

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 438**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2009 E 09722261 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2307451**

54 Título: **Biomarcadores para artritis reumatoide**

30 Prioridad:

21.03.2008 US 38481

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

27.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT HASSELT (100.0%)
Biomedisch Onderzoeksinstituut Agoralaan
3590 Diepenbeek, BE**

72 Inventor/es:

**SOMERS, VEERLE;
SOMERS, KLAARTJE y
STINISSEN, PIETER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 584 438 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores para artritis reumatoide

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico de trastornos autoinmunitarios, más específicamente al diagnóstico de trastornos reumatoides, artritis autoinmunitaria crónica e incluso más específicamente al diagnóstico de artritis reumatoide. Se proporciona un panel de biomarcadores que se puede utilizar para detectar si un sujeto tiene una artritis reumatoide. También se describen métodos de identificación de dichos marcadores.

Antecedentes de la invención

La artritis reumatoide (AR) es la forma más frecuente de artritis autoinmunitaria crónica, que afecta al 0,5-1 % de la población adulta mundial (1). La enfermedad se caracteriza por dolor, hinchazón y rigidez articular debido a sinovitis y destrucción articular irreversible, que da lugar en último término a una incapacidad funcional. Actualmente, la AR se diagnostica basándose en el cumplimiento del grupo de criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987. Si se cumplen al menos 4 de estos 7 criterios clínicos primarios de clasificación, el paciente se diagnostica de AR (2). La presencia del factor reumatoide (FR) es el único criterio para el diagnóstico que se basa en hallazgos de laboratorio objetivos. El resultado de estos criterios de clasificación a menudo está lejos del óptimo, especialmente en la AR temprana. El curso de la enfermedad de AR temprana es muy heterogéneo y los pacientes con AR temprana a menudo no cumplen 4 de los 7 criterios (3). También, para cumplir los criterios del ACR, los síntomas deben durar 6 meses o más. Esto da como resultado un diagnóstico para la AR de baja sensibilidad que varía del 62 % al 90 %, y un retraso pronunciado del diagnóstico (3-6). Sin embargo, el tratamiento temprano de AR, es esencial para evitar la destrucción articular irreversible y mejorar el resultado de la enfermedad, por lo que el diagnóstico temprano de la enfermedad es de la máxima importancia (7-9).

Para mejorar la eficacia del diagnóstico, actualmente se recomienda incorporar un ensayo de anticuerpos anti-CCP (anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos, ACPA) además del ensayo de FR en el trabajo diagnóstico, ya que se maximiza la sensibilidad al combinar los dos marcadores (3; 10; 11). Además de ser marcadores de AR tempranos y específicos, los anticuerpos anti-CCP predicen el desarrollo de AR en pacientes con artritis no diferenciada, y la presencia de estos marcadores en AR se asocia con un curso peor de la enfermedad (11-15). Sin embargo, de acuerdo con unos meta-análisis publicados recientemente con respecto al ensayo ACP y FR en la AR, la sensibilidad de los anticuerpos anti-CCP es solamente moderada (67-68 %) a pesar de tener una alta especificidad del 95 % (16; 17). Esto implicaría que un 33 % de los pacientes con AR son negativos a los anticuerpos anti-CCP (ACPA-). La sensibilidad del ensayo de ACPA que se ha publicado todavía es menor en la enfermedad temprana (16). Además, hallazgos recientes indican que la etiología y patogénesis son potencialmente diferentes en la AR negativa a ACPA y positiva a ACPA (18-20). Esta heterogeneidad implica la necesidad de un panel de diferentes marcadores para conseguir un diagnóstico preciso para la población completa de pacientes con AR.

Sumario

Por lo tanto, la identificación de marcadores adicionales de enfermedad de AR es crucial, particularmente para la AR temprana y la AR negativa a FR (FR-) y AR negativa a ACPA (ACPA-). En la presente memoria descriptiva, los inventores analizan los perfiles de autoanticuerpos en los pacientes con AR temprana FR- ACPA- con una técnica molecular de alto rendimiento que se llama Selección Serológica de Antígenos (SAS) para identificar (auto) antígenos diana adicionales de AR y los correspondientes autoanticuerpos que se puedan utilizar como marcadores serológicos. El procedimiento SAS se basa en fagos de expresión de una biblioteca de expresión de ADNc, que se produce a partir de tejido sinovial de AR, que se criba con sueros agrupados de pacientes con AR. Llevando a cabo varias rondas de selección por afinidad de la biblioteca de fagos ADNc de presentación de AR con inmunoglobulinas agrupadas (IgG) de pacientes con AR, se produce el enriquecimiento de clones ADNc diana asociados a AR. La presente memoria descriptiva proporciona un grupo de biomarcadores que son altamente específicos para los pacientes con AR, particularmente pacientes con AR con una duración de la enfermedad de menos de un año y cuyo suero es negativo a FR y/o negativos a ACPA.

En consecuencia, en un primer aspecto, se proporcionan métodos para detectar específicamente la artritis reumatoide en un mamífero que comprende i) detectar la presencia o cantidad de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho mamífero en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad para un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la presencia de dicho anticuerpo indica que dicho mamífero tiene artritis reumatoide.

En realizaciones particulares, el mamífero que se va a diagnosticar es un ser humano.

De acuerdo con realizaciones particulares, el fluido corporal derivado del mamífero es plasma sanguíneo, suero

sanguíneo o líquido sinovial.

De acuerdo con realizaciones específicas, la detección es por medio de procesos inmunoenzimáticos tales como, pero sin limitarse a, ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), técnicas inmunofluorescentes, ensayo radioinmunológicos (RIA) e inmunotransferencia y transferencia LINE. De acuerdo con realizaciones alternativas la detección es por medio de citometría de flujo.

La detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento pueden ser indicativas de artritis reumatoide. De acuerdo con realizaciones particulares, la detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico son indicativas de artritis reumatoide con un estadio de enfermedad de menos de 1 año. De acuerdo con realizaciones específicas alternativas, la detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico son indicativas de artritis reumatoide en un paciente cuyo fluido corporal es seronegativo al factor reumatoide y/o anticuerpos anti-CCP.

De acuerdo con realizaciones particulares, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la detección del factor reumatoide. De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, los métodos implican la detección de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos. Particularmente, los métodos pueden comprender la detección del factor reumatoide así como anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporcionan polipéptidos (es decir, al menos un polipéptido) que se pueden utilizar como biomarcadores o para ayudar en el diagnóstico, por ejemplo, de artritis reumatoide. Dicho polipéptido consiste esencialmente en una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento de la misma que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14. Con la expresión 'que consiste esencialmente en' se quiere decir que se pueden incluir otros aminoácidos, es decir, la secuencia puede ser parte de un polipéptido mayor; sin embargo se debería señalar que esta expresión también implica que la secuencia definida es la parte más importante de la molécula. Por lo tanto, un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia definida (SEQ ID NO: 1-14) es necesariamente menor que el doble de la longitud de la secuencia definida. El polipéptido consiste en una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento de la misma que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14.

Se proporcionan composiciones que comprenden al menos un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento de la misma que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14. La composición consiste esencialmente en al menos un polipéptido. De acuerdo con otro ejemplo particular, se proporcionan composiciones que comprenden al menos dos polipéptidos diferentes que comprenden una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14. Aquí también, se pretende que en realizaciones específicas, las composiciones consisten esencialmente en al menos dos polipéptidos diferentes.

Como se ha mencionado, los polipéptidos se pueden utilizar como biomarcadores para ayudar al diagnóstico, por ejemplo, de artritis reumatoide. En consecuencia, en un aspecto adicional, los polipéptidos y composiciones descritos en el presente documento se conciben para su uso en el diagnóstico.

De acuerdo con un aspecto más, se proporciona el uso (*in vitro*) de los polipéptidos o composiciones descritos en el presente documento para detectar la presencia y/o cantidad de anticuerpos específicos contra el polipéptido o contra al menos un polipéptido de dicha composición en un fluido corporal de un mamífero.

De acuerdo con realizaciones específicas, el mamífero del que se ensaya el fluido corporal es un ser humano. De acuerdo con otras realizaciones específicas, el fluido corporal es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o líquido sinovial.

De acuerdo con realizaciones específicas, la detección se produce por medio de procesos inmunoenzimáticos que comprenden ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), técnicas de inmunofluorescencia, ensayos radioinmunológicos (RIA), inmunotransferencia y transferencia LINE. De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, se utiliza la citometría de flujo para la detección.

De acuerdo con realizaciones concebidas particularmente, la detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico son indicativas de artritis reumatoide. De acuerdo con realizaciones particulares, la detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico son indicativas de artritis reumatoide con un estadio de enfermedad de menos de 1 año. De acuerdo con realizaciones específicas alternativas, la detección y/o cuantificación de al menos un anticuerpo específico son indicativas de artritis reumatoide en un paciente cuyos fluidos corporales son seronegativos para el factor reumatoide y/o anticuerpos anti-CCP.

De acuerdo con realizaciones particulares, los usos descritos en el presente documento comprenden además la detección del factor reumatoide. De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, los usos implican la detección de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos. Particularmente, los usos pueden comprender la detección del factor reumatoide así como anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos.

En un aspecto más, se proporcionan métodos para evaluar el pronóstico y/o gravedad de la enfermedad de artritis reumatoide en un paciente, que comprende i) detectar la disminución o aumento de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho paciente, en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad para un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la presencia de una concentración disminuida/aumentada de dicho anticuerpo indica el pronóstico de artritis reumatoide en dicho paciente.

De acuerdo con otro aspecto, se conciben métodos para seleccionar un paciente para un tratamiento terapéutico específico de artritis reumatoide o para evaluar el tratamiento terapéutico de artritis reumatoide en un paciente que comprende i) detectar la presencia o cantidad de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho paciente en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad por un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la concentración disminuida/aumentada de dicho anticuerpo da lugar a la elección de un tratamiento terapéutico específico para la artritis reumatoide en dicho paciente.

De acuerdo con otro aspecto más, se proporcionan kits de diagnóstico para la detección de artritis reumatoide que comprenden al menos un polipéptido como se ha descrito en el presente documento, o una composición como se ha descrito en el presente documento, así como reactivos para producir un medio adecuado para que se produzca una reacción inmunológica y reactivos que sean capaces de detectar el complejo antígeno/anticuerpo que se produce por dicha reacción inmunológica.

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento de la misma que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14. De acuerdo con una realización muy específica, los anticuerpos no se unen a las proteínas HLA-A de tamaño completo, proteína S6 ribosómica y MCM2. De acuerdo con otras realizaciones adicionales más, los anticuerpos que se describen en el presente documento son específicos para polipéptidos que consisten esencialmente en una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento de la misma que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y no se unen a la proteína completa similar.

Se proporciona un anticuerpo contra SEQ ID NO: 1. Como estará claro para un experto, las realizaciones descritas en el presente documento no son exclusivas y se pueden combinar unas con otras.

Figuras

Figura 1: Procedimiento de Selección Serológica de Antígeno. El procedimiento de selección conlleva la incubación de fagos que presentan la biblioteca de ADNc de AR con un agrupamiento de sueros AR (1), que da lugar a la formación de complejos de antígeno del fago-IgG (2). Estos complejos se capturan en un soporte sólido por un anticuerpo anti-IgG humana (3), y el fago no unido se lava (4). El fago unido se eluye y se amplifica mediante la infección de una bacteria huésped (5). Se produce el fago de nuevo y se utiliza como entrada en una ronda de selección posterior (6).

Figura 2: Niveles de anticuerpo contra el clon UH-RA.21 (a) y clon UH-RA.10 (b) en pacientes con AR, otras enfermedades reumáticas y controles sanos (HC). Los gráficos de dispersión muestran la relación media entre la densidad óptica (DO) (clon-AR): DO (fago vacío) de 48 pacientes con AR, 30 pacientes con otras enfermedades reumáticas inflamatorias y 38 controles sanos. Cada símbolo representa la media de mediciones por duplicado o triplicado de cada muestra de suero. La línea horizontal constituye el valor de corte para una señal positiva, es decir, 3 desviaciones estándar (SD) por encima de la relación media DO (fago): DO (fago vacío) del grupo HC.

a) Los niveles de anticuerpo contra UH-RA.21 eran significativamente mayores en pacientes con AR (media 1,09; intervalo intercuartil (IQR) 1,04-1,15) que en controles reumáticos (media 0,97; IQR 0,93-1,08), controles sanos (media 0,94; IQR 0,91-0,98), y todos los controles combinados (media 0,96; IQR 0,92-0,99) ($p < 0,001$). b) los niveles de anticuerpo contra UH-RA.10 eran significativamente mayores en pacientes AR (media 1,20; IQR 1,16-1,25) que en controles reumáticos (media 1,10; IQR 1,07-1,14), controles sanos (media 1,11; IQR 1,07-1,14), y todos los controles combinados (media 1,11; IQR 1,07-1,14) ($p < 0,001$).

Figura 3: Relación entre positividad a anticuerpos contra el panel de los inventores de 14 clones y duración de la enfermedad. La duración de la enfermedad de los pacientes con AR que eran positivos a anticuerpos contra el panel de los inventores se compara con la duración de la enfermedad de pacientes con AR negativos a anticuerpos. Los datos se representan como gráficos de dispersión. Se encontró una asociación significativa ($p = 0,0087$) entre la positividad de anticuerpos contra al menos uno de los 14 clones y la duración de la enfermedad temprana en la población de estudio de AR de los inventores.

Figura 4: Comparación de niveles de anticuerpos contra antígenos candidatos de AR identificados entre

pacientes con AR, pacientes de control con otras enfermedades reumáticas y controles sanos (HC). Los gráficos de dispersión muestran las relaciones medias de la DO (clon AR) / DO (fago vacío) de 48 pacientes con AR, 30 pacientes con otras enfermedades reumáticas y 38 controles sanos. (A) UH-RA.9, (B) UH-RA.10, (C) UH-RA.13, (D) UH-RA.14, (E) UH-RA.17, (F) UH-RA.21, (G) UH-RA.22. Los niveles de anticuerpos contra UH-RA.21 y UH-RA.10 eran significativamente mayores en pacientes con AR en comparación con los pacientes con otras enfermedades reumáticas y controles sanos ($P < 0,001$). Los niveles de anticuerpos contra UH-RA.9, UH-RA.13, UH-RA.14, UH-RA.17 y UH-RA.22 eran significativamente mayores en pacientes con AR en comparación con el grupo de HC ($P < 0,001$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, $P < 0,001$ y $P < 0,001$, respectivamente). También para UH-RA.9, UH-RA.14, UH-RA.17 y UH-RA.22, se discernían diferencias significativas en los niveles de anticuerpos entre los pacientes reumáticos de control y los controles sanos ($P < 0,01$, $P < 0,001$, $P < 0,001$, y $P < 0,01$, respectivamente). Cada símbolo representa la media de mediciones por triplicado de cada muestra de suero de fagos ensayados y fagos vacíos. La línea horizontal constituye el valor de corte de una señal positiva, es decir 3 SD por encima de la relación media entre DO (fago) / DO (fago vacío) del grupo HC. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Figura 5: Comparación de los niveles de anticuerpos contra antígenos candidatos de AR identificados entre pacientes con AR, pacientes de control con otras enfermedades reumáticas y controles sanos (HC). Los gráficos de dispersión muestran las relaciones media entre DO (clon AR) / DO (fago vacío) de 48 pacientes con AR, 30 pacientes con otras enfermedades inflamatorias reumáticas y 38 controles sanos. (A) UH-RA.1, (B) UH-RA.2, (C) UH-RA.7, (D) UH-RA.11, (E) UH-RA.15, (F) UH-RA.16, (G) UH-RA.20. No había diferencia significativa en los niveles de anticuerpos entre los pacientes con AR, los pacientes con otras enfermedades reumáticas y los controles sanos que se pudieran discernir. Cada símbolo representa la media de mediciones por triplicado de cada muestra de suero en los fagos ensayados y los fagos vacíos. La línea horizontal constituye el valor de corte de una señal positiva, es decir 3 SD por encima de la relación DO media (fago) / DO (fago vacío) del grupo HC.

