

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 838**

51 Int. Cl.:

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: **27.02.2009** **E 09757339 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 2286240**

54 Título: **Biomarcador de la osteoartritis y uso del mismo**

30 Prioridad:

03.06.2008 EP 08157521

26.02.2009 EP 09153804

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (100.0%)
Patent Department, Avenue Pré-Aily, 4
4031 Angleur (Liege), BE

72 Inventor/es:

HENROTIN, YVES;
Gharbi, MYRIAM;
DEBERG, MICHELLE y
DE PAUW, EDWIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 838 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

Biomarcador de la osteoartritis y uso del mismo

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la osteoartritis, mediante la determinación del nivel de un biomarcador o polipéptido en una muestra biológica. La invención se refiere también al polipéptido aislado, a un polinucleótido que codifica el polipéptido, a un vector recombinante que comprende el polinucleótido y a un transformante transformado con el vector recombinante. La invención se refiere además al uso del biomarcador o polipéptido en la fabricación de un anticuerpo.

La osteoartritis es un trastorno progresivo caracterizado por la destrucción del cartílago articular y por cambios en el hueso subcondrial y en el líquido sinovial. Actualmente, el diagnóstico de la osteoartritis se basa en los cambios clínicos y radiográficos que se producen posteriormente durante la evolución de la enfermedad. Más específicamente, el diagnóstico se basa en la integridad del cartílago ya que, como el cartílago articular es invisible en las radiografías, debe evaluarse indirectamente a partir de la separación entre los extremos de los huesos subcondriales de una articulación. Este método no permite la detección de daños estructurales tempranos, y es incómodo de usar en la práctica diaria.

Se han propuesto marcadores bioquímicos de la renovación del hueso, el sinovio o el cartílago como herramientas potenciales para el diagnóstico, pronóstico y vigilancia del tratamiento de la osteoartritis (Garnero, P., *et al.*, *Ann Rheum Dis*, 2001. 60(6): p. 619-26; Bruyere, O., *et al.*, *J Rheumatol*, 2003. 30(5): p. 1043-50; y Wu, J., *et al.*, *Arthritis Rheum*, 2007. 56(11): p. 3675-84). El documento WO 2006/006477 describe un método para detectar o cribar la osteoartritis en el tejido sinovial de la rodilla de pacientes sospechosos de haber contraído una enfermedad ósea o una enfermedad articular. El método comprende la etapa de medir la expresión de proteínas tales como Fibulina-3. El documento WO 2006/006477 describe también anticuerpos policlonales contra fibulina-3 para la detección y el cribado de la osteoartritis. Wu y col., (*Arthritis Rheum*, 2007. 56(11): p. 3675-84) describen mediadores y biomarcadores moleculares potenciales de la osteoartritis en el tejido del cartílago. Los métodos de Wu *et al* y del documento WO 2006/006477 utilizan cartílago articular o tejido sinovial, obtenidos mediante un procedimiento invasivo que proporciona solo una cantidad limitada de tejido. Los métodos son por tanto costosos, llevan mucho tiempo, y no son adecuados para ensayos diagnósticos rutinarios, o para vigilar la evolución de la enfermedad, o para determinar el efecto terapéutico de un tratamiento.

Por otra parte, los documentos US2003/236392 y EP1764413 describen la proteína fibulina-3 de longitud completa.

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de un método sencillo, rápido y eficaz para el diagnóstico de la osteoartritis y/u otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y/o para vigilar la eficacia de los tratamientos para la osteoartritis y/u otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y/o para determinar el pronóstico de un paciente diagnosticado con osteoartritis y/u otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar la osteoartritis. Se describen también un método para determinar el pronóstico de un paciente con osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, y un método para vigilar la eficacia de un tratamiento para la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, utilizando muestras biológicas fácilmente disponibles y que permitan un uso rápido y económico.

Se pretende que las referencias del presente documento a "otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento" u "otra enfermedad relacionada con el envejecimiento" se refieran a una o más enfermedades relacionadas con el envejecimiento que pueden incluir una o más de osteoporosis, degeneración macular y otras enfermedades degenerativas.

La presente divulgación proporciona también un método para determinar el estado de osteoartritis de un sujeto, y/o el estado de otra enfermedad relacionada con el envejecimiento en un sujeto, que comprende las etapas de:

- (i) determinar la concentración en una muestra biológica de un fragmento libre que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos;
- (ii) comparar la concentración del fragmento libre determinada en la etapa (i) con uno o más valores de referencia.

Se pretende que la referencia en el presente documento a "fragmento libre" se refiera a un polipéptido, un péptido o liberado de otra forma de la molécula de fibulina-3 de mamífero mediante un procesamiento oxidativo o enzimático. Un fragmento libre es diferente de la proteína natural por su estructura y configuración, y puede experimentar modificaciones tales como fosforilación, glicosilación o cualquier otra modificación post-traducciona resultante de un mecanismo patológico. El fragmento libre de acuerdo con la presente divulgación contribuye a la identificación del estado patológico de la osteoartritis o del paciente osteoporótico.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la osteoartritis en

un sujeto, que comprende las etapas de:

- (i) determinar la concentración en una muestra biológica seleccionada entre el grupo que comprende orina, sangre completa, suero sanguíneo y plasma sanguíneo, de un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 1;
- (ii) comparar la concentración determinada en la etapa (i) con uno o más valores de referencia definidos por una concentración de referencia del polipéptido obtenido en una muestra de referencia de uno o más sujetos normales en el que un aumento en la concentración del polipéptido en comparación con los valores de referencia es un diagnóstico de la osteoartritis.

La presente divulgación proporciona también un método para determinar el pronóstico de un sujeto con osteoartritis, y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, que comprende las etapas de: (i) determinar la concentración en la muestra de un fragmento libre que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos; (ii) comparar los niveles del fragmento libre determinados en la etapa (i) con uno o más valores de referencia.

La presente divulgación proporciona además un método para determinar la eficacia de un tratamiento de la osteoartritis, y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento en un sujeto, que comprende las etapas de:

- (i) determinar la concentración en una muestra biológica de un fragmento libre que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos;
- (ii) administrar un tratamiento para la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el sujeto;
- (iii) después del tratamiento, determinar la concentración en otra muestra biológica de un fragmento libre que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos;
- (iv) comparar las concentraciones de fragmentos libres determinadas en la etapa (i) y la etapa (iii) entre sí, y opcionalmente con uno o más valores de referencia.

Preferentemente, en cualquier método descrito, se ha determinado la concentración de un fragmento libre con la misma secuencia que la secuencia de la SEQ ID N: 1. Alternativamente, se puede determinar la concentración de un fragmento libre con una secuencia sustancialmente igual a la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Alternativamente, se puede determinar la concentración de un fragmento peptídico que tiene la misma, o sustancialmente la misma secuencia, que parte de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. El fragmento peptídico puede tener la misma secuencia, o sustancialmente la misma secuencia, que un extremo de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Alternativamente, el fragmento peptídico puede tener la misma secuencia, o sustancialmente la misma secuencia, que una parte interna, esto es, sin incluir ninguno de los extremos, de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el fragmento peptídico tiene al menos de 5, preferentemente al menos de 10, preferentemente al menos de 20, más preferentemente al menos de 30 o más aminoácidos de longitud.

