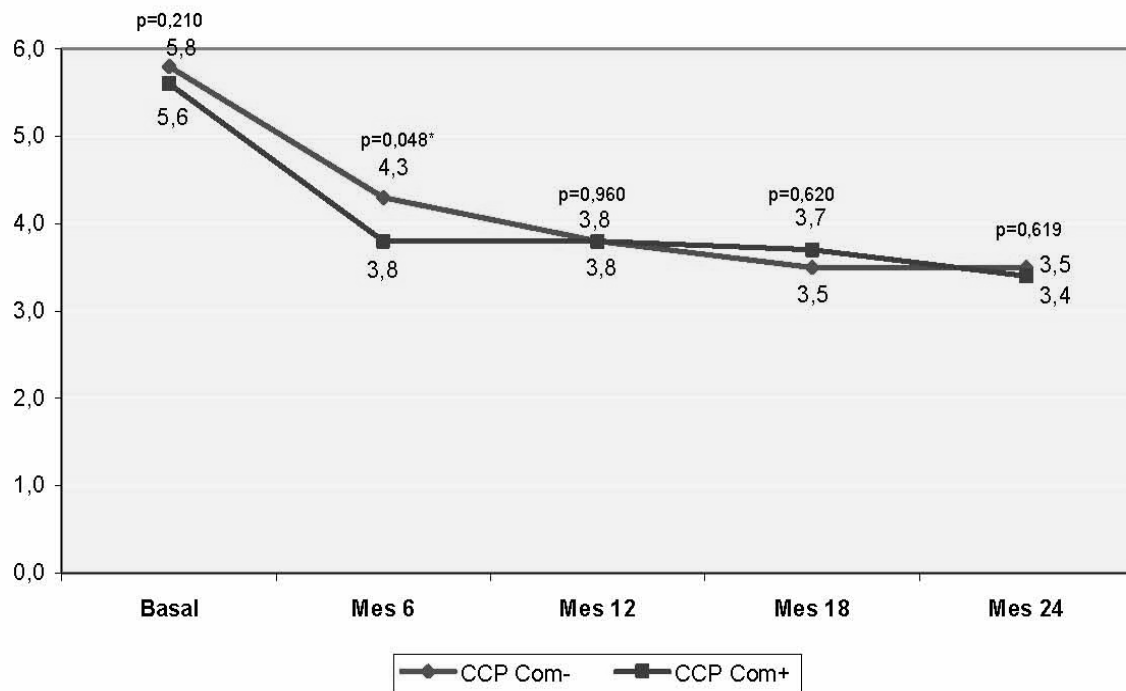


FIG 16

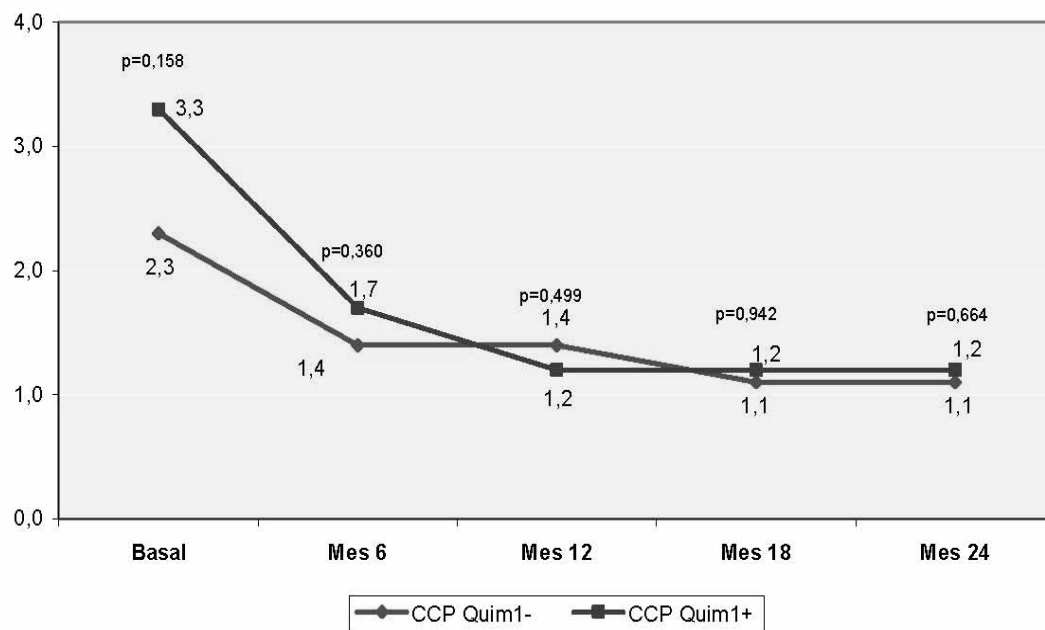


FIG 17