Figura 6: La especificidad de la inmunorreactividad de AR contra los productos ADNc presentados se ensayó por ELISA de péptido y competitivo. (A) Ejemplo representativo de la reactividad contra el péptido UH-RA.21 sintético de revestimiento (barras blancas) en 10 muestras de AR (RA-p.1 a RA-p.10). Como control negativo, se incubaron las muestras también con un péptido sintético no relevante (barras negras). (B) La competición del fago que presenta el péptido UH-RA.21 correspondiente con el péptido de revestimiento demostraba la especificidad de los anticuerpos del suero contra el péptido presentado por el fago. Se pre-incubaron cantidades crecientes de partículas del fago UH-RA.21 con suero de AR positivo al anticuerpo anti-UH-RA.21 (línea continua negra) (determinado por ELISA de fago) seguido por transferencia de esta mezcla a un formato ELISA de péptido sintético revestido con péptido UH-RA.21. En paralelo, un suero de AR negativo a anticuerpos (línea discontinua) se pre-incubó con el fago que presentaba UH-RA.21 y se trató de manera idéntica que el suero positivo a anticuerpos. (C) Como control negativo, las muestras de suero AR positivas a anticuerpos (línea negra continua) y negativas a anticuerpos (línea discontinua) se pre-incubaron con cantidades crecientes de partículas de fago vacías.

Figura 7: Resultados de un ELISA de péptido sintético que cribaba en muestras de suero de pacientes con AR y diferentes grupos de control la inmunorreactividad de anti-UH-RA.21. Dieciocho de 78 pacientes con AR (un 23 %), 6 de 49 pacientes OA (un 12 %), 5 de 26 pacientes con artritis psoriásica (un 19 %), 5 de 35 pacientes con espondilitis anquilosante (un 14 %), 2 de 48 HC (un 4 %) y 1 de 42 sujetos con molestias mecánicas articulares (un 2 %) eran positivos a anticuerpos contra UH-RA.21. Se demostraron diferencias significativas en la reactividad de anticuerpos contra UH-RA.21 entre pacientes AR y el grupo combinado de HC y sujetos con molestias mecánicas articulares por una parte, y entre pacientes AR y pacientes OA por otra. Las relaciones entre las DO_{450} medidas para el péptido no relevante se muestran en todos los pacientes ensayados.

Objetivos y descripción detallada de la invención

Las enfermedades artríticas incluyen tanto la artritis reumatoide (AR) seropositiva como la artritis seronegativa crónica, un grupo prototípico de enfermedades autoinmunitarias que se caracterizan por la no reactividad de los anticuerpos del suero contra el factor reumatoide (FR) o antígenos citrulinados proteicos (ACPA). Estos subtipos incluyen la artritis reumatoide (AR) seronegativa, (un 30 % de los pacientes con AR son negativos al FR o ACPA), espondiloartropatía (SpA), artritis psoriásica (Psa) y artritis juvenil idiopática (JIA). Estas enfermedades tienen una prevalencia relativamente alta (que varía de 1 en 100 para AR), no se pueden curar y se asocian con una alta morbilidad. En la presente invención los inventores han identificado un panel de biomarcadores que se puede utilizar para la detección de artritis autoinmunitarias crónicas, más específicamente para la detección de artritis reumatoide (AR) en pacientes. Los biomarcadores se aislaron con la tecnología de Selección Serológica de Antígenos (SAS) en el que se identificaron los antígenos (es decir, los biomarcadores) que se unían a los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes que tenían artritis reumatoide. Más específicamente, se cribó una biblioteca de fagos ADNc de presentación que comprendía productos de ADNc derivados del tejido sinovial de AR – que se expresaban como una fusión con una proteína menor de revestimiento pVI del fago filamentos M13 – para identificar clones ADNc que se unían a los auto-anticuerpos en los especímenes de suero de pacientes con AR. Para identificar los marcadores para AR temprana y negativa a FR (FR-), negativa a ACPA (ACPA-), la biblioteca ADNc de AR se dividió en dos grupos, el primero consistía en sueros de pacientes AR con duración de la enfermedad menor de un año, el segundo contenía sueros de pacientes con AR negativos a FR y negativos a ACPA. Se recuperó un panel de biomarcador de

14 dianas ADNc antigénico con alta especificidad para AR.

Por lo tanto, en una primera realización la invención proporciona polipéptidos (es decir, al menos un polipéptido) que se pueden utilizar como biomarcadores o para ayudar en el diagnóstico, por ejemplo, de artritis reumatoide. Dicho polipéptido consiste en una secuencia que se selecciona de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1. También se proporcionan composiciones que comprenden al menos un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre la de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos que se derivan de SEQ ID NO: 1. En una realización específica más, la composición consiste en al menos un polipéptido.

También, se proporciona una composición que comprende al menos dos polipéptidos diferentes que comprenden una secuencia que se representa por cualquiera de SEQ ID NO: 2-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos que se derivan de SEQ ID NO: 2-14. Estos polipéptidos o composiciones se designan también en el presente documento como biomarcadores o como un panel de biomarcadores o como un grupo de biomarcadores. SEQ ID NO: 1-14 se corresponde con las secuencias de aminoácidos traducidas de los antígenos recuperados por la selección en la biblioteca de expresión de fagos que presentan ADNc de AR en el fluido de suero derivado de pacientes con AR. La traducción de las inserciones de UH-RA.21 se corresponde con SEQ ID NO: 1, la de UH-RA.11 con SEQ ID NO:2, de UH-RA.14 con SEQ ID NO: 7, de UH-RA.7 con SEQ ID NO: 8, de UH-RA.9 con SEQ ID NO: 9, de UH-RA.10 con SEQ ID NO: 10, UH-RA.13 con SEQ ID NO: 11, de UH-RA.17 con SEQ ID NO: 12, de UH-RA.20 con SEQ ID NO: 13, y la traducción de la inserción de UH-RA.22 se corresponde con SEQ ID NO: 14 (véase la Tabla 7). Las secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NO: 1-14 se representan en SEQ ID NO: 15-28 (en el que SEQ ID NO: 15 codifica SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 28 codifica SEQ ID NO: 14). Como está claro para el experto, también se pueden utilizar uno o más de los ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 15-28) como biomarcadores, por ejemplo, teniéndolos transcritos o traducidos; o detectando los ácidos nucleicos directamente en vez de detectar las proteínas, por ejemplo mediante PCR cuantitativa.

Por lo tanto, una composición comprende al menos un polipéptido, o posiblemente al menos dos polipéptidos, en la que dicho polipéptido comprende una secuencia como se presenta en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14. Esto significa que un polipéptido que esté presente en la composición también puede ser una proteína, particularmente cuando la composición contiene al menos dos polipéptidos. Como ejemplo se clonó SEQ ID NO: 12 como un fragmento parcial de 76 aminoácidos de la selenoproteína P (producto proteico detectado utilizando SAS). Como SEQ ID NO: 12 (que se corresponde con UH-RA.17) es un fragmento de la proteína selenoproteína P, la composición también puede comprender la proteína selenoproteína P de longitud completa. La composición también puede comprender al menos uno, o al menos dos polipéptidos diferentes, en la que dicho polipéptido(s) son fragmentos que comprenden al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14. Se concibe que 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 son suficientes para ser reconocidos como antígenos por los autoanticuerpos presentes por ejemplo en el suero sanguíneo o el plasma sanguíneo.

De acuerdo con ejemplos particulares adicionales, los fragmentos de los polipéptidos comprenden al menos 6 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14, o al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos derivados de SEQ ID NO: 1-14. De acuerdo con un ejemplo específico, las secuencias de polipéptido que se utilizan no son completamente idénticas a SEQ ID NO: 1-14, sino casi idénticas. Por ejemplo, muestran un 99 % de identidad de secuencia, un 98 % de identidad de secuencia, un 95 % de identidad de secuencia, un 90 % de identidad de secuencia, o un 85 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 1-14. El porcentaje de identidad de secuencia se calcula de acuerdo con métodos que se conocen en la técnica, por ejemplo, el algoritmo BLAST. Las siguientes expresiones se utilizan normalmente para describir las relaciones de secuencia ente dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", y (c) "porcentaje de identidad de secuencia".

(a) Como se utiliza en el presente documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida que se utiliza como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo o la totalidad de una secuencia especificada, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de la misma.

(b) Como se utiliza en el presente documento, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótido o aminoácidos, en el que la secuencia de polinucleótido o aminoácidos se puede comparar con una secuencia de referencia y en el que la parte de la secuencia de polinucleótido o aminoácidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los expertos en la técnica entienden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia de polinucleótido o aminoácidos, se introduce normalmente una penalización por huecos y se resta del número de coincidencias. Nótese que para alinear secuencias que no son de longitud similar, la ventana de comparación habitualmente se determina utilizando la más corta de las dos secuencias.

(c) Como se utiliza en el presente documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor que se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en la que la parte

de la secuencia de polinucleótido o aminoácidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que existe la misma base de ácido nucleico o aminoácido en ambas secuencias para dar como resultado el número de posiciones coincidentes, se divide el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones de la ventana de comparación y se multiplica el resultado por 100 para dar como resultado el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación se conocen bien en la técnica. Las comparaciones genéticas se pueden determinar ejecutando las búsquedas con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., (1993) J. Mol. Biol. 215:403-410; véase también, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) con parámetros por defecto para identificar las secuencias contenidas en la base de datos BLAST "GENEMBL".

De acuerdo con un ejemplo específico, las secuencias de polipéptido que se utilizan no son completamente idénticas a SEQ ID NO: 1-14, sino altamente similares, es decir, tienen aminoácidos que se han sustituido de manera conservadora. Esto implica que uno o más aminoácidos hidrófobos se han remplazado con otros aminoácidos hidrófobos (o viceversa para los aminoácidos hidrófilos), uno o más aminoácidos cargados positivamente se han remplazado con otros aminoácidos cargados positivamente (o viceversa para los aminoácidos cargados negativamente), y así. El porcentaje de similitud puede determinarlo un experto, por ejemplo, utilizando el programa BLAST. En particular, las secuencias que se utilizan son similares en un 99 %, similares en un 98 %, similares en un 97 %, similares en un 95 % o similares en un 85 % a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-14.

En un ejemplo particular, la composición comprende 14 polipéptidos diferentes que comprenden una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 1-14 o 14 fragmentos diferentes que comprenden al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14.

En otra realización la invención proporciona el uso de una composición de la invención para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra al menos un polipéptido presente en dicha composición en el que dichos anticuerpos están presentes en un fluido corporal de un mamífero.

En otra realización particular la invención proporciona el uso de una composición de la invención para detectar la presencia de autoanticuerpos específicos contra al menos un polipéptido presente en dicha composición en el que dichos autoanticuerpos están presentes en un fluido corporal de un mamífero.

En realizaciones particulares dicho uso de una composición es un uso "*in vitro*" de una composición. Esto último implica un método de diagnóstico sin la interacción directa con el paciente. En otro ejemplo más, la memoria descriptiva proporciona el uso de una composición de la invención para la creación de un ensayo de diagnóstico para detectar trastornos autoinmunitarios, más específicamente para el diagnóstico de trastornos reumatoides, artritis autoinmunitaria crónica, e incluso más específicamente para el diagnóstico de artritis reumatoide.

La expresión "fluido corporal" incluye la sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, saliva, orina, lágrimas, fluido de médula ósea, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido sinovial, fluido linfático, aspiración de fluido mamario, y similares. Los fluidos corporales preferidos para el análisis son los que se obtienen convenientemente de pacientes, los fluidos corporales particularmente preferidos incluyen el suero sanguíneo, plasma sanguíneo y líquido sinovial.

Se proporciona un método para detectar artritis reumatoide en un mamífero que comprende i) detectar la presencia de al menos un anticuerpo en un fluido corporal que se deriva de dicho mamífero en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad para un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la presencia de dicho anticuerpo indica que dicho mamífero padece artritis reumatoide.

En otra realización más, la invención proporciona un método para detectar artritis reumatoide con un estadio de enfermedad de menos de un año.

En otra realización más, la invención proporciona un método para detectar artritis reumatoide en un fluido corporal derivado de un mamífero que es seronegativo al factor reumatoide y/o anticuerpos anti-CCP.

En otra realización más, el método para detectar la artritis reumatoide en un mamífero de la presente invención se combina con la detección del factor reumatoide, péptidos citrulinados (por ejemplo, documentos US6858438, WO2007017556), una combinación entre factor reumatoide y péptidos citrulinados, péptidos citrulinados e interleucina-6 como en el documento WO2005064307, incluso otros antígenos tales como por ejemplo los descritos en los documentos US5585464, US5888833 y WO0146222).

Se proporciona un método para evaluar el pronóstico / la gravedad de la enfermedad de artritis reumatoide en un mamífero que comprende i) detectar la presencia o cantidad de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho mamífero en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad para un polipéptido que comprende

una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la presencia de una concentración (disminuida o aumentada) de dicho anticuerpo indica el pronóstico de artritis reumatoide en dicho mamífero.

5 Se proporciona un método para seleccionar mamíferos para un tratamiento terapéutico específico de artritis reumatoide o evaluar el tratamiento terapéutico de artritis reumatoide en un mamífero que comprende i) detectar la presencia o cantidad de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho mamífero en el que dicho anticuerpo tiene una especificidad por un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos
10 derivados de SEQ ID NO: 1-14 y en el que ii) la presencia o concentración aumentada de dicho anticuerpo da lugar a una elección de un tratamiento terapéutico específico de artritis reumatoide en dicho mamífero. En una realización preferida dicho fluido corporal es suero, plasma o líquido sinovial. En otra realización preferida dicho mamífero es un ser humano.

15 Se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que se selecciona de entre el grupo que consiste en polipéptidos representados por SEQ ID NO: 1-14. Los métodos para generar anticuerpos se conocen bien en la técnica. En un ejemplo preferido los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Con el fin de la generación de anticuerpos, los polipéptidos que forman parte de las composiciones de la invención se pueden sintetizar químicamente o pueden producirse de manera recombinante. Pueden acoplarse también con un portador soluble después de la
20 síntesis o después de la producción recombinante. Si se utiliza un portador, la naturaleza de dicho portador debería ser tal que tenga un peso molecular mayor de 5000 y no debería ser reconocido por anticuerpos. Dicho portador puede ser una proteína. Las proteínas que se utilizan frecuentemente como portadoras son hemocianina de lapa californiana, gammaglobulina bovina, seroalbúmina bovina, y poli-L-lisina. Hay muchas técnicas bien descritas para acoplar los péptidos a los portadores. La unión puede producirse en el extremo N, el extremo C o en un sitio interno del péptido. El polipéptido también puede derivarse para el acoplamiento. Los polipéptidos también se pueden sintetizar directamente en un centro oligolisina en el que se utilizan tanto los grupos amino alfa como épsilon de las lisinas como puntos de crecimiento para los polipéptidos. El número de lisinas que comprende el centro es preferentemente de 3 o 7. Adicionalmente, se puede incluir una cisteína cerca o en el extremo C del complejo para facilitar la formación de homo o heterodímeros.