Preferentemente, si se determina la concentración de un fragmento que tiene la misma secuencia, o sustancialmente la misma secuencia, como parte de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, el fragmento representa un epítipo en la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Un epítipo es un sitio de unión de un anticuerpo en un antígeno. En un antígeno peptídico, generalmente un epítipo lineal tendrá al menos aproximadamente 7 aminoácidos de longitud, y puede tener al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 24, o al menos 30 o más restos aminoácidos de longitud. Sin embargo, los anticuerpos pueden reconocer también determinantes conformacionales formados por restos no contiguos en un antígeno, y un epítipo puede requerir por tanto que un fragmento más grande del antígeno esté presente para su la unión, por ejemplo, un dominio.

La referencia que se realiza en el presente documento a "una secuencia que es sustancialmente la misma que" todo o parte de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, se refiere a un fragmento libre con una secuencia que tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % o 98 % de identidad de la secuencia con todo o parte de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente el péptido tiene los mismos o sustancialmente los mismos aminoácidos consecutivos que al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o más aminoácidos consecutivos de la secuencia de la SEQ ID NO:1. Preferentemente, el fragmento libre tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia que la secuencia completa de la SEQ ID NO: 1.

La homología o la identidad de secuencias de dos o más secuencias de aminoácidos puede medirse utilizando un algoritmo de puntuación de homología NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool). Alternativamente, el paquete UWGCC proporciona el programa BESTFIT, que se puede usar para calcular la identidad de secuencia entre dos o más secuencias (utilizadas, por ejemplo, en su escenario por defecto) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12 p387-395).

La secuencia de la SEQ ID NO: 1 representa un fragmento de la proteína fibulina-3. El fragmento puede ser un

producto de degradación de la fibulina-3.

En cualquier método descrito, el fragmento libre que comprende una secuencia igual o sustancialmente igual que la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma está preferentemente presente de forma diferente en la muestra de un sujeto con osteoartritis u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, en comparación con un sujeto normal.

Un fragmento libre que comprende la misma o sustancialmente la misma secuencia que la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, que se mide en la etapa (i) y/o la etapa (iv) de cualquier método descrito, se denomina también en el presente documento como biomarcador o péptido biomarcador.

La referencia al "estado de osteoartritis" o al "estado de una enfermedad relacionada con el envejecimiento" se refiere a cualquier manifestación distinguible de la osteoartritis o una enfermedad relacionada con el envejecimiento, incluyendo enfermedad o ausencia enfermedad. Por ejemplo, el estado de osteoartritis incluye, sin limitación, la presencia o ausencia de osteoartritis en un sujeto, el riesgo de un sujeto de desarrollar osteoartritis, la etapa de la enfermedad, la evolución de la enfermedad y la eficacia o respuesta de un sujeto a un tratamiento para la osteoartritis.

Se puede usar cualquier método descrito junto con la evaluación de los síntomas clínicos y/o los resultados del diagnóstico por imágenes y/o la concentración de uno o más biomarcadores diferentes.

Preferentemente, el método de la invención se lleva a cabo in vitro.

La muestra biológica se selecciona entre el grupo que comprende orina, sangre completa, suero sanguíneo y plasma sanguíneo. Preferentemente, la muestra biológica es orina.

La muestra biológica, tal como orina, tiene la ventaja de ser abundante y fácilmente accesible.

Una ventaja adicional de utilizar una muestra biológica, en comparación con un tejido tal como cartílago, es que puede vigilarse la evolución de la osteoartritis u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, y/o el efecto terapéutico de un tratamiento, tomando y sometiendo a ensayo las muestras tan a menudo como sea necesario sin necesidad de procedimientos invasivos.

Se puede determinar la concentración del péptido biomarcador en una muestra mediante cualquier ensayo adecuado. Un ensayo adecuado puede incluir uno o más de los siguientes métodos, un ensayo enzimático, un inmunoensayo, espectrometría de masas, HPLC, electroforesis o una micromatriz de anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones. Si se usa un inmunoensayo, puede ser un ensayo de adsorción (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, un ensayo competitivo, un radioinmunoensayo, una transferencia Western, un inmunoensayo usando un biosensor, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de aglutinación, un ensayo de turbidez o un ensayo nefelométrico. Si se usa la espectrometría de masas, esta puede ser una espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones por tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Preferentemente, la concentración del péptido biomarcador se determina usando un inmunoensayo que utiliza uno o más anticuerpos dirigidos contra el péptido biomarcador específico para determinar la concentración del péptido biomarcador en la muestra.

Si se usan uno o más anticuerpos para determinar la concentración de un péptido biomarcador en una muestra, el uno o más anticuerpos pueden ser sintéticos, monoclonales, policlonales, oligoclonales, biespecíficos, quiméricos y/o humanizados.

Uno o más de los anticuerpos utilizados pueden comprender una etiqueta o una marca. La etiqueta o marca puede seleccionarse entre el grupo que comprende una etiqueta o marca radioactiva, fluorescente, quimioluminiscente, un colorante, una enzima o una etiqueta o marca de histidina, o cualquier otra marca o etiqueta adecuada conocida en la materia.

Preferentemente, el valor de referencia con el que se compara la concentración determinada del péptido biomarcador es la concentración del mismo péptido en uno o más sujetos "normales" que no tienen ninguna osteoartritis detectable y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, o ninguno de los síntomas clínicos de la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, y tiene lo que se consideran "valores normales" del péptido biomarcador.

Alternativamente, el valor de referencia puede ser un valor previo del péptido biomarcador obtenido de un sujeto específico. Este tipo de valor de referencia se puede usar si el método se va a usar para vigilar la evolución de la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, o para vigilar la respuesta de un sujeto a un tratamiento concreto.

Cuando la concentración determinada del biomarcador se compara con un valor de referencia, un aumento en la concentración del biomarcador puede ser indicativo del estado de la osteoartritis, y/o del estado de otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, en el sujeto.

- 5 Más específicamente, un aumento en la concentración del biomarcador puede ser indicativo, o diagnóstico de osteoartritis en el sujeto. Un aumento en la concentración del biomarcador, preferentemente de un fragmento libre con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 en una muestra, puede ser diagnóstico de osteoartritis.

- 10 Preferentemente, un aumento de al menos aproximadamente 2 veces o más en la concentración de un fragmento libre con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o con una secuencia sustancialmente igual que la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, en una muestra procedente de un sujeto en comparación con una muestra de referencia de un sujeto normal, es diagnóstico de osteoartritis.

- 15 El método descrito aquí puede utilizarse también para vigilar la evolución de la osteoartritis, y/o la evolución de otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, en un sujeto. Además, el método descrito aquí puede utilizarse para vigilar la eficacia de un tratamiento para la osteoartritis, y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, tras la administración del tratamiento a un sujeto. Puede vigilarse la eficacia de un tratamiento analizando muestras tomadas de un sujeto en diversos puntos temporales tras el inicio del tratamiento. Vigilando los cambios en la concentración del péptido biomarcador en el tiempo y comparando estas concentraciones con valores normales y/o de referencia, se puede determinar la eficacia del tratamiento. En este caso, las concentraciones de referencia pueden incluir la concentración del péptido biomarcador en el sujeto cuando se toma y analiza una muestra por primera vez, o la concentración del péptido biomarcador en el sujeto cuando se tomó la última muestra, o ambos.

- 20 El sujeto de cualquier método descrito puede ser un mamífero, y es preferentemente un ser humano, pero puede ser alternativamente un mono, simio, perro, vaca, gallo o roedor.

- 25 La presente divulgación proporciona además un kit para su uso en la determinación del estado de la osteoartritis, o el estado de otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, en un sujeto, en el que el kit comprende al menos un agente para determinar la concentración de un fragmento libre que comprende la misma secuencia o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma, en una muestra biológica.

- 30 El kit puede utilizarse para diagnosticar la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento en un sujeto. El kit puede utilizarse alternativamente para vigilar la evolución de la enfermedad o la eficacia de un tratamiento administrado a un sujeto con osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento.

El agente puede ser una enzima, un anticuerpo, una sonda de proteína, un metabolito o cualquier otra composición adecuada.

- 40 El agente para determinar la concentración del fragmento libre está preferentemente marcado. El kit puede comprender también medios para detectar la marca.

- 45 El kit puede comprender uno o más agentes de captura para capturar el fragmento libre que comprende la misma secuencia o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO 1, o una parte de la misma, en una muestra biológica. El agente de captura puede ser uno o más anticuerpos. El agente de captura puede ser un anticuerpo.

- 50 El kit puede comprender dos anticuerpos para su uso en un ensayo de tipo sándwich para determinar la concentración de un fragmento libre que comprende la misma secuencia o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una parte de la misma. Preferentemente, el kit comprende dos anticuerpos, dirigido cada uno a un epitopo diferente del fragmento libre que comprende la misma secuencia o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una parte de la misma. Un anticuerpo es preferentemente el anticuerpo de captura, y el otro anticuerpo es preferentemente un anticuerpo de detección y puede marcarse para permitir su detección.

- 55 El agente de captura puede estar unido a un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una oblea, una placa de microvaloración, una perla o una resina.

- 60 El kit puede comprender instrucciones sobre los parámetros de funcionamiento adecuados en la forma de una etiqueta o prospecto independiente. Las instrucciones pueden informar a un usuario acerca de cómo recoger la muestra, y/o cómo lavar el agente de captura.

- 65 El kit puede comprender muestras del péptido biomarcador que se va a detectar. Las muestras del péptido biomarcador pueden utilizarse como patrón para la calibración y comparación. El kit puede comprender también instrucciones para comparar la concentración del péptido biomarcador detectado en una muestra con una muestra o tarjeta de calibración. El kit puede incluir también instrucciones que indiquen qué concentración del péptido

biomarcador es diagnóstica de la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento.

La presente divulgación proporciona además el uso de la determinación de la concentración del péptido biomarcador en una muestra de muestra biológica como un medio para evaluar el estado de la osteoartritis en un sujeto o como un medio de evaluar el estado de otra enfermedad relacionada con el envejecimiento en un sujeto.

La presente divulgación también proporciona el uso de una muestra biológica, tal como orina, como fuente de al menos un biomarcador para su uso en la determinación del pronóstico de la evolución de la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, y/o para el diagnóstico de la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, y/o para vigilar el efecto de un tratamiento para la osteoartritis y/u otra enfermedad relacionada con el envejecimiento.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 1, o su amida, o una sal del mismo.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención. Preferentemente, el polinucleótido es una molécula de ADN.

De acuerdo con un aspecto más adicional, la invención proporciona un vector recombinante, que comprende un polinucleótido de la invención.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un transformante, que se transforma con el vector recombinante de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la invención en la fabricación de un anticuerpo.

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo específico de un fragmento o polipéptido libre de acuerdo con la invención. En concreto, se describe un anticuerpo específico de un fragmento libre que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede ser sintético, monoclonal, policlonal, oligoclonal, biespecífico, quimérico o humanizado. El anticuerpo puede estar completo, o ser un fragmento del mismo, tal como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂. Son bien conocidos en la materia los métodos de generar anticuerpos, y pueden incluir la inmunización de animales adecuados, tales como, un conejo, ratón, oveja o cabra, con el péptido de interés (o uno de sus fragmentos inmunógenos) o técnicas recombinantes.

Los expertos apreciarán que se pueden aplicar características preferidas de una realización y/o aspecto cualquiera de la invención a las demás realizaciones y/o aspectos de la invención.

Se describirán ahora las realizaciones de la invención meramente por medio de ejemplo con referencia a las figuras acompañantes en las que:

La **Figura 1A**- muestra una ampliación de una parte de una cartografía 2D-DIGE de sujetos con osteoartritis (OA) (derecha) y sujetos sin osteoartritis (NO) (izquierda).

La **Figura 1B** - muestra una representación de la variación del volumen de la mancha entre sujetos OA (derecha) y sujetos NO (izquierda).

La **Figura 2** - muestra una vista gráfica de la modificación de la abundancia de la fibulina-3 basándose en el aumento del volumen de la mancha que se muestra en la Figura 1B.

La **Figura 3A** - muestra el resultado de un análisis mediante espectrometría de masas de fragmentos tripticos del péptido de la fibulina-3 recuperados de la mancha 352 detallados en las Figuras 1A, Figura 1B y Figura 2.

La **Figura 3B** - muestra la secuencia de la fibulina-3 humana que contiene los fragmentos que se muestran en la Figura 3A.

La **Figura 4** - muestra la estructura del dominio modular de las proteínas de la fibulina.

La **Figura 5** - muestra la secuencia de proteínas de la SEQ ID NO: 1.

La **Figura 6** - muestra la secuencia de proteínas de la SEQ ID NO: 2.

La **Figura 7A** - muestra una ampliación de una parte de una cartografía 2D-DIGE de sujetos con osteoartritis (OA) (Cy3, izquierda) y sujetos con osteoporosis (OP) (CyS, derecha).

La **Figura 7B** - muestra una vista gráfica de la modificación de la abundancia de la fibulina-3 basándose en el aumento del volumen de la mancha que se muestra en la Figura 7A.

La **Figura 8** - muestra una parte potenciada del gel 2D-DIGE obtenido de proteínas extraídas de pacientes con osteoartritis grave (OA), pacientes con osteoporosis (OP) y sujetos de control con menos de 30 años de edad (CTRL).

La metodología 2D-DIGE (electroforesis en gel con diferencia bidimensional - Marouga *et al*, (2005) Anal Bioanal Chem 382(3): 669-78) es una potente herramienta para investigar los perfiles de expresión de proteínas en múltiples conjuntos de muestras.

En los ejemplos, se usó 2D-DIGE para estudiar los perfiles de expresión de las proteínas en muestras de orina procedentes de sujetos con osteoartritis u osteoporosis grave y de sujetos jóvenes sanos. Las proteínas de las muestras a comparar se marcaron bien con Cy3 o bien con CyS CyDye DIGE Fluors. Se usó el Cy2 CyDye DIGE Fluor para marcar una muestra combinada que comprendía cantidades iguales de cada una de las muestras comprendidas en el estudio, y se usó como patrón interno. El uso de este patrón interno aseguró que se representaron todas las proteínas presentes en las muestras, evaluando la correspondencia tanto entre geles como para cada gel.

Materiales y métodos

Preparación de muestras de orina

Se recogieron muestras de orina de 10 mujeres que se habían sometido a cirugía de sustitución de cadera debido a osteoartritis grave. Se obtuvieron muestras control obtenidas de 5 mujeres sanas ($25,6 \pm 2,6$ años) sin degeneración articular. Se concentraron las muestras de orina 100x mediante ultracentrifugación en un Amicon Ultra-15 (Millipore, EE.UU.). Se purificaron las proteínas mediante precipitación utilizando el kit de limpieza PlusOne 2D (GE Healthcare, Suecia). Se llevó a cabo el agotamiento de las muestras de orina usando columnas de afinidad de acuerdo con el manual de utilización del kit Montage Albumin Deplete (Millipore, EE.UU.).