30 En términos generales la invención se refiere a un proceso para detectar anticuerpos (es decir, autoanticuerpos) relacionados con AR u otros trastornos reumáticos / autoinmunitarios en una muestra biológica (tal como suero o plasma) de un mamífero que pudiera contenerlos, este proceso comprende poner en contacto la muestra biológica con una composición de acuerdo con la invención en condiciones que hagan posible una reacción inmunológica entre dicha composición y los anticuerpos que estén presentes posiblemente en la muestra biológica y la detección del complejo antígeno/anticuerpo que se puede formar. La detección se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier proceso clásico. A modo de ejemplo, se pueden utilizar procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA o inmunofluorescentes o radioinmunológicos (RIA) o equivalentes. Por lo tanto, la invención también se refiere a polipéptidos de acuerdo con la invención marcados con un marcador apropiado de tipo enzimático,
40 fluorescente, biotina, radioactivo. Dicho método para detectar anticuerpos relacionados con AR comprende por ejemplo las siguientes etapas: depositar cantidades determinadas de una composición polipeptídica de acuerdo con la invención en un soporte (por ejemplo, en pocillos de una microplaca de titulación), introducir en dicho soporte (por ejemplo, en los pocillos) diluciones crecientes del fluido corporal (por ejemplo, suero) que se va a diagnosticar, incubar el soporte (por ejemplo, la microplaca), aclarar repetidamente el soporte (por ejemplo, la microplaca),
45 introducir en el soporte anticuerpos marcados que son específicos de las inmunoglobulinas presentes en el fluido corporal, estando basada la marcación de estos anticuerpos en la actividad de una enzima que se selecciona de entre las que son capaces de hidrolizar un sustrato modificando la absorción de la radiación de este último al menos en una determinada longitud de onda, detectar comparando con un control convencional la cantidad de sustrato hidrolizado.

50 En otro ejemplo más, la memoria descriptiva se refiere también a un proceso para detectar e identificar antígenos de AR en un espécimen corporal (tejido, biopsia...) que sea posible que los contenga, este proceso comprende: poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo apropiado (es decir, anticuerpo con una especificidad por un polipéptido de la composición) en condiciones que permitan una reacción inmunológica entre dicho anticuerpo y los antígenos de AR que es posible que estén presentes en la muestra biológica y la detección del complejo antígeno/
55 anticuerpo que se pueda formar.

60 Por lo tanto, los anticuerpos, en particular autoanticuerpos, que reconocen los polipéptidos de la invención, se pueden detectar de varias maneras. Un método de detección se describe adicionalmente en los ejemplos y utiliza el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de los polipéptidos de la invención presentados por fagos (es decir, una tecnología de ELISA de fago). La última tecnología se describe completamente en Somers V. et al (2005) J. of Autoimmunity 25: 223-228).

65 En otras maneras de la detección por ELISA, un polipéptido o mezcla de polipéptidos se une a un soporte sólido. En algunos casos, será una placa de microtitulación pero puede ser en principio cualquier clase de fase sólida insoluble (por ejemplo, cristal, nitrocelulosa). En una realización se pone en contacto una dilución o diluciones adecuadas de,

por ejemplo suero que se va a ensayar, con la fase sólida a la que se une el polipéptido. En otra realización se lleva a cabo "una solución de hibridación" en la que se producen interacciones de alta afinidad (por ejemplo, se preincuban polipéptidos biotinilados de la composición con suero). La incubación se lleva a cabo durante el tiempo necesario para permitir que se produzca la reacción de unión. Posteriormente, se eliminan los componentes no unidos por lavado de la fase sólida. La detección de complejos inmunitarios (es decir, los autoanticuerpos presentes por ejemplo en el suero humano que se han unido al menos a un polipéptido de la invención) se consigue utilizando anticuerpos que se unen específicamente a inmunoglobulinas humanas, y que se han marcado con una enzima, preferentemente pero no limitadas a peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, o beta-galactosidasa, que sea capaz de convertir un sustrato o co-sustrato transparente o casi transparente en un producto altamente coloreado o un producto capaz de formar un complejo coloreado con un cromógeno. De manera alternativa, el sistema de detección puede emplear una enzima que, en presencia del sustrato apropiado, emita luz. La cantidad de producto formado se detecta o visualmente, o por espectrofotometría, electroquímica, fluorescencia o luminometría, y se compara con un control tratado de manera similar. El sistema de detección puede emplear también anticuerpos marcados radioactivamente, en cuyo caso la cantidad de complejos inmunitarios se cuantifica por recuento de centelleo o recuento gamma. Otros sistemas de detección que se pueden utilizar incluyen los que se basan en el uso de proteína A derivada de la cepa I Cowan de *Staphylococcus aureus*, proteína G del grupo C de *Staphylococcus sp.* (cepa 26RP66), o sistemas que utilizan la reacción de unión de alta afinidad biotina-avidina o estreptavidina.

Los polipéptidos de la invención pueden estar marcados o no marcados. Los marcadores que se pueden emplear pueden ser de cualquier tipo, tales como enzimáticos, químicos, fluorescentes, luminiscentes, o radioactivos. Además, los polipéptidos se pueden modificar uniéndolos a superficies o fases sólidas, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación, membranas de nilón, perlas de cristal o plástico, y soportes cromatográficos tales como celulosa, sílice, o agarosa. Los métodos por los que se pueden unir los polipéptidos o anclarse a un soporte sólido o superficie son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de acuerdo con técnicas clásicas en el campo de la síntesis de péptidos. La síntesis se puede llevar a cabo en una solución homogénea o en una fase sólida. Por ejemplo, la técnica de síntesis en solución homogénea que se puede utilizar es la que describe Houbenweyl en el libro titulado "Methode der organischen chemie" (Método de química orgánica) editado por E. Wunsh, vol. 15-I et II. THIEME, Stuttgart 1974. Los polipéptidos de la invención pueden prepararse también en una fase sólida de acuerdo con el método descrito por Atherton y Shepard en su libro titulado "Solid phase peptide synthesis" (Ed. IRL Press, Oxford, NY, Tokyo, 1989). Los protocolos de síntesis de la técnica emplean en general el uso de aminoácidos activados protegidos con t-butiloxicarbonilo o 9-fluoroenilmetoxi-carbonilo. Los procedimientos para llevar a cabo la síntesis, los tipos de protección de las cadenas laterales, y los métodos de escisión se describen ampliamente, por ejemplo en Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Edición, Pierce Chemical Company, 1984; y Atherton y Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, 1989.

En otras realizaciones de anticuerpos más que se originan contra los polipéptidos de la invención (o polipéptidos unidos a portadores) se pueden utilizar también en conjunto con polipéptidos marcados de la invención para la detección de (auto)-anticuerpos presentes por ejemplo, en el suero por un ensayo de competición. En este caso los anticuerpos que se originan contra los polipéptidos se anclan en un soporte sólido que puede ser, por ejemplo, una perla de plástico o un tubo de plástico. El polipéptido marcado se mezcla entonces con diluciones adecuadas del fluido (por ejemplo, suero) que se va a ensayar y esta mezcla se pone en contacto posteriormente con el anticuerpo unido al soporte sólido. Tras un periodo de incubación adecuado, el soporte sólido se lava y se cuantifica la cantidad de polipéptido marcado. Una reducción de la cantidad de marcador unido al soporte sólido es indicativa de la presencia de (auto)-anticuerpos en la muestra original. De la misma forma, el polipéptido se puede unir también al soporte sólido. Entonces se puede permitir que el anticuerpo marcado compita con el (auto)-anticuerpo presente en la muestra (por ejemplo, suero) en condiciones en las que la cantidad de polipéptido es limitante. Como en el ejemplo previo, una reducción en la señal medida es indicativa de la presencia de (auto)-anticuerpos en la muestra ensayada.

En una realización particular un ensayo que da una prueba del hecho de que se han reconocido uno o más polipéptidos presentes en una composición de la invención por los anticuerpos presentes en por ejemplo, un suero (por ejemplo, autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con artritis reumatoide) es un análisis de inmunotransferencia (o transferencia de Western) o un ensayo LINE. En el último caso, los polipéptidos se pueden sintetizar químicamente o los polipéptidos (o la proteína) se puede producir por medio de técnicas recombinantes. En resumen, tras la electroforesis en gel de dodecil sulfato de poliácridamida sódica, los polipéptidos de la invención se transfieren a membranas de nitrocelulosa (por ejemplo Hybond C. (Amersham)) como describen Towbin H. et al., 1979, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354. Con el fin de identificar el reconocimiento selectivo de polipéptidos (o proteínas) de la invención por el suero, las láminas de nitrocelulosa se incuban durante una noche con cada una de estas muestras (por ejemplo, diluidas 1:50) (tras bloquearlas en sitios de unión a proteínas específicos). Las áreas reactivas en las láminas de nitrocelulosa se revelan por la incubación con, por ejemplo, anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana de cabra conjugado con peroxidasa (por ejemplo, diluido a 1:200), y tras repetidos lavados, se desarrolla la reacción de color añadiendo por ejemplo alfa-cloronaftol (Bio-Rad Laboratories,

Richmond, Calif.) en presencia de peróxido de hidrógeno. No hace falta decir que las funciones de reactivos libres que están presentes en algunos aminoácidos, que son parte de la constitución de los polipéptidos de la invención, particularmente los grupos carboxilo libres que portan los grupos Glu y Asp o por el aminoácido del extremo C por un lado y/o los grupos NH₂ libres que portan el aminoácido del extremo N o por aminoácidos en el interior de la cadena peptídica, por ejemplo, lisina, por otro, se pueden modificar de manera que esta modificación no altere las propiedades mencionadas anteriormente del polipéptido. Los polipéptidos que se modifican de esta manera son parte naturalmente de la invención. Los grupos carboxilo mencionados anteriormente pueden estar acilados o esterificados. Otras modificaciones también son parte de la invención. Particularmente las funciones amina o carboxilo o ambas de los aminoácidos terminales pueden por sí mismos estar implicados en la unión con otros aminoácidos. Por ejemplo, el aminoácido del extremo N puede unirse al aminoácido del extremo C de otro péptido que comprenda de 1 a varios aminoácidos.

Además, cualquier secuencia peptídica que resulte de la modificación por sustitución y/o por adición y/o por eliminación de uno o varios aminoácidos de los polipéptidos son parte de la divulgación siempre que esta modificación no altere las propiedades mencionadas anteriormente de dichos polipéptidos. Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden estar glicosilados o no, particularmente en algunos de sus sitios de glicosilación tipo Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, representando X cualquier aminoácido.

Un polipéptido recombinante ventajoso de la composición de la invención es SEQ ID NO: 1 (UH-RA.21) ya que este polipéptido muestra la mayor frecuencia de respuestas de anticuerpo en el suero de pacientes con AR.

También son posibles variaciones de estos polipéptidos dependiendo del uso que se pretenda. Por ejemplo, si el polipéptido se va a utilizar para originar antisueros, el polipéptido se puede sintetizar con un resto de cisteína extra añadido. Este resto de cisteína extra se añade preferentemente al extremo amino y facilita el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora que es necesaria para hacer que el polipéptido sea inmunogénico. Si el polipéptido es para ser marcado para su uso en radioinmunoensayos, puede ser ventajoso sintetizar la proteína con una tirosina unida al extremo amino o carboxilo para facilitar la yodación. Este polipéptido posee por lo tanto, la secuencia primaria del polipéptido mencionado anteriormente pero con aminoácidos adicionales que no aparecen en la secuencia primaria de la proteína y cuya única función es darle las propiedades químicas deseadas al polipéptido.

En otra realización más la invención proporciona un kit para diagnosticar AR. Para llevar a cabo el método de diagnóstico para AR, se puede utilizar lo necesario siguiente o el kit, dicho lo necesario o el kit comprende: una composición (que comprende al menos un polipéptido que se selecciona de SEQ ID NO: 1-14) o al menos un fragmento que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 1-14, reactivos para producir un medio apropiado para que se produzca la reacción inmunológica, reactivos que hagan posible la detección del complejo antígeno/anticuerpo que se ha producido por la reacción inmunológica, dichos reactivos tienen posiblemente un marcador, o son susceptibles de ser reconocidos por un reactivo marcado, más particularmente en el caso en que el polipéptido mencionado anteriormente no esté marcado.

En los siguientes ejemplos y las figuras aparecerán otras características y ventajas que ilustran la invención.

Ejemplos

1. Construcción de una biblioteca de fagos ADNc de presentación de AR

El tejido sinovial de AR para la construcción de la biblioteca se analizó inmunohistoquímicamente antes de su uso. Se demostró una inflamación grave y en desarrollo por la presencia de infiltrados inflamatorios que consistían primariamente en macrófagos y linfocitos T. Los linfocitos B eran menos prominentes y se localizaban primariamente perivascularmente. No se detectó ninguna estructura central germinal. La construcción de la biblioteca primaria en el vector λ -Uni-ZAP XR daba como resultado la generación de una biblioteca AR λ -Uni-ZAP XR con una diversidad primaria de $4,5 \times 10^6$ recombinantes. Tras la escisión de la masa, la digestión por enzimas de restricción y la clonación direccional en sus vectores fagémidos, los inventores obtuvieron bibliotecas de presentación pSPVI-A/B/C de AR que contenían respectivamente $4,6 \times 10^6$, $8,5 \times 10^6$ y $5,3 \times 10^6$ ufc. La secuenciación de las bibliotecas pSPVI de AR resultantes mostraban la presencia de secuencias de ADNc que codificaban conocidos componentes sinoviales y del cartílago (colágeno, osteonectina), antígenos candidatos de AR (por ejemplo, fibronectina), y genes desconocidos.

2. Selección por afinidad de una biblioteca de fagos ADNc de presentación de AR

Para enriquecer la biblioteca de fagos ADNc de presentación de AR en productos de ADNc que sean reconocidos específicamente por IgG presentes en el suero de pacientes con AR temprana o FR-ACPA-, se llevaron a cabo sucesivas rondas de selección con un agrupamiento de sueros de AR temprana y un agrupamiento de sueros de AR RF-ACPA-. Se representa un esquema del procedimiento SAS en la figura 1. Los fagos que presentaba la biblioteca de expresión de ADNc de AR se incubaron con un agrupamiento de suero de AR, lo que daba como resultado la formación de complejos antígeno-anticuerpo entre las IgG de AR y sus antígenos diana presentados en la superficie del fago. Tras la retención de estos complejos fago-IgG, se amplificó la producción de fagos en bacterias huésped y

se utilizaron como entrada en la siguiente ronda de selección. Repitiendo este ciclo de selección por afinidad y amplificación de la biblioteca de fagos de presentación AR con suero de AR, se enriquecerán los fagos de presentación diana de AR. Además, como la selección por afinidad se produce en un formato en fase de solución, se esperarían interacciones fago-anticuerpo de alta afinidad.

5 Para ambos agrupamientos de suero, se llevaron a cabo 4 rondas de selección consecutivas en la biblioteca de fagos de presentación de AR. La extensión del enriquecimiento de fagos se controló a lo largo del procedimiento de selección por determinación de la relación de producción de fagos respecto al título de entrada de fagos (relación salida:entrada). Como se muestra en la tabla 4, la relación de salida:entrada de fagos aumenta con el aumento de
10 rondas de selección para ambos agrupamientos de suero, indicando un enriquecimiento específico de fagos. La pequeña disminución en el título de salida:entrada en la ronda 2 en comparación con la primera ronda se puede explicar por un aumento de la rigurosidad de la selección de la primera ronda en curso.