Marcado de proteínas con los colorantes Cy3 y CyS

En todos los experimentos, las proteínas purificadas se marcaron en los restos de lisina con Cy3 o CyS CyDye DIGE Fluors. Las muestras se marcaron mínimamente, lo que significa que la relación del colorante a la proteína utilizada fue tal que cada molécula de proteína se marcó solamente con una molécula de colorante. Se prepararon tres geles como se muestra en la Tabla 1. Las proteínas de diferentes muestras se marcaron con Cy3 o CyS y se cargaron sobre el mismo gel. En el primer y segundo geles, las proteínas de muestras normales (NO) se marcaron con Cy3 CyDye DIGE Fluor mientras que las muestras de proteína de la osteoartritis (OA) se marcaron con CyS CyDye DIGE Fluor. De forma inversa, en el tercer gel, las proteínas de las muestras NO se marcaron con CyS CyDye DIGE Fluor y las proteínas de las muestras OA se marcaron con Cy3 CyDye DIGE Fluor. Un patrón interno (MIX) que comprendía cantidades iguales de muestras NO y OA se marcó con Cy2 CyDye DIGE Fluor se cargó en cada gel.

Tabla 1

	Gel 1	Gel 2	Gel 3
Cy3	NO	NO	OA
CyS	OA	OA	NO
Cy2	MIX	MIX	MIX

Electroforesis bidimensional

Las muestras de proteína (37,5 µg) marcadas con Cy3, Cy5 o Cy2 DIGE Fluor se separaron mediante electroforesis 2D utilizando un tampón IEF (centrado isoelectrico) (urea 8 M, CHAPS al 2 %, tampón [IPG] en un gradiente de pH inmovilizado al 0,5 %, DTT al 1 %, y trazas de azul de bromofenol) que se cargó en una inmovilina DryStrip (pH 3-10 NL, 24 cm) (GE Healthcare, Suecia). La primera dimensión del centrado isoelectrico se llevó a cabo para 70.000 Vhr utilizando una Protean IEF Cell (Biorad) a 20 °C. A continuación, los geles se equilibraron durante 12 minutos en tampón de equilibrio I (Tris-Cl 375 mM [pH 8,8], urea 6 M, glicerol al 20 %, SDS al 2 %, y DTT 130 mM) y II (Tris-Cl 375 mM [pH 8,8], urea 6 M, glicerol al 20 %, SDS al 2 %, e IAA 135 mM). La segunda dimensión se analizó de acuerdo con el manual de funcionamiento de la unidad de electroforesis Ettan DALTsix (GE Healthcare, Suecia). Se usó una placa de gel de SDS-poliacrilamida al 12,5 % (24 cm) para la segunda dimensión de la electroforesis en gel. Se colocaron tiras IPG sobre la superficie de la segunda dimensión del gel. Los geles se colocaron a continuación en tampón de electroforesis SDS (base Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 %) y se analizaron durante la noche a 1,5 W por gel.

Se realizó un barrido de los geles colocados entre dos placas de vidrio de baja fluorescencia utilizando un escáner

fluorescente Typhoon 9400 y se guardaron en formato gel utilizando el programa informático ImageQuant (GE Healthcare, Suecia). Las longitudes de onda de excitación de Cy3 y Cy5 son 550 nm y 645 nm, y las longitudes de onda de emisión son de 570 nm y 670 nm para Cy3 y Cy5, respectivamente. La longitud de onda de excitación/emisión de Cy2 es alrededor de 489/505 nm. Se llevó a cabo el análisis de imágenes con el programa informático DeCyder™ (GE Healthcare, Suecia). Se repicaron fuera del gel las manchas de interés que tenían una intensidad de fluorescencia diferencial entre Cy3 y Cy5, tras una tinción posterior con azul de Coomassie, para permitir la identificación de las proteínas.

Se usó el programa informático DeCyder 2D v6.5 (GE Healthcare, Suecia) para la comparación simultánea de los cambios en la abundancia a través de grupos de muestras. El módulo de análisis en gel diferencial Decyder (DIA) generó relaciones para cada "mancha" de proteína comparando las señales Cy3 y Cy5 con la señal del control Cy2. El módulo de análisis de variación biológica DeCyder hizo corresponder todas las cartografías de manchas de proteínas de los geles y normalizó las relaciones Cy3:Cy2 y Cy5:Cy2 generadas por DIA relativas a las señales Cy2 de cada característica resuelta por separado. Esto permitió el cálculo de los cambios de abundancia promedio para las tres muestras comprendidas en cada grupo de ensayo, y la aplicación de análisis estadístico univariante (test de la t de Student, ANOVA).

Identificación de proteínas

Se recortaron las manchas de proteínas del gel de poliacrilamida y se lavaron dos veces durante 5 minutos con una mezcla de hidrogenocarbonato de amonio (50 mM)-acetonitrilo (1:1). Las manchas de gel se incubaron en ditiotreitolo (10 mM), NH_4HCO_3 (50 mM), durante 40 min, en un baño de agua a 56 °C. Las proteínas de las manchas de gel se alquilaron durante 1 h en la oscuridad con yodoacetamida (55 mM) en NH_4HCO_3 (50 mM). Las manchas del gel se lavaron a continuación dos veces con una mezcla de hidrogenocarbonato de amonio (50 mM)-acetonitrilo (1:1), se deshidrataron con acetonitrilo, y a continuación se secaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las manchas del gel se rehidrataron durante 10 minutos en hielo con tripsina modificada (10 ng/μl) en NH_4HCO_3 (25 mM) y a continuación se incubaron durante la noche a 37 °C. La hidrólisis de los péptidos se detuvo con una solución en TFA (1 %)-ACN (5 %). Las manchas de gel se sometieron a sonicación dos veces durante 1 minuto a fin de liberar los fragmentos de proteínas de las manchas de gel aisladas. Los fragmentos de proteínas en solución se criocongelaron. Se determinó la identidad de las proteínas mediante espectrometría de masas en tándem (espectrometría EM-EM). La puntuación Mowse (Pappin *et al* (1993) Curr Biol Jun 1;3(6):327-32) proporcionó la fidelidad de la identificación.

Resultados

Las proteínas aisladas de las muestras de orina y marcadas con Cy3 o Cy5 se separaron mediante electroforesis bidimensional. La primera separación se llevó a cabo con un intervalo de centrado isoeléctrico de pH 3-10 NL y una carga de 37,5 μg de proteínas. Se hicieron corresponder 372 manchas de proteínas entre todos los geles. Las manchas que mostraron una modificación de la intensidad entre OA y NO con una relación superior a 1,5 (test de la t: $p < 0,05$) se seleccionaron para la identificación de proteínas utilizando espectrometría de masas. La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de estas muestras, y detalla el tamaño de la mancha, la puntuación de Mowse (que es $-10 \log(P)$ donde P es la probabilidad de que la correspondencia observada sea un acontecimiento aleatorio), la relación de abundancia, el nombre de la proteína identificada en la mancha y el número de acceso de la proteína identificada en la base de datos Swiss Prot.

Tabla 2

Mancha n.º	Cobertura de la secuencia (%)	Puntuación de Mowse	Relación de abundancia (OA/NO)	Descripción de la proteína	Registro en Swiss·Prot
40	9	390	1,83	Receptor Poli-Ig (PIGR)	P01833
43	5	159	1,6	Receptor Poli-Ig (PIGR)	P01833
75	10	340	-1,68	Transferrina	P02787
219	11	334	-1,7	Precursor del quininógeno-1	P01042
	6	55		Anti-tripsina Alfa 1 (A1AT)	P01009
222	15	349	-1,64	Precursor del quininógeno-1	P01042
	7	99		A1AT	P01009
223	13	405	-1,89	Precursor del quininógeno-1	P01042
	16	311		A1AT	P01009
226	18	334	-1,73	A1AT	P01009
	6	219		Precursor del quininógeno-1	P01042
262	13	368	-1,91	Precursor del quininógeno-1	P01042
	6	61		A1AT	P01009
267	10	304	-1,98	Precursor del Quininógeno 1	P01042
269	5	143	-1,83	Precursor del Quininógeno 1	P01042

343		189	4,18	Beta-actina	
348	21	192	2	Precursor de la Zn- α -2-glucoproteína	P25311
349	8	195	-2,44	Serpina B3	P29508
351	6	115	-5,84	Serpina B1	P30740
352	5	130 73	2,2	Fibulina 3 Factor 2 inductor de la apoptosis (dos proteínas identificadas en la misma mancha)	Q12805 Q9BRQ8
356	8 2	110 45	2,01	Zn- α -2-glucoproteína FIBULINA3	P25311 Q12805
386	10	197	1,54	GP36b	Q12907
398	5	187	2,28	Precursor de la proteína AMBP	P02760
485	8	289	-2,3	Lectina de unión a manano Precursor de la serina proteasa 2	O00187 E.C 3.4.21.104

Como se puede ver, a partir de la Tabla 2, se identificaron varias proteínas con cambios significativos en su concentración en las muestras de osteoartritis en comparación con las muestras de sujetos normales. Se sabe que algunas de las proteínas identificadas están implicadas en el proceso inflamatorio, por ejemplo, el precursor del quininógeno o la antitripsina alfa-1. Esta observación coincide con la patología de la osteoartritis.

Se observó un aumento significativo en la concentración de un fragmento de fibulina 3 específico en sujetos con osteoartritis en comparación con sujetos normales como se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 1A y 1B. En la Figura 1A se muestra una ampliación de la zona que rodea de la mancha 352 (indicado por un lado de la flecha doble) en la cartografía 2D-DIGE de las proteínas extraídas de la orina de sujetos con osteoartritis (derecha) en comparación con sujetos normales (izquierda). Se ha mostrado mediante espectrometría de masas que la mancha 352 contiene un fragmento de fibulina-3. En la Figura 1B, la misma mancha (mancha 352) se representa mediante la variación de volumen de la mancha (indicada por la otra cabeza de la flecha doble, equivalente a la mancha de la Figura 1A) entre muestras de sujetos con OA (derecha) y sujetos NO (izquierda). En la Figura 2 se muestra también una vista gráfica de la modificación de la abundancia basándose en el aumento de volumen de la mancha 352.

Se identificaron fragmentos tripticos de la mancha 352 mediante análisis por espectrometría de masas como se muestra en la Figura 3A. Estos fragmentos se identificaron como fragmentos de la proteína fibulina-3, como se muestra en la Figura 3B. La Figura 3B muestra la secuencia de la proteína derivada mediante la traducción del ARNm de la fibulina-3 y en negrita la secuencia específica identificada mediante espectrometría de masas. Cada fragmento típico estudiado recibió una puntuación, que es $-10 \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la correspondencia observada sea un acontecimiento aleatorio. Las puntuaciones de iones individuales > 50 indican la identidad o una extensa homología. En el caso de la Figura 3A, los péptidos tripticos recibieron una puntuación de 58 y 72, respectivamente, indicando una amplia homología.

Además de los experimentos que comparaban sujetos OA y sujetos NO, se han realizado estudios adicionales para comparar sujetos OA y con osteoporosis (OP). En estos estudios, se usaron muestras de orina obtenidas de cuatro mujeres con osteoporosis grave. Se prepararon tres geles, como se muestra en la Tabla 3, para comparar sujetos OA y OP. Se marcaron las proteínas de las diferentes muestras con Cy3 o Cy5 CyDye DIGE Fluor y se cargaron en geles como se ha indicado en la Tabla 3. Un patrón interno (MIX) que comprendía cantidades iguales de muestras OA y OP se marcó con Cy2 CyDye DIGE Fluor y se cargó en cada gel. Se llevó a cabo la primera separación con un intervalo de centrado isoeléctrico de pH 4-7 y una carga de 37,5 μ g de proteínas.

Tabla 3

	Gel 1	Gel 2	Gel 3
Cy3	OA	OA	OP
Cy5	OP	OP	OA
Cy2	MIX	MIX	MIX

El análisis de los geles muestra que la mancha que contenía el fragmento de fibulina-3 (como se ha descrito con referencia a las Figuras 3A y 3B) muestra una disminución de la abundancia en la muestra de OP en comparación con muestras de OA, con una relación de 6,72. En las Figuras 7A y 7B se ilustran estos resultados.

En un segundo experimento, se compararon proteínas extraídas de la orina de poblaciones osteoartíticas (OA) y de control (NO) utilizadas en el experimento inicial (descrito con referencia a las Figuras 1 a 6) y procedentes de la

orina de pacientes osteoartíticos (OP) (descritos con referencia a las Figuras 7A y 7B). Se prepararon cinco geles como se muestra en la Tabla 4. Las proteínas de diferentes muestras se marcaron con Cy3 o Cy5 y se cargaron sobre el mismo gel. Un patrón interno (MIX) que comprendía cantidades iguales de muestras NO, OA y OP se marcó con Cy2 CyDye DIGE Fluory se cargó en cada gel. Se llevó a cabo la primera separación con un intervalo de centrado isoelectrico de pH 4-7 y una carga de 37,5 µg de proteínas.

Tabla 4

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5
Cy3	OA	OP	NO	NO	OA
Cy5	OP	OA	OA	OP	NO
Cy2	MIX	MIX	MIX	MIX	MIX

El análisis de los cinco geles mostró que las manchas que contenían el fragmento de fibulina-3 (que se ha descrito con referencia a las Figuras 3A y 3B) muestran una modificación de la abundancia con una relación comprendida entre 4-8 para la comparación OA/NO y 4-12 para la comparación OP/OA, dependiendo de la mancha que contiene el fragmento. A su vez, los inventores han identificado cinco formas diferentes de la fibulina-3 que discriminan de manera diferente los pacientes osteoartíticos y osteoporóticos, como se ilustra en la figura 8.

El aspecto de algunas manchas que contienen fragmentos de fibulina-3 sugiere que la proteína está presente en varias formas en el proteoma urinario. La secuencia podría modificarse específicamente mediante fosforilación, glicosilación u otras modificaciones post-traduccionales resultantes de un mecanismo patofisiológico. Todas las formas identificadas están aumentadas en muestras de OA, en comparación con las muestras de OP y NO. Sin embargo, algunas formas parecen estar más aumentadas con respecto a la mancha observada y podrían estar más alteradas por el proceso patológico. El fragmento seleccionado discrimina pacientes con osteoartritis de aquellos con osteoporosis. Esto no lo identificaría una persona experta en la materia.

Estos datos muestran que la mayor abundancia del fragmento de fibulina-3 es un acontecimiento específico que se produce en la enfermedad osteoartítica. Además, se observa una disminución en el nivel de esta proteína en muestras procedentes de sujetos con muestras de osteoporosis en comparación con las de sujetos con osteoartritis. Señalar que se han encontrado diferentes relaciones entre múltiples experimentos debido a que se cambió el patrón interno por cada uno de ellos.