3. Cribado para el enriquecimiento del fago de salida

15 Para identificar los clones de fago que se enriquecieron por la aplicación de las rondas de selección por afinidad con los dos agrupamientos de suero, se llevaron a cabo técnicas de PCR de colonia e identificación genética de ADN sobre el fago de salida de las rondas de selección 2, 3 y 4. La aplicación de estas técnicas genera perfiles de restricción característicos para cada clon de ADNc. La presencia creciente de un perfil de restricción particular con
20 un número creciente de rondas de selección indica el enriquecimiento de este clon ADNc particular a lo largo del procedimiento de selección. En total, se cribaron 250 clones de fagos que se obtuvieron de las selecciones en ambos agrupamientos de suero (rondas de selección 2, 3 y 4) por PCR de colonia y análisis de identificación genética (tabla 1). Aunque el fago de salida de la segunda ronda mostraba aún un alto grado de diversidad, a partir de la de la tercera ronda sin embargo, los perfiles de identificación genética específicos se volvieron más
25 prominentes, indicando el enriquecimiento de clones específicos (datos no mostrados). En la cuarta ronda solo se podía discernir un número limitado de patrones de identificación genética, indicando el enriquecimiento dominante de unos pocos clones de fagos. El cribado dio como resultado la identificación de 22 clones ADNc enriquecidos que se anotaron con el nombre UH-RA.número, que es el número acordado del clon de AR (tabla 5). Se obtuvieron once clones ADNc enriquecidos (UH-RA.1- UH-RA.11) de selecciones sobre el agrupamiento de AR temprana, mientras
30 que se identificaron 6 clones de ADNc enriquecidos (UH-RA.12- UH-RA.17) de selecciones en el agrupamiento de AR FR- ACPA-. Extraordinariamente, se alcanzaron 5 clones de fago comunes (UH-RA.18- UH-RA.22) de las selecciones de ambos agrupamientos. Dieciocho de estos 22 clones de fagos identificados se enriquecieron en la cuarta ronda de selección. Casi siempre se detectaron en las rondas de selección tempranas también, no obstante en frecuencias decrecientes, indicando que el enriquecimiento de estos clones de fago se producía aumentando las
35 rondas de selección. Los otros 4 clones de fago se detectaron muchas veces en las rondas de selección más tempranas: los clones de fago UH-RA.9, UH-RA.15 y UH-RA.16 se enriquecieron en la tercera ronda de selección, mientras que el clon UH-RA.11 se encontró 2 veces en la segunda ronda de selección.

4. Cribado por ELISA de fago de 22 clones candidatos enriquecidos con los sueros utilizados para las selecciones por afinidad

40 Para confirmar que el enriquecimiento de 22 clones candidatos se había producido basándose en interacciones con anticuerpos de pacientes con AR, se analizaron las inmunorreactividades contra los clones de fagos con los sueros de AR individuales que constituían los agrupamientos por medio de una técnica de ELISA de fago. Los fagos que presentaban un producto de ADNc específico se incubaron con especímenes individuales de suero, y si el suero individual contenía anticuerpos dirigidos contra el producto de ADNc presentado por el fago, se producía la formación de complejos fago-anticuerpo, a continuación se detectaban estos complejos. Se demostró una asociación excelente entre los clones ADNc seleccionados y la inmunorreactividad de sueros individuales de los agrupamientos contra los clones; se encontró una inmunorreactividad (del 100 %) contra los 22 clones en al menos
45 1 de las 10 muestras de suero del agrupamiento correspondiente, confirmando el enriquecimiento basándose en la inmunorreactividad humoral contra los clones. Para dieciséis de 20 sueros (80 %) de ambos agrupamientos, se demostró inmunorreactividad contra al menos uno de los 22 clones.

5. Análisis serológico de los 22 clones enriquecidos

55 Para determinar cuáles de los clones de fago enriquecidos se caracterizaban por inmunogenicidad relacionada con AR, se llevó a cabo un ELISA de fago sobre los 22 clones, utilizando 38 muestras de AR que no se habían utilizado para las selecciones por afinidad, 38 sueros de controles sanos y 30 sueros de pacientes con otras enfermedades inflamatorias reumáticas (tabla 1) para analizar la frecuencia de respuestas de anticuerpo. Los resultados se muestran en la tabla 5.

60 Para 14 de los 22 clones enriquecidos no se encontró reactividad en las 38 muestras de HC, constituyendo los clones con un perfil serológico relacionado con AR. Para los restantes 8 clones de fago enriquecidos sin embargo, se detectó también reactividad en el grupo de HC (tabla 5). Además, los anticuerpos contra 11 de los 14 clones relacionados con AR se detectaban específicamente en pacientes con AR mientras que las inmunorreactividades de los restantes 3 (UH-RA.1, UH-RA.13 y UH-RA.21) también se demostraban en el grupo de pacientes de otras

enfermedades reumáticas.

La inmunorreactividad contra UH-RA.21 se detectaba en aproximadamente un tercio de la población de estudio de AR de los inventores: 15 de 48 pacientes (un 31 %) tenían niveles elevados de anticuerpos contra este clon. Sin embargo, también 6 de 30 muestras de pacientes reumáticos de control presentaban reactividad contra el clon de ADNc: 4 de 6 eran sueros de pacientes con espondilitis anquilosante, los otros 2 sueros de pacientes con artritis psoriásica. La inmunorreactividad contra UH-RA.1 se podía detectar en 6 de 48 pacientes con AR (un 13 %), pero también en 2 de 19 pacientes con espondilitis anquilosante.

Los clones UH-RA.9, UH-RA.10, UH-RA.11, UH-RA.14, UH-RA.15 y UH-RA.16 por otro lado, también mostraban una frecuencia relativamente alta de inmunogenicidad en pacientes con AR como se muestra en la tabla 5. Además, esta inmunogenicidad es específica de AR y no se detectaba en el grupo de reumáticos de control. Para 8 de 48 pacientes con AR (un 17 %) se encontraban niveles elevados de anticuerpos contra UH-RA.14. La inmunorreactividad contra UH-RA.9, UH-RA.10, UH-RA.11, UH-RA.15 y UH-RA.16 se demostró en respectivamente 4 (un 8 %), 5 (un 10 %), 6 (un 13 %), 4 (un 8 %) y 3 (un 6 %) de los 48 pacientes con AR.

6. Análisis de secuencia

Los análisis de secuencia de los 14 clones con un perfil serológico relacionado con AR se llevaron a cabo para obtener la identidad del panel antigénico relacionado con AR. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se compararon con las bases de datos GenBank y Swissprot con el NCBI BLAST de búsqueda de homología. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los 14 clones se muestran en la tabla 6 y 7 respectivamente.

A nivel de nucleótidos, los inventores encontraron una homología del 100 % con las secuencias de ADN(c) de la base de datos para todos los 14 clones de ADNc identificados. La longitud de los correspondientes péptidos presentados variaba entre 5 y 176 aminoácidos.

Cuatro de los 14 clones de ADNc (UH-RA.11, UH-RA.15, UH-RA.15 y UH-RA.17) codificaban (partes de) proteínas conocidas: proteína A del MHC clase I, mitotina, proteína S6 ribosómica y selenoproteína P (SEPP1). Todos los otros clones constituían nuevas secuencias peptídicas que resultaban de la expresión de nuevas secuencias de ADNc, fuera del marco de expresión de ADNc conocidos o expresión de regiones de ARNm no traducidas (por ejemplo, regiones 3'UTR). Para estos péptidos nuevos los inventores no pudieron encontrar un 100 % de homología con proteínas conocidas llevando a cabo el BLAST en la base de datos Swissprot. Sin embargo, los inventores detectaron homologías con proteínas conocidas a nivel de aminoácidos como se muestra en la tabla 7.

7. Asociación entre AR y la inmunorreactividad contra el panel antigénico

Para el panel identificado de 14 clones, se alcanzaba una sensibilidad del 58 % en el estudio de población con AR de los inventores: se detectaron niveles de anticuerpos elevados contra al menos un clon del panel en 28 de los 48 pacientes con AR. Sin embargo, también se demostró inmunorreactividad contra el panel de los inventores en 10 de los 68 controles ensayados (10 de los 30 pacientes con otras enfermedades reumáticas), que constituían una especificidad para AR del 85 %. Sin embargo, los 28 pacientes con AR que habían demostrado inmunorreactividad contra el panel de 14 clones de los inventores, se detectaron también por reactividad contra solo 6 clones (UH-RA.1, UH-RA.9, UH-RA.10, UH-RA.11, UH-RA.14 y UH-RA.21) fuera de este panel. Por este panel de 6 clones, se aumentó la especificidad a un 91 %, mientras que se mantenía una sensibilidad igual: se encontró inmunorreactividad para solo 7 de los pacientes reumáticos de control contra al menos uno de los 6 clones de fago. Sin embargo, analizando las reactividades contra el panel de 14 clones de los inventores con otro grupo de estudio AR, se podía dar lugar a sensibilidades mayores en comparación con un panel antigénico que comprendía solamente 6 clones. Además, se detectaron específicamente anticuerpos contra 11 de los 14 clones relacionados con AR en pacientes con AR mientras que también se encontraba reactividad contra los 3 clones restantes (UH-RA.1, UH-RA.13 y UH-RA.21) en pacientes con otras enfermedades reumáticas. Para estos 11 clones específicos de AR, se obtenía una sensibilidad del 44 % y una especificidad del 100 %.

A continuación, se analizó una posible asociación entre el diagnóstico de AR y la positividad de anticuerpos contra los clones del panel de los inventores. Se detectó una asociación muy significativa entre el diagnóstico de AR y la inmunorreactividad contra al menos uno de los paneles antigénicos de los 14 productos de ADNc (ensayo exacto de Fisher $p < 0,001$). Además, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de AR y la positividad de anticuerpos contra los clones UH-RA.9, UH-RA.11, UH-RA.10, UH-RA.14, UH-RA.15 y UH-RA.21 por separado ($p < 0,05$).

Además, se compararon los niveles de anticuerpos contra un clon ADNc particular entre las diferentes poblaciones de estudio, a saber pacientes con AR, pacientes con otras enfermedades reumáticas y controles sanos por el ensayo de Kruskal-Wallis. Cuando se comparaba el grupo de estudio de los inventores con el grupo de controles sanos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos para 7 de los 14 clones asociados a AR (UH-RA.9, UH-RA.10, UH-RA.13, UH-RA.14, UH-RA.17, UH-RA.21 y UH-RA.22). Además, para UH-RA.10, UH-RA.14 y UH-RA.21, se encontraron niveles de anticuerpos significativamente diferentes cuando se comparaba el grupo de AR con el grupo de pacientes con otras enfermedades reumáticas. Los niveles de

reactividad de los anticuerpos contra UH-RA.10 y UH-RA.21 en las diferentes poblaciones de estudio se muestran en la figura 2.

8. Asociación entre la serología de FR y ACPA y la inmunorreactividad contra el panel antigénico

Los inventores examinaron si la presencia de anticuerpos contra al menos uno de los 14 clones del panel se asociaba con un perfil de FR y ACPA particular. Tras subdividir la población de estudio AR de los inventores de acuerdo con la serología FR y ACPA, se detectó inmunorreactividad contra al menos uno de los 14 clones en 3 de 5 pacientes con AR (un 60 %) FR+ ACPA-, 11 de 17 (un 65 %) FR+ ACPA+, 12 de 22 (un 55 %) FR- ACPA- y 2 de 4 (un 50 %) FR- ACPA+. No se pudo demostrar una asociación estadísticamente significativa entre la reactividad de anticuerpos contra el panel y el perfil serológico FR y ACPA.

El cribado de la reactividad de anticuerpos contra el panel antigénico identificado tiene un valor añadido para el ensayo serológico ACPA y FR.

Treinta y uno de los 48 pacientes con AR (un 65 %) de la población de estudio de AR inicial de los inventores eran seronegativos para al menos uno de los dos marcadores FR y ACPA diagnósticos de AR. Además, 22 de estos 31 (un 46 % de la población de estudio de AR inicial) eran negativos serológicamente a ambos. Basándose en el ensayo diagnóstico de laboratorio convencional para AR, la mitad de los pacientes de estudio de los inventores con AR constituían, por lo tanto, un diagnóstico "difícil". Aunque la toma de muestras de los pacientes se hizo aleatoriamente, este alto porcentaje de pacientes claramente seronegativos sobrevaloraba la necesidad de marcadores de AR adicionales. Detectando anticuerpos contra al menos uno de los 14 productos ADNc identificados, los inventores fueron capaces de identificar 17 de 31 (un 55 %) de pacientes con AR que eran seronegativos para al menos uno de los 2 marcadores diagnósticos convencionales: la inmunorreactividad contra el panel de los inventores se detectó en 12/22 (un 55 %) FR- ACPA-, 3/5 (un 60 %) FR+ ACPA- y 2/4 (un 50 %) FR- ACPA+ de pacientes con AR. La medición de FR y/o ACPA permitía la identificación de un 54 % de pacientes con AR del grupo de estudio inicial, y añadiendo la detección de anticuerpos contra uno de los 11 clones específicos de AR al ensayo diagnóstico, la sensibilidad serológica se aumentaba hasta el 71 % (un 17 % de aumento). Además, si se incluía la detección de anticuerpos contra uno de los 3 clones asociados a AR, se alcanzaba una sensibilidad del 79 % (un 25 % de aumento).

Además, se llevó a cabo una búsqueda de una posible asociación entre la presencia de anticuerpos contra un clon individual en particular del panel y un perfil serológico FR y ACPA. Se encontró una asociación entre la inmunorreactividad humoral contra clones ADNc particulares y serología negativa de FR y ACPA. Se encontró que los pacientes con AR en la población de estudio de los inventores que presentaban reactividad contra UH-RA.2, UH-RA.15 y UH-RA.16 (1, 4 y 3 pacientes con AR respectivamente), eran todos negativos serológicamente a FR y ACPA, lo que demostraba una inmunogenicidad específica en pacientes FR- ACPA- contra estos 3 clones. También 5 de 6 pacientes con AR inmunorreactivos contra UH-RA.11, eran negativos a FR y ACPA. Para el clon UH-RA.14, 7 de 8 pacientes con AR positivos mostraban ser negativos a ACPA (5 pacientes eran FR- y 2 eran FR+). Sin embargo, estas asociaciones de positividad de anticuerpos contra clones particulares y un fenotipo de AR seronegativo no eran estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo número de pacientes.

9. Reactividad de anticuerpos y datos demográficos y clínicos

Los inventores examinaron y compararon las variables demográficas y de la enfermedad entre los pacientes con AR positivos para al menos uno de los 14 clones asociados con AR y los pacientes con AR que se consideraban negativos a anticuerpos para este panel. Los inventores compararon la edad, género, edad de aparición de la enfermedad, duración de la enfermedad, niveles de proteína C reactiva (CRP) y velocidades de sedimentación de eritrocitos (ESR) (tanto en la toma de muestras como en los 3 años de seguimiento), fase de la enfermedad activa frente a inactiva y enfermedad erosiva frente a no erosiva entre las poblaciones de AR positivas y negativas a anticuerpos.