En la figura 8, las proteínas se separaron con una tira IPG en un gradiente lineal de pH (pH 4-7), seguido por un SDSPAGE al 12,5 %. Las manchas seleccionadas () contienen fragmentos de fibulina-3 identificados mediante espectrometría de masas. La relación modificada del contenido de fibulina-3 se anotó en la mancha correspondiente.

Las fibulinas son una familia de cinco proteínas de matriz extracelular caracterizadas por estructuras de dominio modular como se representa gráficamente en la Figura 4. La estructura general del dominio modular de las fibulinas comprende matrices en tándem de módulos similares al factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF) (dominio II representado por círculos) y un módulo C-terminal de tipo fibulina (dominio III representado por rectángulos). Algunos de los módulos de tipo EGF tienen un motivo consenso para la unión del calcio (módulo de tipo cbEGF representado por círculos con puntos negros). La fibulina-1 y la fibulina-2 comprenden módulos de tipo anafilotoxina (dominio I, representado por rombos). El dominio N, que es único para la fibulina-2, se puede subdividir en un segmento rico en Cys (Na) y un segmento rico en Cys (Nb). Fibulina-3, fibulina-4, y fibulina-5 tienen un módulo de tipo cbEGF en su extremo N. Este módulo de tipo cbEGF modificado tiene un bucle Cys5-Cys6 adicional al comienzo del módulo y una región enlazadora larga entre los bucles Cys2-Cys4 y Cys5-Cys6. Los restos entre Cys4 y Cys5 se muestran en paréntesis. Se han notificado cuatro variantes de corte y empalme diferentes alternativas de la fibulina-1 humana, que se muestran como variantes A-D, y los números entre paréntesis indican restos del dominio III.

Fibulina-1 (703 AA; 77,2 kDa) y Fibulina-2 (1184 AA; 126,5 kDa) se localizan en membranas basales, fibras elásticas, y otras estructuras de tejidos conectivos. Fibulina-4 (443 AA; 49,4 kDa) se identificó a través de su homología de secuencia con la fibulina-1, fibulina-2, y fibulina-3 e independientemente como una proteína que interactúa con una forma mutante de la proteína p53 supresora de tumor. Fibulina-5 (48 AA; 50,2 kDa) se caracterizó en primer lugar como un gen fuertemente expresado en vasos sanguíneos grandes durante el desarrollo embrionario y muy regulado en exceso tras lesión vascular.

La fibulina-3 se conoce también como proteína EFEMP1 y tiene el número de registro en SWISS-PROT Q12805. La fibulina-3 es una proteína que comprende 493 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 54,6 kDa. La fibulina-3 se identificó originalmente mediante clonación sustractiva del ADNc a partir de una biblioteca de fibroblastos de síndrome de Werner y se mostró que se expresaba en niveles aumentados en fibroblastos privados de suero. Como con otras fibulinas, la fibulina-3 está presente en vasos sanguíneos de diferentes tamaños y es capaz de inhibir el desarrollo y la angiogénesis de vasos in vitro e in vivo. La fibulina-3 se expresa en estructuras de cartilago y hueso durante el desarrollo y puede jugar un papel en el sistema esquelético. Se sabe que la fibulina-3

está íntimamente asociada con TIMP-3, un inhibidor de la metaloproteinasa implicado en la patogénesis de la osteoartritis (Klenotic *et al.*, J Biol Chem, 2004. 279(29): p. 30469-73; Sahebjam *et al.*, Arthritis Rheum, 2007. 56(3): p. 905-9; Kevorkian *et al.*, Arthritis Rheum, 2004. 50(1): p. 131-41). Los resultados presentados en el presente documento muestran que el fragmento de fibulina-3 descrito con referencia a la SEQ ID NO: 1, Figura 3B y Figura 5 está presente en una cantidad aumentada en una muestra biológica, tal como orina, de sujetos con osteoartritis. Los datos muestran también que un nivel disminuido del fragmento de fibulina-3 puede ser diagnóstico de osteoporosis, así como de osteoartritis. De esta manera, los péptidos que tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o sustancialmente la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una parte de la misma, se pueden usar como biomarcadores de la osteoartritis, osteoporosis y/u otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE DELIEGE

<120> BIOMARCADOR DE LA OSTEOARTRITIS Y/U OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO, Y USO DEL MISMO

<130> 28-2007

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Thr Oys Gln Asp Ile Asn Glu Oys Glu Thr Thr Asn Glu Cys Arg Glu
1 5 10 15

Asp Glu Met Cys Trp Asn Tyr His Gly Gly Phe Arg Cys Tyr Pro Arg
20 25 30

Asn Pro Cys Gln Asp Pro Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Asn Arg Cys Val
35 40 45

Cys Pro Val Ser Asn Ala Met Cys Arg
50 55

<210> 2

<211> 493

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 565 838 T3

Met 1	Leu	Lys	Ala	Leu 5	Phe	Leu	Thr	Met	Leu 10	Thr	Leu	Ala	Leu	Val 15	Lys
Ser	Gln	Asp	Thr 20	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr 25	Tyr	Thr	Gln	Cys	Thr 30	Asp	Gly
Tyr	Glu	Trp	Asp	Pro	Val	Arg	Gln 40	Gln	Cys	Lys	Asp	Ile 45	Asp	Glu	Cys
Asp	Ile 50	Val	Pro	Asp	Ala	Cys 55	Lys	Gly	Gly	Met	Lys 60	Cys	Val	Asn	His
Tyr 65	Gly	Gly	Tyr	Leu	Cys 70	Leu	Pro	Lys	Thr	Ala 75	Gln	Ile	Ile	Val	Asn 80
Asn	Glu	Gln	Pro	Gln 85	Gln	Glu	Thr	Gln	Pro 90	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser 95	Gly
Ala	Thr	Thr	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Ser	Met	Ala	Thr	Ser	Gly	Val

100										105					110				
Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Phe	Val	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Pro				
		115					120					125							
Glu	Met	Gln	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Phe	Val	Ile	Arg	Arg	Asn	Pro	Ala				
	130					135					140								
Asp	Pro	Gln	Arg	Ile	Pro	Ser	Asn	Pro	Ser	His	Arg	Ile	Gln	Cys	Ala				
145					150					155					160				
Ala	Gly	Tyr	Glu	Gln	Ser	Glu	His	Asn	Val	Cys	Gln	Asp	Ile	Asp	Glu				
				165					170					175					
Cys	Thr	Ala	Gly	Thr	His	Asn	Cys	Arg	Ala	Asp	Gln	Val	Cys	Ile	Asn				
			180					185					190						
Leu	Arg	Gly	Ser	Phe	Ala	Cys	Gln	Cys	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	Lys	Arg				
		195					200					205							
Gly	Glu	Gln	Cys	Val	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Thr	Ile	Pro	Pro	Tyr	Cys				
	210				215						220								
His	Gln	Arg	Cys	Val	Asn	Thr	Pro	Gly	Ser	Phe	Tyr	Cys	Gln	Cys	Ser				
225					230					235					240				
Pro	Gly	Phe	Gln	Leu	Ala	Ala	Asn	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Asp	Ile	Asn				
				245					250					255					
Glu	Cys	Asp	Ala	Ser	Asn	Gln	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Tyr	Asn	Ile	Leu				
			260					265					270						
Gly	Ser	Phe	Ile	Cys	Gln	Cys	Asn	Gln	Gly	Tyr	Glu	Leu	Ser	Ser	Asp				
		275					280					285							
Arg	Leu	Asn	Cys	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	Ser	Ser	Tyr	Leu				
	290					295					300								
Cys	Gln	Tyr	Gln	Cys	Val	Asn	Glu	Pro	Gly	Lys	Phe	Ser	Cys	Met	Cys				
305					310					315					320				
Pro	Gln	Gly	Tyr	Gln	Val	Val	Arg	Ser	Arg	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Asn				
				325					330					335					
Glu	Cys	Glu	Thr	Thr	Asn	Glu	Cys	Arg	Glu	Asp	Glu	Met	Cys	Trp	Asn				
			340					345					350						
Tyr	His	Gly	Gly	Phe	Arg	Cys	Tyr	Pro	Arg	Asn	Pro	Cys	Gln	Asp	Pro				
		355					360					365							
Tyr	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Cys	Pro	Val	Ser	Asn	Ala				