No se observaron diferencias entre la edad, género, edad de aparición de la enfermedad, fase de enfermedad activa frente a inactiva y enfermedad erosiva frente a no erosiva. Los inventores sin embargo, pudieron identificar una asociación ($p = 0,0087$) entre positividad a anticuerpos contra al menos uno de los 14 clones y la duración de la enfermedad temprana en la población de estudio de AR de los inventores, como se muestra en la figura 3. Esto se podría explicar posiblemente en parte por el hecho de que las selecciones por afinidad se llevaron a cabo con un subgrupo de enfermedad temprana de AR, lo que daba lugar a una selección preferente de dianas antigénicas asociadas con una fase de enfermedad temprana. Además, los inventores detectaron una asociación estadísticamente significativa entre la positividad a anticuerpos contra el panel de los inventores y niveles mayores de CRP en la toma de muestras y en el seguimiento ($p = 0,0146$ y $p=0,032$, respectivamente) en comparación con la subpoblación de AR negativa a anticuerpos. La reactividad humoral contra el panel antigénico de los inventores se asociaba por lo tanto con altos niveles de inflamación en la toma de muestras y es predictivo de una actividad de la enfermedad inflamatoria más alta en el seguimiento. Además, para examinar si la reactividad contra un clon individual del panel se asociaba con un fenotipo de AR en particular, los inventores compararon las mismas variables demográficas y de enfermedad en pacientes con AR que eran positivos a anticuerpos y pacientes

negativos a anticuerpos para este clon en particular. A nivel de un clon individual no había diferencias significativas en la edad, género, edad de aparición de la enfermedad, fase de enfermedad activa frente a inactiva y enfermedad erosiva frente a no erosiva. Para los clones UH-RA.10, UH-RA.14 y UH-RA.15, sin embargo, se detectó una asociación entre positividad de anticuerpos y duración más corta de la enfermedad ($p < 0,001$). Con respecto a los niveles de CRP, se podían discernir dos tendencias diferentes. La positividad para UH-RA.11 o UH-RA.14 estaba significativamente asociada con la disminución de los niveles de CRP en el seguimiento ($p < 0,05$). Esto se podía explicar parcialmente por la reactividad preferente contra estos dos clones en los pacientes con AR FR- y/o ACPA-, ya que este fenotipo se asocia con un pronóstico positivo (12). La positividad para UH-RA.21 por otra parte se asocia con niveles de CRP más altos en la toma de muestras ($p < 0,01$).

Se investigó el nivel de reactividad de anticuerpos contra todos los clones individuales en cuanto a su correlación con la duración de la enfermedad, edad, edad de aparición de la enfermedad, niveles de CRP y ESR (tanto en la toma de muestras como en el seguimiento) (correlación de Spearman). Para UH-RA.11, UH-RA.14, UH-RA.15 y UH-RA.17, se demostró una correlación negativa entre los niveles de anticuerpo y la duración de la enfermedad ($r_s = -0,43$, $r_s = -0,34$, $r_s = -0,39$, $r_s = -0,42$, respectivamente). La reactividad contra estos clones por lo tanto está asociada con un curso temprano de la enfermedad.

10. Análisis serológico de los 14 clones asociados a AR y específicos de AR

Los niveles de anticuerpo contra los 14 clones identificados que se midieron por cribado por ELISA de fago en todas las muestras de suero de AR y de control se representan en la figura 4 (UH-RA.9, UH-RA.10, UH-RA.13, UH-RA.14, UH-RA.17, UH-RA.21 y UH-RA.22) y en la figura 5 (UH-RA.1, UH-RA.2, UH-RA.7, UH-RA.11, UH-RA.15, UH-RA.16 y UH-RA.20).

11. Confirmación de la sensibilidad del panel de 14 clones en una cohorte de validación de AR independiente

Para validar adicionalmente el panel de candidatos de 14 clones de los inventores, se analizaron las inmunorreactividades contra el panel de los inventores en otra cohorte de AR independiente que comprendía 44 pacientes con AR. Los resultados obtenidos del cribado por ELISA de fago con 44 sueros adicionales sobre los 14 clones del panel se muestran en la tabla 8. En total, 21 de los 44 pacientes con AR ensayados que daban positivos a la presencia de anticuerpos contra el panel de los inventores, comprendían una sensibilidad del panel en este grupo de pacientes del 48 %. Esto está en línea con la sensibilidad obtenida en la primera población de AR de ensayo. Combinando los resultados de la cohorte de validación de AR con la cohorte del estudio de AR, se alcanzaba una sensibilidad del panel para AR del 53 % (49 de 92 pacientes con AR). También se detectaron anticuerpos contra UH-RA.21 en 11 de 44 pacientes (un 25 %) de este grupo de ensayo de AR, confirmando la relevancia de este sistema antígeno-anticuerpo. Para la mayoría de los clones candidatos, los porcentajes de inmunorreactividad que se obtenían por cribado de la cohorte de validación de AR eran comparables con los de la población del primer estudio. Sin embargo, se discernía una tendencia de mayores niveles de sensibilidad en los pacientes actuales que se utilizaron para los procedimientos de selección por afinidad.

12. Expresión de antígenos candidatos en el tejido sinovial de AR

Para los 3 antígenos candidatos identificados, HLA-A (UH-RA.11), proteína S6 ribosómica (UH-RA.16) y MCM2 (UH-RA.15), se podían obtener anticuerpos monoclonales o policlonales en el mercado. Se llevó a cabo la tinción con estos anticuerpos en tejido sinovial de la rodilla de tres pacientes con AR, que se caracterizaban todos por destrucción articular grave. Como control negativo, se utilizó el tejido sinovial de la rodilla de un paciente con gonartrosis. Para las tres proteínas, se detectó tinción en los tejidos sinoviales de los 3 pacientes con AR, en comparación con la ausencia de tinción detectable en la muestra de control reumático (no mostrado). Esto se correspondía con una expresión elevada de estas proteínas en el tejido de AR inflamado. Para HLA-A y proteína S6 ribosómica, la tinción parecía asociarse con infiltrados inflamatorios, mientras que no se podía observar para MCM2.

Como para el UH-RA.21 no se podían obtener en el mercado ni anticuerpos ni antisuero, se purificaron por inmutofinidad anticuerpos anti-UH-RA.21 humanos a partir de una muestra de suero positivo a AR mediante el uso de perlas revestidas de UH-RA.21. Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica con el antisuero anti-UH-RA.21 policlonal en el tejido sinovial de 3 pacientes con AR y un paciente reumático de control, dando como resultado una tinción positiva en uno de los tejidos sinoviales de AR. En este tejido, se demostró que la tinción estaba localizada predominantemente en los infiltrados inflamatorios y en la capa sinovial con hiperproliferación (no mostrado).

13. Caracterización adicional de UH-RA.21 por cribado por ELISA peptídico

Por aplicación de un procedimiento ELISA de péptido sintético, se cribaron más muestras de suero de pacientes con AR y diferentes grupos de control en cuanto a la inmunorreactividad anti-UH-RA.21. El cribado por ELISA peptídico se llevó a cabo sobre los sueros de 78 pacientes con AR, 48 sujetos de control sanos (HC), 42 sujetos con molestias articulares mecánicas, 49 pacientes con osteoartritis (OA), 26 pacientes con artritis psoriásica y 35 pacientes con espondilitis anquilosante. Se hizo el recuento de la inmunorreactividad de fondo midiendo la inmunorreactividad contra un péptido no relevante. El valor de corte para una señal positiva era de 3 x SD por encima de la media del

grupo combinado de HC y molestias articulares mecánicas, con exclusión de los más extremos. En la figura 7, se representan los resultados del cribado por ELISA peptídico. Dieciocho de 78 pacientes con AR (un 23 %), 6 de 49 pacientes de OA (un 12 %), 5 de 26 pacientes con artritis psoriásica (un 19 %), 5 de 35 pacientes de espondilitis anquilosante (un 14 %), 2 de 48 HC (un 4 %) y 1 de 42 sujetos con molestias articulares mecánicas (un 2 %) eran positivos a anticuerpos contra UH-RA.21. Se demostraron diferencias significativas en la reactividad de anticuerpos contra UH-RA.21 entre los pacientes con AR y el grupo combinado de HC y sujetos con molestias articulares mecánicas por una parte, y entre pacientes con AR y pacientes de OA por otra.

Materiales y métodos

1. Construcción de una biblioteca de fagos de presentación ADNc de AR

Para la construcción de la biblioteca de AR se utilizó tejido sinovial que se obtuvo de la sustitución quirúrgica total de cadera de un paciente varón de 64 años de edad con una historia de 20 años de AR seropositiva. El tejido sinovial se analizó inmunohistoquímicamente por tinción de la presencia de células inflamatorias tales como macrófagos (CD68+), células T (CD3+) y células B (CD20+). Se aisló directamente ARN poliA+ (sistema poliAtract 1000, Promega, Leiden, Holanda) del tejido sinovial sin aislamiento anterior de ARN total como describía el fabricante. Se clonó el ADNc cebado-enlace Oligo (dT) en un sistema de vector λ -Uni-ZAP XR (Stratagene, La Jolla, USA) seguido por empaquetamiento del fago λ . Tras la escisión de la masa del fagémido pBluescript SK(-) del vector Uni-ZAP XR, se obtuvieron las inserciones de ADNc por digestión de restricción por XhoI-XbaI (New England Biolabs, Ipswich, USA). Las inserciones de ADNc (de tamaños de 500-2500 pb) se purificaron en gel (kit de purificación en banda de gel GFX, GE Healthcare, Diegem, Bélgica) y posteriormente se clonaron direccionalmente en los vectores fagémidos pSPVI-A/B/C digeridos con XhoI-XbaI de los inventores, que codificaban cada uno una fase de lectura diferente. La clonación de ADNc se produjo por medio de fusión en el extremo C de la proteína de revestimiento menor del fago pVI, lo que daba como resultado la presentación de los productos codificados por el ADNc en la superficie del fago (21;22). Tras la transformación de las mezclas de unión en bacterias *E. coli* TG1 electrocompetentes (Stratagene), se obtuvieron las bibliotecas de RA-pSPVI-A/B/C de presentación. Se llevó a cabo la secuenciación en cada biblioteca de fagos de presentación.

2. Pacientes con AR y controles

Las muestras de suero se obtuvieron de 48 pacientes con AR, que se diagnosticaron basándose en el cumplimiento de los criterios del ACR. Las características de los pacientes se resumen en la tabla 1.

Se llevó a cabo la determinación de la serología de FR con el ensayo de Aglutinación de partículas Serodia-RA (Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo las mediciones de ACPA con un ensayo ELISA (anti-CCP2) de segunda generación (Quanta Lite CCP IgG, INOVA Diagnostics, San Diego, USA), con un valor de corte de 20 IU para definir un ensayo positivo.

Se utilizaron dos agrupamientos de suero de 10 pacientes con AR para las selecciones por afinidad. Las características de los pacientes que se utilizaron para las selecciones por afinidad se muestran en las tablas 2 y 3. El primer agrupamiento consistía en sueros de pacientes con AR seleccionados aleatoriamente con un curso temprano de la enfermedad (síntomas de menos de 1 año) (tabla 2). En este grupo de pacientes con AR temprana, 4 pacientes eran serológicamente negativos a FR y ACPA (FR- ACPA-), 2 eran positivos para ambos marcadores (FR+ ACPA+), mientras que los restantes 4 eran positivos solo para uno de los dos marcadores (2 pacientes eran FR+ ACPA- y 2 eran FR- ACPA+). El segundo agrupamiento contenía sueros de pacientes con AR FR- ACPA- (tabla 3).

Ambos agrupamientos de sueros, antes de su uso en el SAS, se vaciaron de anticuerpos contra los componentes del fago y bacterias como se había descrito anteriormente (23;24) y posteriormente se almacenaron en alícuotas a -80 °C.

Para llevar a cabo los detallados análisis serológicos de cribado por ELISA de fago de los clones identificados por SAS, se obtuvieron las muestras de suero de 38 controles sanos (HC) y 30 pacientes con otras enfermedades reumáticas (19 con espondilitis anquilosante, 8 con artritis psoriásica y 3 pacientes con síndrome de Sjögren) (Tabla 1). Todos los sueros que se utilizaron en el cribado por ELISA de fago presentaban niveles totales equivalentes de IgG en el suero. Tras la recolección, se hicieron alícuotas de las muestras de suero y se almacenaron a -80 °C.

3. Selección serológica antigénica de una biblioteca de fagos ADNc de presentación de AR

El procedimiento de selección serológica antigénica se aplicó en la biblioteca de fagos ADNc de AR como se había descrito (24;25). Se llevaron a cabo cuatro rondas posteriores de selección por afinidad en paralelo con los agrupamientos de suero de AR temprana y AR FR- ACPA-. Para enriquecer los clones de fago basándose en las interacciones de alta afinidad con inmunoglobulinas (IgG) de pacientes con AR, el procedimiento de selección se llevó a cabo de manera más rigurosa aumentando las rondas de selección.

4. Cribado de clones ADNc enriquecidos

Se llevó a cabo la identificación de clones de ADNc enriquecidos por PCR de colonia seguida por digestión por enzimas de restricción como se había descrito en (24;25), con pequeñas modificaciones. Los cebadores utilizados para la PCR eran un cebador directo (5'-TTA CCC TCT GAC TTT GTT CA-3') y un cebador inverso (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') (Eurogentec, Ougree, Bélgica), que se hibridaban al vector fagémido en cualquier extremo de la inserción de ADNc.

5. Análisis de secuencia

Se llevó a cabo la secuenciación sobre los productos de la PCR purificados (kit de purificación de ADN GFX PCR, GE Healthcare) de clones individuales con el cebador 5'-TTA CCC TCT GAC TTT GTT CA-3' (Eurogentec), que se hibridaba al gen codificante pVI del fagémido, y el Kit II Big Dye TMT Terminator Cycle Sequence Ready Reaction (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), seguido por el análisis en el analizador ABI Prism 310 Genetic (Applied Biosystems). El análisis de búsqueda de homología de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos se llevó a cabo con la herramienta de búsqueda del software de alineamiento local básico del NCBI.

6. ELISA de fago

Se midió por ELISA de fago el nivel de reactividad de anticuerpo de muestras individuales de suero contra clones de fago individuales seleccionados. Se llevó a cabo un ELISA de ligando de fago de presentación como se había descrito anteriormente (23;24). La reactividad de fondo contra las partículas de fago se contaba midiendo la señal del ELISA obtenida incubando la muestra de suero ensayada con fagos vacíos en paralelo a la incubación con el clon de fago de ensayo que codificaba un producto ADNc específico. Una muestra de suero con una relación de DO (fago ensayado): DO (fago vacío) mayor de 3 veces la desviación estándar (SD) por encima de la relación media de DO (fago ensayado): DO (fago vacío) del grupo HC, se consideraba positivo a anticuerpos contra el producto de ADNc codificado. Los experimentos se llevaron a cabo independientemente por duplicado o triplicado. Los resultados se expresaron como la relación media de la DO (fago ensayado):DO (fago vacío).

7. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando el GraphPad Prism versión 4.0. Un valor de $p < 0,05$ se consideraba estadísticamente significativo. Los niveles de reactividad de los anticuerpos que se midieron por las relaciones medias de ELISA de fago en pacientes AR y grupos control se compararon utilizando el ensayo de Kruskal-Wallis. Las variables demográficas cuantitativas para los pacientes positivos a anticuerpos y negativos a anticuerpos se compararon utilizando ensayos-t de student y las variables categóricas se compararon por el ensayo exacto de Fisher. Las asociaciones entre la positividad para los anticuerpos contra clones de ADNc en particular y el diagnóstico de AR, se analizaron por el ensayo exacto de Fisher. Las correlaciones entre los niveles de anticuerpo y las diferentes variables clínicas se examinaron por el coeficiente de correlación de Spearman.

8. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo de acuerdo con el kit pBAD/TOPOThioFusion (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). La proteína recombinante se expresaba como una proteína de fusión con la tiorredoxina en el lado del extremo N y un marcador His6 en el extremo C. La inserción de ADNc que codifica el antígeno candidato se amplificó y los productos de PCR se clonaron en el vector pBAD/TOPOThioFusion seguido por la transformación de las mezclas de unión en bacterias *E. coli* TOP10. Para la expresión proteica, se aislaron los plásmidos y se transformaron en bacterias *E. coli* LMG194. Las bacterias LMG194 que contenían el vector pBAD/TOPO con la inserción, se cultivaron en medio LB (Invitrogen) hasta una DO600 de 0,5 tras lo cual se indujo la expresión de la proteína recombinante durante 4 horas por adición de arabinosa (0,2 %). Tras la centrifugación, las células bacterianas se resuspendieron en tampón de lisis (6M de cloruro de guanidio, 20 mM de fosfato sódico, 500 mM de NaCl, pH 7,8) seguido por sonicación para la destrucción de los cuerpos de inclusión proteicos. La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo en perlas Ni-NTA Sepharose (IBA, Leusden, Holanda) seguida por diálisis contra PBS. La identidad de la proteína se confirmó llevando a cabo una SDS-PAGE seguida por escisión de la banda proteica y análisis ESI-LC-MS/MS (ThermoFinnigan, San Jose, USA). La concentración de proteína purificada se determinó con el kit de cuantificación proteica BCA (Fisher Scientific, Doornik, Bélgica).

9. ELISA peptídico/proteico y ELISA de competición

Se revistieron con los péptidos purificados sintéticos (Eurogentec) a 1 mg/ml en PBS (pH 7,4) placas de ELISA peptídico (placas de ELISA de poliestireno de fondo plano, Greiner Bio-One, Wemmel, Bélgica) durante una noche a temperatura ambiente. Se revistieron con las proteínas recombinantes a 1 mg/ml en tampón de carbonato (0,1 M de carbonato hidrógeno de sodio, pH 9,6) placas de ELISA (Greiner Bio-One) durante una noche a 4 °C. Después de lavar con un 0,05 % de PBS-Tween20 (PBS-T), se llevó a cabo un bloqueo con un 2 % de leche en polvo en PBS (M-PBS) durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado, se incubaron las muestras de suero (diluidas 1/100 en M-PBS) con las placas de ELISA revestidas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado, se llevó a

cabo la detección de la unión de anticuerpos por incubación con anticuerpo HRP de conejo anti-IgG humana (1/1500 en M-PBS) (DAKO, Heverlee, Bélgica) seguido por desarrollo del color con sustrato TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina) (Sigma Aldrich, Bornem, Bélgica). La reacción se paró por adición de 2 M de H₂SO₄ y se leyó el desarrollo del color a 450 nm. Como controles negativos, se utilizaron un péptido no relevante y una proteína tiorredoxina sintetizada de manera idéntica a idénticas concentraciones. Para el ELISA peptídico, una relación de DO (péptido ensayado): DO (péptido no relevante) de más de 1,5 se consideraba una señal positiva. Para el ELISA proteico, una relación de DO (proteína) / DO (tiorredoxina) de más de 1,5 se utilizó como corte para la señal positiva. Las muestras se ensayaron por duplicado en un único experimento, y los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Para confirmar adicionalmente la especificidad de anticuerpos medidos contra los fagos que presentaban los productos de ADNc, se aplicó un ELISA de competición entre el péptido purificado y el fago que presentaba el correspondiente péptido. Antes de la incubación de las muestras de suero diluidas 1/100 con los pocillos revestidos de péptido, las muestras de suero se pre-incubaron con cantidades crecientes de fago que presentaban el péptido en la superficie. La competición del péptido presentado por el fago con el péptido de revestimiento por los anticuerpos del suero daba como resultado la disminución de la DO de las señales. Como control negativo, se pre-incubaron cantidades crecientes de fagos vacíos con las muestras de suero.

10. Análisis inmunohistoquímico del tejido sinovial

Las secciones de tejido fijadas en formalina, embebidas en parafina de tejido de AR y tejido sinovial de control se tiñeron con anti-CD3 (Klinipath, Olen, Bélgica), anti-CD68 (Abcam, Heidelberg, Alemania) y anticuerpo anti-CD20 (Dako), diluidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La tinción de tejido sinovial para los antígenos candidatos diana de AR se llevó a cabo con anticuerpo policlonal anti-HLA-A de conejo (1/1000) (Abnova, Boechout, Bélgica), anticuerpo policlonal anti-mitotina de conejo (Abnova) (1/1000) y un anticuerpo monoclonal anti-proteína S6 ribosómica de ratón (1/50) (Abcam). El antisuero anti-UH-RA.21 purificado por inmuno-afinidad se diluyó 1/50 para las inmunotinciones.

Las secciones embebidas en parafina se montaron en portaobjetos de cristal revestidos de polisina (VWR, Heverlee, Bélgica) y tras quitarles la cera y rehidratarlas, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena por incubación de los portaobjetos en una solución de 0,3 % de peróxido de hidrógeno en metanol durante 10 minutos. Para los anticuerpos obtenidos en el mercado se llevó a cabo la prevención de unión específica por incubación de las secciones con un bloqueador proteico (Dako) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario (en TBS) durante una noche a temperatura ambiente, seguida por incubación con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (anticuerpo policlonal de cerdo anti-Ig de conejo 1/300 en TBS o anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de ratón 1/200 en TBS) (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la aplicación del kit ABC (Dako), se llevó a cabo la tinción con el sustrato DAB (3,3' diaminobencidina) (Sigma Aldrich). Como el uso de un anticuerpo primario humano da lugar a alta unión de fondo, se bloquearon las secciones de tejido sinovial con un anticuerpo secundario no conjugado, a saber un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana (Dako) diluido 1/100 en TBS suplementado con un 10 % de suero de conejo (Chemicon, Heule, Bélgica) durante 1 hora a temperatura ambiente. El suero anti-RA.21 se diluyó 1/50 en TBS y se incubó durante una noche a temperatura ambiente, seguido por 1 hora de incubación a temperatura ambiente con anticuerpo de conejo anti-IgG humana conjugada con HRP (Dako) diluido 1/80 en TBS. La tinción se llevó a cabo con sustrato DAB.

Se utilizaron TBS y el TBS suplementado con un 0,05 % de TritonX-100 para las etapas de lavado. Se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina de Gill (Klinipath). La tinción del control para cada anticuerpo se llevó a cabo omitiendo el anticuerpo primario.

11. Purificación por inmunoafinidad de anticuerpos anti-UH-RA.21 fuera de suero AR

Se acopló el péptido UH-RA.21 sintético a columnas AminoLink de perlas de agarosa (Kit MicroLink Protein Coupling, Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se unieron covalentemente 100 mg de péptido sintético UH-RA.21 a la columna Spin Gel de acoplamiento AminoLink Plus por incubación en tampón de acoplamiento (0,1 M fosfato sódico, 0,15 de NaCl, pH 7,2) con adición de solución de cianobromuro sódico (5 M, en 0,01 M de NaOH) durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de los sitios activos restantes por lavado con tampón de templado (1 M Tris-HCl, 0,05 % de NaN₃, pH 7,4), la columna acoplada a UH-RA.21 se incubó 4 veces con 250 µl de suero de AR que contenía altos niveles de anticuerpo contra UH-RA.21 (de acuerdo con ELISA de fago y ELISA peptídico). Tras lavar la columna con 0,5 M de NaCl, los anticuerpos unidos se eluyeron en tres fracciones con 100 µl de tampón de elución ImmunoPure (pH 2,8). Los eluidos se neutralizaron inmediatamente por adición de 5 µl de 1 M de Tris (pH 9,0). Se evaluaron las eluciones y los flujos continuos en cuanto a niveles de anticuerpos anti-UH-RA.21 por ELISA peptídico. La concentración de anticuerpo eluido se determinó por espectrometría y el kit de cuantificación de proteína BCA.

Tablas

Tabla 1: Características de la población de estudio

Diagnóstico	Número	Género (Femenino/ Masculino)	Edad media (SD) (intervalo) en años
RA	48	33/15	57,0 (11,3) (34-80)
RF- ACPA+	4	3/1	58,5 (9,3) (50-68)
RF- ACPA-	22	18/4	57,1 (12,2) (37-80)
RF+ ACPA+	17	9/8	57,1 (11,8) (34-73)
RF+ ACPA-	5	3/2	54,7 (7,1) (45-63)
Controles reumáticos	30	14/16	45,9 (10,1) (33-65)
Espondilitis anquilosante	19	6/13	42,7 (9,9) (33-63)
Artritis psoriásica	8	5/3	53,5 (8,1) (43-65)
Síndrome de Sjögren	3	3/0	44,7 (4,9) (39-48)
Controles sanos	38	23/15	48,8 (18,4) (24-83)

5

Tabla 2: Características de pacientes con curso de enfermedad temprano (agrupamiento de sueros de AR temprana) utilizados para las selecciones por afinidad

Sujeto	Género ^a	Estado de RF	Estado de ACPA	Edad	Duración enfermedad ^b
RA-p1.1	F	+	+	55	10
RA-p1.2	F	+	-	54	12
RA-p1.3	F	-	+	68	7
RA-p1.4	M	-	-	80	9
RA-p1.5	F	-	+	50	3
RA-p1.6	F	+	-	63	12
RA-p1.7	F	-	-	49	9
RA-p1.8	F	-	-	59	12
RA-p1.9	M	+	+	46	8
RA-p1.10	F	-	-	58	5

^a F (femenino) y M (masculino)
^b en meses después de comenzar los síntomas

Tabla 3: Características de los pacientes RF- ACPA- utilizados para las selecciones por afinidad de agrupamientos de suero RF- ACPA-

10

Sujeto	Género ^a	Estado de RF	Estado de ACPA	Edad	Duración enfermedad ^b
RA-p2.1	M	-	-	41	13
RA-p2.2	F	-	-	52	13
RA-p2.3	F	-	-	57	14
RA-p2.4	F	-	-	69	14
RA-p2.5	M	-	-	37	16
RA-p2.6	F	-	-	73	5
RA-p2.7	F	-	-	65	7
RA-p2.8	F	-	-	68	14
RA-p2.9	F	-	-	66	4
RA-p2.10	F	-	-	37	3

^a F (femenino) y M (masculino)
^b en años

Tabla 4: Procedimiento de Selección Serológica Antigénica para agrupamientos de AR temprana y FR- ACPA-: aumento en los títulos de salida:entrada de fagos con aumento de rondas de selección

Ronda	Relación Salida:Entrada	
	Agrupamiento de AR temprana	Agrupamiento AR RF- ACPA-
1	$3,7 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-8}$
2	$1,1 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-8}$
3	$1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$
4	$3,7 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$

5

Tabla 5: Cribado por ELISA para el panel de 22 clones de fago ADNc candidatos

Clon	AR	Controles reumáticos	Controles sanos
<i>Clones con perfil serológico relacionado con AR</i>			
UH-RA.1	6/48 (13 %)	2/30 (7 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.2	1/48 (2 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.7	1/48 (2 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.9	4/48 (8 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.10	5/48 (10 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.11	6/48 (13 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.13	2/48 (4 %)	3/30 (10 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.14	8/48 (17 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.15	4/48 (8 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.16	3/48 (6 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.17	1/48 (2 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.20	1/48 (2 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.21	15/48 (31 %)	6/30 (20 %)	0/38 (0 %)
UH-RA.22	2/48 (4 %)	0/30 (0 %)	0/38 (0 %)
Total	28/48 (58 %)	10/30 (33 %)	0/38 (0 %)
<i>Clones con perfil serológico no relacionado con AR</i>			
UH-RA.3	3/48 (6 %)	2/30 (7 %)	1/38 (3 %)
UH-RA.4	2/48 (4 %)	0/30 (0 %)	1/38 (3 %)
UH-RA.5	3/48 (6 %)	0/30 (0 %)	4/38 (11 %)
UH-RA.6	5/48 (10 %)	1/30 (3 %)	2/38 (5 %)
UH-RA.8	2/48 (4 %)	4/30 (13 %)	4/38 (11 %)
UH-RA.12	3/48 (6 %)	0/30 (0 %)	3/38 (8 %)
UH-RA.18	6/48 (13 %)	1/30 (3 %)	1/38 (3 %)
UH-RA.19	3/48 (6 %)	5/30 (17 %)	2/38 (5 %)
Total	34/48 (71 %)	15/30 (50 %)	15/38 (39 %)

Tabla 6: Análisis de secuencia de 14 clones ADNc asociados a AR

Clon.0	Identidad del ADNc	Número NCBI	Secuencia codificante	dentro/fuera del marco
UH-RA.1	HLA clase II DQ B1 (B1*050101)	AY663400.1	3'UTR	
UH-RA.2	Asociado a la masa grasa y obesidad en Homo sapiens (FTO)	BC030798.1	3'UTR	
UH-RA.7	Cadena ligera de Miosina 6 (MYL6)	BC017455.1	En secuencia codificante	fuera del marco
UH-RA.9	Talina 1	BC042923.1	5'UTR + secuencia codificante	fuera del marco
UH-RA.10	clon RP11-29H23 del Cromosoma 1	AL353807.18		
UH-RA.11	Proteína A de MHC clase I	BC019236.2	En secuencia codificante	en marco
UH-RA.13	Proteína ribosómica L21	NM_000982.3	En secuencia codificante	fuera del marco

UH-RA.14	Homólogo 24 de clasificación de proteína Vacuolar, más/menos	NM_016079.2		
UH-RA.15	MCM2 deficiente en mantenimiento del microcromosoma 2, mitotina	NM_004526.2	En secuencia codificante	en marco
UH-RA.16	40S Proteína ribosómica S6	BC000524.2	En secuencia codificante	en marco
UH-RA.17	Selenoproteína P, plasma, 1 (SEPP1)	BC058919.1	5'UTR + secuencia codificante	en marco
UH-RA.20	HLA clase II DR beta 1 (HLA-DRB1)	BC024269.1	En secuencia codificante	fuera del marco
UH-RA.21	Dominio 1 que contiene homología adyacente al bromo (BAHD1)	NM_014952.3	3'UTR	
UH-RA.22	Est ADNc de globo ocular humano (similar a la proteína ribosómica L3)	EL949248.1		