370						375								380	
Met	Cys	Arg	Glu	Leu	Pro	Gln	Ser	Ile	Val	Tyr	Lys	Tyr	Met	Ser	Ile
385					390					395					400
Arg	Ser	Asp	Arg	Ser	Val	Pro	Ser	Asp	Ile	Phe	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr
				405					410					415	
Thr	Ile	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Thr	Phe	Arg	Ile	Lys	Ser	Gly	Asn
			420					425					430		
Glu	Asn	Gly	Glu	Phe	Tyr	Leu	Arg	Gln	Thr	Ser	Pro	Val	Ser	Ala	Met
		435					440					445			
Leu	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Leu	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	His	Ile	Val	Asp
	450					455					460				
Leu	Glu	Met	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ile	Gly	Thr	Phe	Arg	Thr	Ser	Ser
465					470					475					480
Val	Leu	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Val	Gly	Pro	Phe	Ser	Phe			
				485					490						

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar la osteoartritis en un sujeto, que comprende las etapas de:
 - 5 (i) determinar la concentración en una muestra biológica seleccionada entre el grupo que comprende orina, sangre completa, suero sanguíneo y plasma sanguíneo, de un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 1;
 - 10 (ii) comparar la concentración determinada en la etapa (i) con uno o más valores de referencia definidos por una concentración de referencia del polipéptido obtenido en una muestra de referencia de uno o más sujetos normales
en donde un aumento en la concentración del polipéptido en comparación con los valores de referencia es un diagnóstico de la osteoartritis.
- 15 2. Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 1 o su amida o una de sus sales.
3. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Un vector recombinante que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3.
- 20 5. Un transformante transformado con un vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 en la fabricación de un anticuerpo.

Figura 1A



Figura 1B

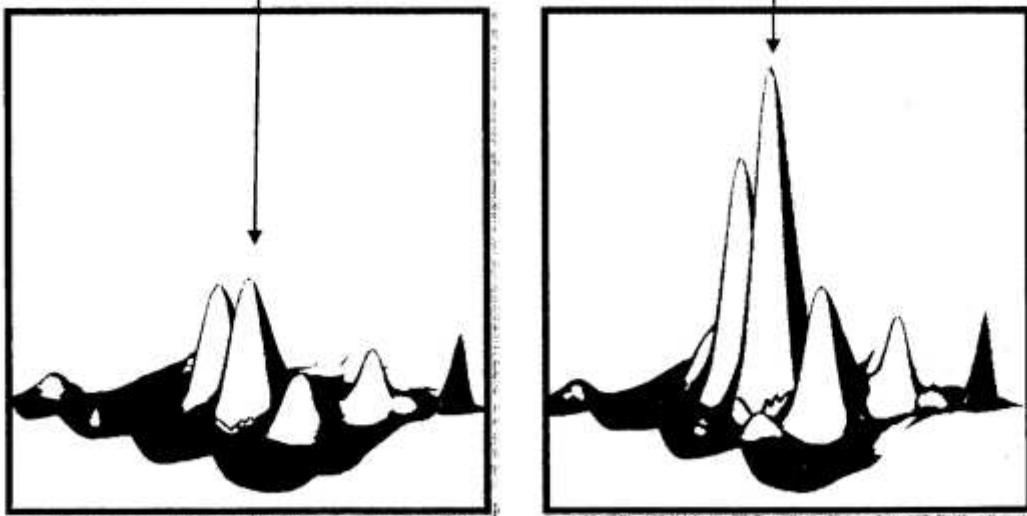


Figura 2

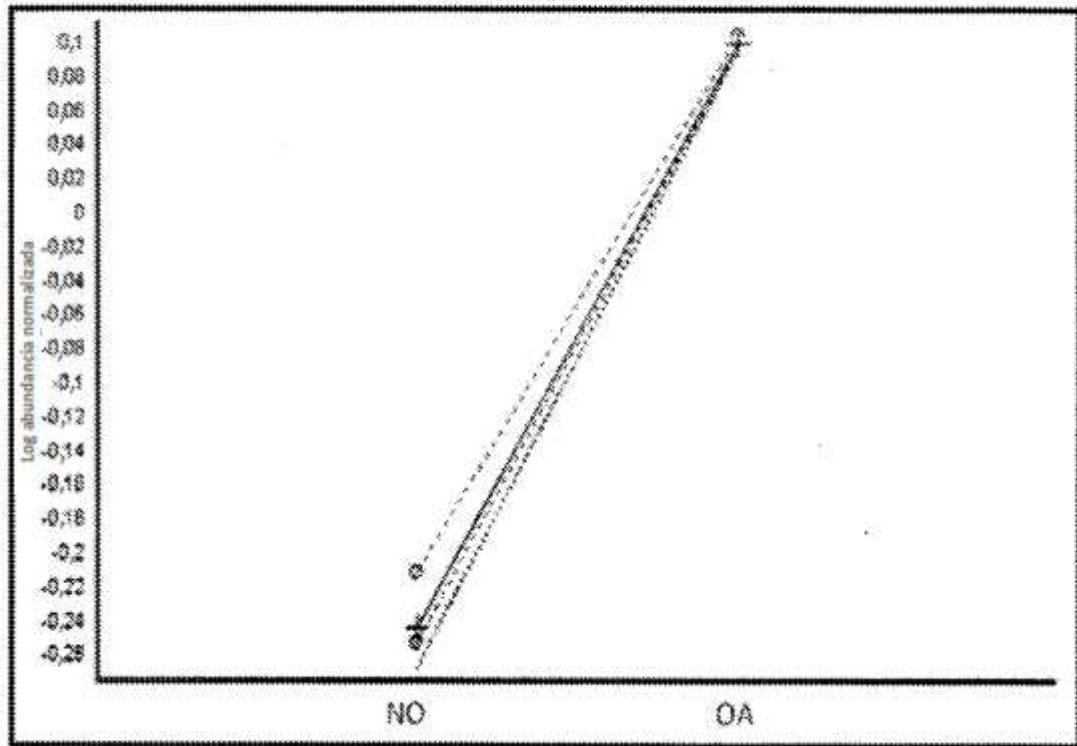


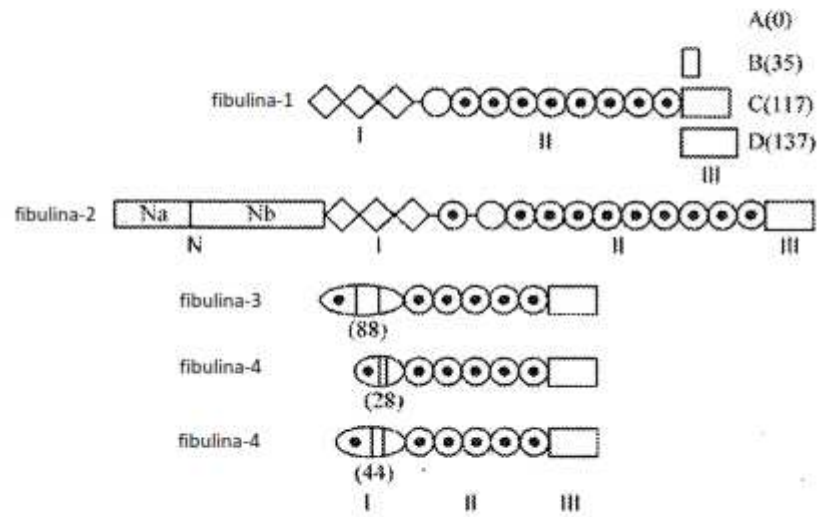
Figura 3A

FIBL3 HUMAN		Masa: 54604	Puntuación: 130	Peticiones correspondidas: 2			
Precursor de la proteína de matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF (Fibulina-3) (FIBL-3)							
Petición	Observado	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Ferdido	Punt.	Esperado Interv. Péptido
<u>188</u>	585,33	1368,64	1368,54	0,09	0	58	0,00027 1 R.CVCPVSNAMCR.E
<u>444</u>	965,32	1928,63	1928,73	-0,10	0	72	4,2e-06 1 R.TCQDINECETTNECR.E

Figura 3B

10	20	30	40	50	60
MIKALFLTML	TLALVKSODT	EETITYTOCT	DGYENDPVRO	OCKDIDECDI	VPDACKGGMK
70	80	90	100	110	120
CVNHYGGYLC	LPKTAQIIVN	NEQEQQETQF	AEGTSGATTG	VVAASSMAT5	GVLPGGGFVA
130	140	150	160	170	180
SAAAVAGPEM	QTGRNMFVIR	RNFADPQRIP	SNPSHRIQCA	AGYEQSEHNV	CQDIDECTAG
190	200	210	220	230	240
THNCRADQVC	INLRGSFACQ	CFPGYQKRGE	QCVDIDECTJ	PPYCHQRCVN	TPGSFYCQCS
250	260	270	280	290	300
PGFQLAANNM	TCVDINECDÄ	SNQCAQQCYN	ILGSFICQCN	QCYELSSDRL	NCEDIDECRT
310	320	330	340	350	360
SSYLCQYQCV	NEPGKFSCMC	PQGYGVVRSR	TCQDINECET	TNECREDEMC	WNYHGGGFRCY
370	380	390	400	410	420
PRNPCQDPYI	LTPENRCVCP	VSNAMCRELP	QSIYKYMSI	RSDRSVPSDI	FQIQATTIYA
430	440	450	460	470	480
NTINTFRIB5	GNENGEPYLR	QTSFVSAMLV	LVKSLSGPRE	RIVDLEMLTV	SSIGTFRTSS
490					
VLRLTIIVGE	FSF				

Figura 4



Kobayashi, N. y col. J. Biol. Chem. 2007;282:11805-11816

Figura 5

TCQDINECETTNECREDEMCWNYHGGFRCYPRNPCQDPYILTPENRC
VCPVSNAMCR

Figura 6

MLKALFLTMLTLALVKSQDTEETITYTQCTDGYEWD PVRQQCKDIDE
CDIVPDACKGGMKCVNHYGGYLCLPKTAQIIVNNEQPQQETQPAEGT
SGATTGVVAASSMATSGVLPGGGFVASAAAVAGPEMQTGRNNFVIRR
NPADPQRIPSNPSHRIQCAAGYEQSEHNVCQDIDECTAGTHNCRADQV
CINLRGSFACQCPPGYQKRGEQCVDIDECTIPPYCHQRCVNTPGSFYC
QCSPGFQLAANNYTCVDINECDASNQCAQQCYNILGSFICQCNQGYEL
SSDRLNCEDIDECRTSSYLCQYQCVNEPGKFSCMCPQGYQVVRRTC
QDINECETTNECREDEMCWNYHGGFRCYPRNPCQDPYILTPENRCVC
PVSNAMECRELPQSIVYKYMSIRSDRSVPSDIFQIQATTIYANTINTFRIK
SGNENGEFYLRQTSPVSAMLVLVKSLSGPREHIVDLEMLTVSSIGTFRT
SSVLRLTIIVGPFSE

Figura 7A

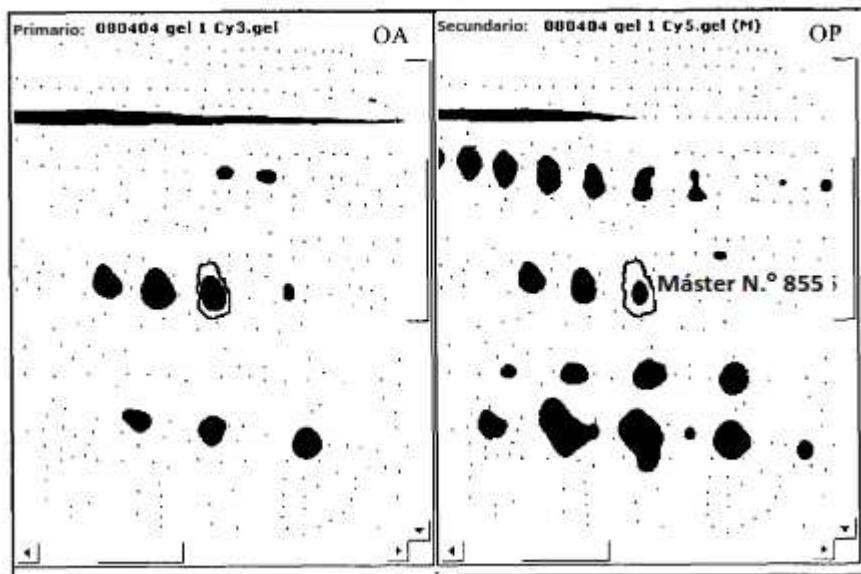


Figura 7B

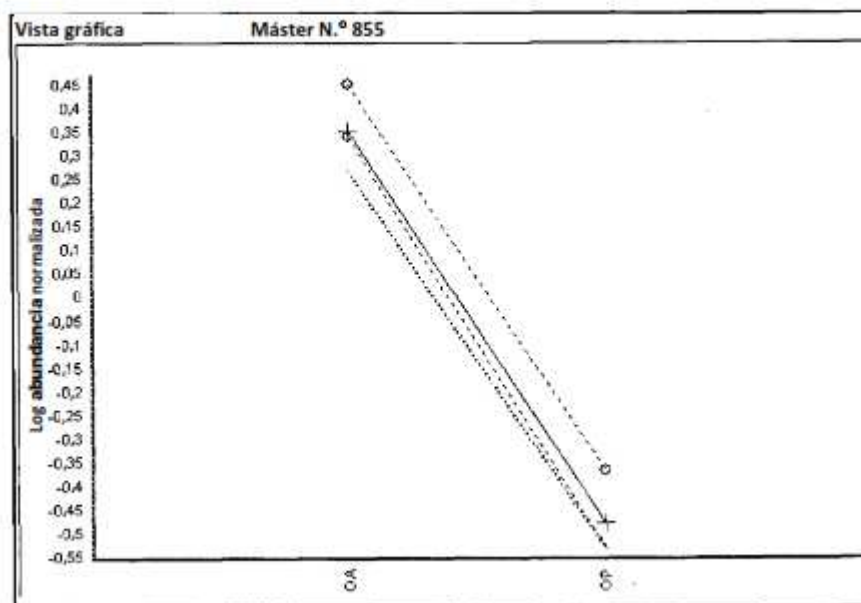


Figura 8