Tabla 7: Identidad peptídica de 14 clones ADNc asociados a AR

Clon	Producto de ADNc traducido	Tamaño (en aminoácidos)	Homología a nivel de aminoácidos (número de registro Swissprot)
UH-RA.1	EKRQEITTE* (SEQ ID NO :6)	9 aa	7/9 (77 %) Factor 1 de transcripción específico de células T (P36402) 6/7 (85 %) Proteína 2 del receptor de transferrina (Q9UP52) 6/7 (85 %) Homólogo de proteína 6 de control de la división celular (Q99741)
UH-RA.2	SISTS* (SEQ ID NO:7)	5 aa	Múltiples homologías debidas al tamaño pequeño del producto de ADNc 5/5 (100 %) Miembro 6 de la subfamilia B de homología con DnaJ (Proteína de choque térmico J2) (075190) 5/5 (100 %) Dedicador de proteína 8 de citocinesis (Q8NF50)
UH-RA.7	SSQDV* (SEQ ID NO:8)	5 aa	Múltiples homologías debidas al tamaño pequeño del producto de ADNc 5/5 (100 %) histona acetiltransferasa MYST3 (Q92794) 5/5 (100 %) precursor del factor estimulante de colonias de macrófagos (P09603)
UH-RA.9	RSCHHGCTFTEDQHWECG EDDAV*(SEQ ID NO: 9)	23 aa	9/14 (64 %) Precursor del receptor 2 de manosa de macrófagos (Q9UBG0) 6/9 (66 %) Precursor de glucoproteína CD1d de la superficie de células T (antígeno CD1d) (P15813) 8/13 (61 %) Autoantígeno Nuclear Sp-100 (Moteado de 100 kDa) (P23497)
UH-RA.10	SNALENFVYNKFKQNNCV WPGAVAHACNPSTLRG* (SEQ ID NO:10)	34 aa	15/16 (93 %) Placofilina-2 (Q99959)
UH-RA.11	SSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVI TGAWAAVMWRKSSD RKGGSYSQAASSDSAQGS DVSLTACKV* (SEQ ID NO: 2)	65 aa	14/15 (93 %) Subfamilia Alu (P39190) 100 % (65/65) MHC clase I A-2 (P01892) / A-68 (P01891) / A-69 (P10316)
UH-RA.13	QDSCQEN* (SEQ ID NO:11)	7 aa	Múltiples homologías debidas al tamaño pequeño del producto de ADNc 5/6 (83 %) punto de supervisión mitótico serina/treonina-proteína cinasa BUB1 (043683) 6/7 (85 %) Homólogo de proteína 18 asociada a ARN U3 nucleolar pequeño (Q9Y5J1) 6/10 (60 %) Miembro A de la familia 13 del dominio lectina tipo C (Q8IX05)

UH-RA.14	KEELWRQ* (SEQ ID NO:3)	7 aa	Múltiples homologías debidas al tamaño pequeño del producto de ADNc 6/6 (100 %) tricohialina (Q07283) 5/7 (71 %) ADAMTS12 (Desintegrina A y metaloproteínasa con motivos trombospondina 12) (P58397) 6/7 (85 %) Proteína 1 asociada al polo del huso y centrosoma (Q1MSJ5)
UH-RA.15	DTIEVPEKDLVDKARQINI NLSAFYDSELMFNKFS HDLKRKMILQQF* (SEQ ID NO:4)	49 aa	49/49 (100 %) Factor de licencia de replicación de ADN MCM2 (homólogo de proteína 2 de mantenimiento de microcromosoma) (P49736)
UH-RA.16	RLLLSKGHSCYRPRRTGER KRKSVRGCIVDANLSVL N LVIVKKG EKDIPG LTDTTV PRRLGPKRASRIRKLFNL SKEDDVRQYWRKPLNKE GKKPRTKAPKIQLVTPR VLQHKRRRIALKKQRTKKN KEEAAEYAKLLAKRMK EAKEKRQEIQAKRRRLSSL RASTKSESSQK* (SEQ ID NO: 5)	176 aa	176/176 (100 %) 40S proteína ribosómica S6 (Fosfoproteína NP33) (P62753)
UH-RA.17	AKRKEAG PLEVWTPAM WRSLGLALCLLPSGG TESQDQSSLCKQPPAWSIR DQDPMLNSNGSVTW ALLQAS*(SEQ ID NO:12)	76 aa	58/58 (100 %) selenoproteína P, precursor, SEPP1 (P49908)
UH-RA.20	RGLHLPSGAPKDEPSHSG MESTV*(SEQ ID NO:13)	22 aa	12/17 (70 %) Complejo 3 de proteína relacionada con el adaptador (subunidad mu-1) (Q9Y2T2) 11/16 (68 %) Glucoproteína de superficie celular B-CAM (P50895) 10/15 (66 %) Proteína de transcripción 1 inducida por TGFbeta 1 (043294) 8/10 (80 %) Modulador esencial NF-kappa-B (IKKAP1) 6/7 (85 %) Precursor de la cadena alfa-2 del colágeno (VIII) (P25067) 8/12 (66 %) Calpastatina (inhibidor de calpaína) (P20810)
UH-RA.21	PGGFRGEFMLGKDPKPE GKGLGSPYIE* (SEQ ID NO:1)	28 aa	7/7 (100 %) Proteína de armazón de células B con repeticiones de anquirina (Q8NDB2) 7/8 (87 %) Precursor de la cadena beta de IL-27 (Q14213) 8/10 (80 %) Proteína 1 relacionada con La (Q6PKG0)
UH-RA.22	FIGRGDKPTEPGDSWLSKI ESQNFNKAHRTL* (SEQ ID NO:14)	32 aa	10/14 (71 %) Factor 15 de transcripción (proteína bHLH-EC2) (Q12870) 9/19 (47 %) Precursor de proteína 5 que contiene el dominio de fibronectina tipo III y repeticiones ricas en Leucina (Q96NI6) 8/12 (66 %) Proteína Niban (Proteína FAM129A) (Proteína 39 del gen de inhibición del crecimiento celular) (Q9BZQ8)

Tabla 8: Validación adicional del panel de AR por cribado de la cohorte de AR de validación

Clon	Cohorte de AR de estudio	Cohorte de AR de validación	Total
UH-RA.1	6/48 (13 %)	3/44 (7 %)	9/92 (10 %)
UH-RA.2	1/48 (2 %)	1/44 (2 %)	2/92 (2 %)
UH-RA.7	1/48 (2 %)	1/44 (2 %)	2/92 (2 %)
UH-RA.9	4/48 (8 %)	0/44 (0 %)	4/92 (4 %)
UH-RA.10	5/48 (10 %)	0/44 (0 %)	5/92 (5 %)
UH-RA.11	6/48 (13 %)	6/44 (14 %)	12/92 (13 %)

UH-RA.13	2/48 (4 %)	0/44 (0 %)	2/92 (2 %)
UH-RA.14	8/48 (17 %)	3/44 (7 %)	11/92 (12 %)
UH-RA.15	4/48 (8 %)	1/44 (2 %)	5/92 (5 %)
UH-RA.16	3/48 (6 %)	2/44 (5 %)	5/92 (5 %)
UH-RA.17	1/48 (2 %)	0/44 (0 %)	1/92 (1 %)
UH-RA.20	1/48 (2 %)	0/44 (0 %)	1/92 (1 %)
UH-RA.21	15/48 (31 %)	11/44 (25 %)	26/92 (28 %)
UH-RA.22	2/48 (4 %)	0/44 (0 %)	2/92 (2 %)
Total	28/48 (58 %)	21/44 (48 %)	49/92 (53 %)

Referencias

- 5 (1) Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27(2):269-281.
- (2) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31 (3):315-324.
- (3) Mierau R, Genth E. Diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis, with special emphasis on laboratory analysis. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(2):138-143.
- 10 (4) Harrison BJ, Symmons DP, Barrett EM, Silman AJ. The performance of the 1987 ARA classification criteria for rheumatoid arthritis in a population based cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *American Rheumatism Association. J Rheumatol* 1998; 25(12):2324-2330.
- (5) Huizinga TW, Machold KP, Breedveld FC, Lipsky PE, Smolen JS. Criteria for early rheumatoid arthritis: from Bayes' law revisited to new thoughts on pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5):1155-1159.
- 15 (6) Schumacher HR, Pessler F, Chen LX. Diagnosing early rheumatoid arthritis (RA). What are the problems and opportunities? *Clinical and Experimental Rheumatology* 2003; 21(5):S15-S19.
- (7) O'Dell JR. Treating rheumatoid arthritis early: A window of opportunity? *Arthritis and Rheumatism* 2002; 46(2):283-285.
- 20 (8) Bukhari M, Harrison B, Lunt M, Scott DGI, Symmons DPM, Silman AJ. Time to first occurrence of erosions in inflammatory polyarthritis - Results from a prospective community-based study. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44(6):1248-1253.
- (9) Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(7):906-914.
- 25 (10) Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(9):870-874.
- (11) Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(12):1731-1736.
- 30 (12) van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5):R949-R958.
- (13) De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruithof E, Union A, Meheus L et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(12):1587-1593.
- 35 (14) Machold KP, Stamm TA, Nell VP, Pflugbeil S, Aletaha D, Steiner G et al. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology (Oxford)* 2006.
- (15) Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2741-2749.
- 40 (16) Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(7):845-851.
- (17) Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146(11):797-808.
- 45 (18) Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54(1):38-46.
- (19) Irigoyen P, Lee AT, Wener MH, Li W, Kern M, Batliwalla F et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2005; 52(12):3813-3818.
- 50 (20) Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, Schreuder GM, Breedveld FC, Huizinga TW et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(10):3058-3062.
- 55 (21) Hufton SE, Moerkerk PT, Meulemans EV, de Bruine A, Arends JW, Hoogenboom HR. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J Immunol Methods* 1999; 231 (1-2):39-51.

- (22) Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van dB, I, Gansemans YG et al. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology (N Y)* 1995; 13(4):378-382.
- 5 (23) Somers VA, Brandwijk RJ, Joosten B, Moerkerk PT, Arends JW, Menheere P et al. A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *J Immunol* 2002; 169(5):2772-2780.
- (24) Govarts C, Somers K, Hupperts R, Stinissen P, Somers V. Exploring cDNA phage display for autoantibody profiling in the serum of multiple sclerosis patients: optimization of the selection procedure. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109:372-384.
- 10 (25) Somers V, Govarts C, Hellings N, Hupperts R, Stinissen P. Profiling the autoantibody repertoire by serological antigen selection. *J Autoimmun* 2005; 25(3):223-228.
- (26) Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E et al. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 2000; 288(5473):2045-2047.
- 15 (27) Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(6):342-348.
- (28) Tsuruga H, Yabuta N, Hashizume K, Ikeda M, Endo Y, Nojima H. Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(1):118-125.
- (29) Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta* 2004; 340(1-2):1-25.
- 20 (30) Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G, Scherak O, Graninger W et al. Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989; 32(12):1515-1520.
- (31) Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J Autoimmun* 1998; 11 (5):557-561.
- 25 (32) Marnell LL, Searles RP, Savage SM, Jaramillo Y, Sibbitt WL. Anti-class II beta-chain antibodies in the serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 55(2):263-272.
- (33) Livneh A, Renert A, Avishai O, Langevitz P, Gazit E. Lymphocytotoxic antibodies in Israeli patients with rheumatoid arthritis. *Isr J Med Sci* 1997; 33(1):30-35.
- 30 (34) Raybourne RB, Bunning VK, Williams KM. Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of *Shigella* species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. *J Immunol* 1988; 140(10):3489-3495.
- (35) Naji A, Deschaseaux F, Racadot E, Ferrand C, Justrabo E, Guignier F et al. Induction of tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by cell-specific HLA class I antibody: preliminary data. *Transplant Proc* 2005; 37(6):2892-2893.
- 35 (36) Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* 2003; 133(5 Suppl 1):1517S-1520S.
- (37) Yazar M, Sarban S, Kocyigit A, Isikan UE. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res* 2005; 106(2):123-132.
- 40 (38) Canter PH, Wider B, Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(8):1223-1233.
- (39) Pogue-Geile K, Geiser JR, Shu M, Miller C, Wool IG, Meisler AI et al. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* 1991; 11(8):3842-3849.
- 45 (40) Mincheva A, Todorov I, Werner D, Fink TM, Lichter P. The human gene for nuclear protein BM28 (CDCL1), a new member of the early S-phase family of proteins, maps to chromosome band 3q21. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 65(4):276-277.
- (41) Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med* 2006; 6(2):49-52.
- 50 (42) Avrameas S, Ternynck T. The Natural Autoantibodies System - Between Hypotheses and Facts. *Molecular Immunology* 1993; 30(12):1133-1142.
- (43) Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(12):1224-1235.
- 55 (44) Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1352-1360.
- (45) Ng B, Yang F, Huston DP, Yan Y, Yang Y, Xiong Z et al. Increased noncanonical splicing of autoantigen transcripts provides the structural basis for expression of untolerized epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1463-1470.
- 60 (46) Olivieri I, van Tubergen A, Salvarani C, van der LS. Seronegative spondyloarthritides. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002; 16(5):723-739.
- (47) Fitzgerald O, Dougados M. Psoriatic arthritis: one or more diseases? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20(3):435-450.

LISTADO DE SECUENCIAS

65 <110> Universiteit Hasselt

ES 2 584 438 T3

<120> Biomarcadores para artritis reumatoide

<130> VSO/RAM/V280

5 <150> US 61/038,481

<151> 21-03-2008

<160> 30

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Pro Gly Gly Phe Arg Gly Glu Phe Met Leu Gly Lys Pro Asp Pro Lys
1 5 10 15

Pro Glu Gly Lys Gly Leu Gly Ser Pro Tyr Ile Glu
20 25

20

<210> 2

<211> 65

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 2

Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp
20 25 30

Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala
35 40 45

Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys
50 55 60

Val
65

30

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 3

Lys Glu Glu Leu Trp Arg Gln
1 5

40

<210> 4

<211> 49

ES 2 584 438 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5

Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln
1 5 10 15

Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg
20 25 30

Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln
35 40 45

Phe

<210> 5
<211> 176
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 5

ES 2 584 438 T3

Arg Leu Leu Leu Ser Lys Gly His Ser Cys Tyr Arg Pro Arg Arg Thr
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Lys Arg Lys Ser Val Arg Gly Cys Ile Val Asp Ala Asn
 20 25 30

Leu Ser Val Leu Asn Leu Val Ile Val Lys Lys Gly Glu Lys Asp Ile
 35 40 45

Pro Gly Leu Thr Asp Thr Thr Val Pro Arg Arg Leu Gly Pro Lys Arg
 50 55 60

Ala Ser Arg Ile Arg Lys Leu Phe Asn Leu Ser Lys Glu Asp Asp Val
 65 70 75 80

Arg Gln Tyr Val Val Arg Lys Pro Leu Asn Lys Glu Gly Lys Lys Pro
 85 90 95

Arg Thr Lys Ala Pro Lys Ile Gln Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Leu
 100 105 110

Gln His Lys Arg Arg Arg Ile Ala Leu Lys Lys Gln Arg Thr Lys Lys
 115 120 125

Asn Lys Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Ala Lys Leu Leu Ala Lys Arg Met
 130 135 140

Lys Glu Ala Lys Glu Lys Arg Gln Glu Gln Ile Ala Lys Arg Arg Arg
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Leu Arg Ala Ser Thr Ser Lys Ser Glu Ser Ser Gln Lys
 165 170 175

5 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

10 Glu Lys Arg Gln Glu Ile Thr Thr Glu
 1 5

15 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

20 Ser Ile Ser Thr Ser
 1 5

ES 2 584 438 T3

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 8

 Ser Ser Gln Asp Val
 1 5

 10
 <210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 9

 Arg Ser Cys His His Gly Cys Thr Phe Thr Glu Asp Gln His Trp Glu
 1 5 10 15

 Cys Gly Glu Asp Asp Ala Val
 20

 20
 <210> 10
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 10

 Ser Asn Ala Leu Glu Asn Phe Val Tyr Asn Lys Phe Gln Gln Asn Asn
 1 5 10 15

 Cys Val Trp Pro Gly Ala Val Ala His Ala Cys Asn Pro Ser Thr Leu
 20 25 30

 Arg Gly

 30
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

 Gln Asp Ser Cys Gln Glu Asn
 1 5

 35

 <210> 12
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 12

ES 2 584 438 T3

Ala Lys Arg Lys Glu Ala Gly Pro Leu Glu Val Val Val Thr Thr Pro
1 5 10 15

Ala Met Trp Arg Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Cys Leu Leu Pro
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro
35 40 45

Pro Ala Trp Ser Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly
50 55 60

Ser Val Thr Val Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser
65 70 75

5 <210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

10 Ser Gly Met Glu Ser Thr Val
20

15 <210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Phe Ile Gly Arg Gly Asp Lys Pro Thr Glu Pro Gly Asp Ser Trp Leu
1 5 10 15

20 Ser Lys Ile Glu Ser Gln Phe Asn Phe Lys Phe Ala His Arg Thr Leu
20 25 30

25 <210> 15
<211> 562
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

ES 2 584 438 T3

gcctggaggc ttcagaggtg aatztatgct tgggaagcct gatcccaaac ctgaagggaa 60
 gggacttgga tctccttata ttgaataagc tgtttggagg aaggtgtctg tctgggagga 120
 tggggcagta aatgaggttg gcagagtggc agtgggggct ctgcagagcc agccttgag 180
 cctgctcatt ctgggccctt gctgccaagg agcccagcct cacctagcag gaaaggagat 240
 gaaggccctc ctcccaggag gtagggcttt ggctgccccg aacttaaagc cttttgaaat 300
 ctcttagatg tggaaatatt ttttcgaacc tgaaaatgca gctggtagaa tttcaatgga 360
 agcataatcc atgtaaaata ttttttagtt gatattttgt aaaatgcaact ttttgtgtgt 420
 gttgatcctg gtttcccaga tctgtatttc agtgtttaca agggaggaag gacctttcct 480
 cacctccctt ttgacagaga ttagaagtac ttctttaaga aaaaaataaa tttgagaaat 540
 tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 562

5 <210> 16
 <211> 622
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

gtcttcccag cccaccatcc ccctcgtggg catcattgct ggcttggttc tctttggagc 60
 tgtgatcact ggagctgtgg tcgctgctgt gatgtggagg aggaagagct cagatagaaa 120
 aggagggagc tactctcagg ctgcaagcag tgacagtgcc cagggtctctg atgtgtctct 180
 cacagcttgt aaagtgtgag acagctgcct tgtgtgggac tgagaggcaa gagttgttcc 240
 tgccttccc tttgtgactt gaagaacct gactttgttt ctgcaaaggc acctgcatgt 300

 gtctgtgttc gtgtaggcat aatgtgagga ggtggggaga ccaccccacc cccatgtcca 360
 ccatgacct ctteccaagc tgacctgtgc tccctccca atcatcttct ctgttccaga 420
 gaggtggggc tgaggtgtct ccctctctgt ctcaacttca tgggtgactg agctgtaact 480
 tcttcttcc ctattaaaat tagaacctga gtataaattt actttctcaa attcttgcca 540
 tgagaggttg atgagttaat taaaggagaa gattcctaaa atttgagaga caaaataaat 600
 10 ggaacacatg agaaaaaaaa aa 622

15 <210> 17
 <211> 1172
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 584 438 T3

aaggaagaac tatggcgaca gtaaaaagtg gttgccaaag aaagatcatg tcctttgcag 60
 gaacatggat ggggctggag gccattatcc ttaacaaact aacataggaa caggaaacca 120
 aatattccat gttctcacia gtgggagtga aataacatgg acacaaagga ataacatact 180
 ggggcctacc tgagggtgga ggggtggaaa agggacagga ccagaaaagt aactattggg 240
 tactaggctt ccctacgtgc cgaattcggc acgtaggcct cgtgccgaat tcggcacgag 300
 gctttattaa ggggtgacta gtaataaaat ataatattct tgctgcttat gcagctgaca 360
 ttgttgccct ccctaaagca accaagtage ctttatttcc cacagtgaaa gaaaacgctg 420
 gcctatcagt tacattacia aaggcagatt tcaagaggat tgagtaagta gttggatggc 480
 tttcataaaa acaagaattc aagaagagga ttcattgcttt aagaaacatt tgttatacat 540
 tcctcacaaa ttatacctgg gataaaaact atgtagcagg cagtgtgttt tccttccatg 600
 tctctctgca ctacctgcag tgtgtcctct gaggctgcaa gtctgtccta tctgaattcc 660
 cagcagaagc actaagaagc tccaacctat cacctagcag ataaacctat ggggaaaact 720
 taaatctgtg catacatttc tggatgcatt tacttatctt taaaaaaaaa ggaatcctat 780
 gacctgattt ggccacaaaa ataatcttgc tgtacaatac aatctcttgg aaattaagag 840
 atcctatgga tttgatgact ggtattagag gtgacaatgt aaccgattaa caacagacag 900
 caataacttc gttttagaaa cattcaagca atagctttat agcttcaaca tatggtagct 960
 tttaaccttg aaagttttgc aatgatgaaa gcagtatttg tacaaatgaa aagcagaatt 1020
 ctcttttata tggtttatac tgttgatcag aaatgttgat tgtgcattga gtattaaaaa 1080
 attagatgta tattattcat tgttctttac tcatgagtac cttataataa taataatgta 1140
 ttctttgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1172

<210> 18
 <211> 826
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

5

ES 2 584 438 T3

ggacactatt gaggtccctg agaaggactt ggtggataag gctcgtcaga tcaacatcca 60
 caacctctct gcattttatg acagtgagct cttcaggatg aacaagttca gccacgacct 120
 gaaaaggaaa atgatcctgc agcagttctg aggccctatg ccatccataa ggattccttg 180
 ggattctggt ttggggtggt cagtgccttc tgtgctttat ggacacaaaa ccagagcact 240
 tgatgaactc ggggtactag ggtcagggct tatagcagga tgtctggctg cacctggcat 300
 gactgtttgt ttctccaagc ctgctttgtg cttctcactt ttgggtggga tgccttgcca 360
 gtgtgtctta cttggttget gaacatcttg ccacctccga gtgctttgtc tccactcagt 420
 accttggatc agagctgctg agttcaggat gcctgcgtgt ggttttaggtg ttagccttct 480
 tacatggatg tcaggagagc tgctgccttc ttggcgtgag ttgcgtattc aggetgcttt 540
 tgetgccttt gccagagag ctggttgaag atgtttgtaa tcgttttcag tctcctgcag 600
 gtttctgtgc cctgtgggtg gaagagggca cgacagtgc agcgcagcgt tctgggctcc 660
 tcagtcgcag ggttgggatg tgagtcatgc ggattatcca ctgccacag ttatcagctg 720
 ccattgctcc ctgtctgttt cccactctc ttatttgtgc attcggtttg gtttctgtag 780
 ttttaatttt taataaagtt gaataaata taaaaaaaa aaaaaa 826

<210> 19
 <211> 588
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

ccgcctgcta ctgagtaagg ggcattcctg ttacagacca aggagaactg gagaaagaaa 60
 gagaaaatca gttcgtgggt gcattgtgga tgcaaactctg agcgtttctca acttggttat 120
 tgtaaaaaaa ggagagaagg atattcctgg actgactgat actacagtgc ctgccgcct 180
 gggcccaaaa agagctagca gaatccgcaa acttttcaat ctctctaaag aagatgatgt 240
 ccgccagtat gttgtaagaa agcccttaa taaagaaggt aagaaacctg ggaccaaagc 300
 acccaagatt cagcgtcttg ttactccacg tgtcctgcag cacaaaacggc ggcgtattgc 360
 tctgaagaag cagcgtacca agaaaaataa agaagaggct gcagaatatg ctaaactttt 420
 ggccaagaga atgaaggagg ctaaggagaa gcgccaggaa caaattgcga agagacgcag 480
 actttcctct ctgcgagctt ctacttctaa gtctgaatcc agtcagaaat aagatttttt 540
 gagtaacaaa taataaagat cagactctga aaaaaaaaa aaaaaaa 588

10

<210> 20
 <211> 409
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 20

ES 2 584 438 T3

gagaagaggc aagaaatcac tacagaatga aggaacatcc cttgaggtga cccagccaac 60
 ctgtggccag aaggagggtt gtacctgaa aagacactga aagcattttg gtgtgtgaag 120
 taaggggtggg cagaggaggt agaaaatcaa ttcaattgtc gcatcattca tggtttetta 180
 atattgatgc tcagtgcatt ggccottagaa tatcccagcc tctettctgg tttgctgagt 240
 getgtgtaag taagcatggt ggaattgttt ggggacatat atagtgatcc ttggtcactg 300
 gtgtttcaac attctggaaa gtcacatoga tcaagaatat tttttatfff taagaaagca 360
 taaccagcaa taaaaatact atfffftgggt ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 409

5 <210> 21
 <211> 455
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

ctcgatctca acctcgtgat ccaccacct cggctctcca aagecgtggg attacaggcg 60
 tgagccaccg cgccaagcca aggtctgcat tttcttttag aactcagaac acccaatagt 120
 cctagggccc catcctcgca tggcagcaag ctaaataagc atcttcccac tgcgagttgg 180
 ggcattgacc agcctatggt ttgccatact cctctttttt ctccgttttt tcattaattg 240
 tgaacctgac ctgcateacc ctttcatgtc agtgcctctcc aaacctgctt gcttgcaccc 300
 ctctagtoga aatattttgt gcttacccca atatatgtgt gtgactattg aactctatcc 360
 gtgactgct tgtactaatg tcatttgcac cataaaatat tcatatccaa taaacatatt 420
 10 aaaaggatga gataagaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 455

15 <210> 22
 <211> 693
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

ES 2 584 438 T3

gagcagtcaa gatgtgtgac ttcaccgaag accagaccgc agagttaag gaggccttcc 60
 agctgtttga ccgaacaggt gatggcaaga tctgttacag ccagtgtggg gatgtgatga 120
 gggccctggg ccagaaccct accaacgccg aggtgctcaa ggtcctgggg aaccccaaga 180
 gtgatgagat gaatgtgaag gtgctggact ttgagcactt tctgcccatt ctgcagacag 240
 tggccaagaa caaggaccag ggcacctatg aggattatgt cgaaggactt cgggtgtttg 300
 acaaggaagg aatggcacc gtcattgggtg ctgaaatccg gcatgttctt gtcacactgg 360
 gtgagaagat gacagaggaa gaagtagaga tgctgggtggc agggcatgag gacagcaatg 420
 gttgtatcaa ctatgaagcg tttgtgaggc atatcctgtc ggggtgacgg gcccatgggg 480
 cggagctcgt ccgcatgggtg ctgaatggct gaggaccttc ccagtctccc cagagtcctg 540
 gcctttccct gtgtgaattt tgtatctagc ctaaagtttc cctaggcttt cttgtctcag 600
 caacttccc atcttgtctc tcttgatga tgtttgccc cagcattcac caaataaact 660
 tgctctctgg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 693

5 <210> 23
 <211> 533
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

aagaagctgc caccatgggt gcactttcac tgaagatcag cattgggaat gtgggtgaaga 60
 cgatgcagtt tgagccgtct accatgggtg acgacgcctg ccgcatcatt cgtgagcggg 120
 tcccagaggg cccagctggg cctcccagcg actttgggct ctttctgtca gatgatgacc 180
 ccaaaaaggg tatatggctg gaggctggga aagctttgga ctactacatg ctccgaaatg 240
 gggacactat ggagtacagg aagaaacaga gaccctgaa gatccgtatg ctggatggaa 300
 ctgtgaagac gatcatgggt gatgacteta agactgtcac tgacatgctc atgaccatct 360
 gtgcccgcct tggcatcacc aatcatgatg aatattcatt agctctcttc accgtttttt 420
 gatactatct tccccaccc ccagctacc ataggggctg cagagttata agccccaaac 480
 10 aggtcatgct ccaataaaaa tgattctacc tacaataaaa aaaaaaaaaa aaa 533

15 <210> 24
 <211> 1120
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

ES 2 584 438 T3

gtcaaatgct ctggagaact ttgtctataa caagtttcag tagaataact gtgtttgccc 60
 gggcgccgtg gctcaocgctt gtaatcccag cactttgaga ggggtgaggcg ggaggatcac 120
 ctgaggtagg agttcgagac cagcatagcc aacatgggga aaccccgctc ctactaaaaa 180
 tacaaaatta gccggcgctg gtggcacgcg ctggtaatcc caactactcc agaggctgaa 240
 gcaggagaat ccgttcaacc cgggaggtgg aggttgccgtt gagccgaaat tgtgctgctg 300
 cactgaagcc tggacaacaa agtgagacta cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagg 360
 ccgggcgctg tggctcaocg ctgtaatccc agcactttgg gaggcgaggc cgggtggatc 420
 acgaggtcag gagatcgaga ccatcctggc taacacgggtg aaaccccgtc tctactgaaa 480
 atacaaaaaa attagccggg cgtgggtggcg ggcgcctata gtcccagcta cttgggaggc 540
 tgaggcagga gaatggcgctg aacccgggag gcggagcttg cagtgagccg agatcgccgc 600
 actgcactcc agcctgggcg acagagcgag actccgtctc agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aggaataact gtgcttgaga atttaccatg ggataggata attaataattt ttccataaca 720
 cataactaag attgactgta atttttatta actttatttc tctagttgaa ttaatgataa 780
 ttctccttta atgaagtatc gaaaataaca actagttgcc aggtgggcgc ggtggctcac 840
 acctgtaatc ccagcacttt gggaggccga ggtgggtgga tcaactgagg ccaggagttc 900
 gagaccagcc tggccaaaat ggtgaaaccc cgtctctact aaaaaaata caaacattag 960
 ccaggcgctg tgcagggcgc ctgtaatctc agctactcgg gaggetgtgg caggagaatc 1020
 gctttagcct gggaggcgga ggttgcaagt agccgtgact gagccactgc actccagcct 1080
 ggcaacagag tgagactgtg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 1120

5 <210> 25
 <211> 291
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

caagattctt gccaaagagaa ttaatgtgcg tattgagcac attaagcact ctaagagccg 60
 agatagcttc ctgaaacgtg tgaaggaaaa tgatcagaaa aagaaagaag ccaaagagaa 120
 aggtacctgg gttcaactaa agcgcacagcc tgctccacce agagaagcac actttgtgag 180
 aaccaatggg aaggagcctg agctgctgga acctattccc tatgaattca tggcataata 240
 ggtgttaaaa aaaaaaataa aggacctctg ggctacaaaa aaaaaaaaaa a 291

10
 15 <210> 26
 <211> 573
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 584 438 T3

caaagagaaa ggaagcaggc ccgttggaag tggttgtgac aaccccagca atgtggagaa 60
gectggggct tgccctgget ctctgtctcc tcccatcggg aggaacagag agccaggacc 120
aaagctcctt atgtaagcaa cccccagcct ggagcataag agatcaagat ccaatgctaa 180
actccaatgg ttcagtgact gtggttgctc ttcttcaagc cagctgatac ctgtgcatac 240
tgcaggcacc taaattagaa gacctgcgag taaaactgaa gaaagaagga tattctaata 300
tttcttatat tgttgtaaat catcaaggaa tctcttctcg attaaaatac acacatctta 360
agaataaggt ttcagagcat attcctgttt atcaacaaga agaaaaccaa acagatgtct 420
ggactctttt aaatggaagc aaagatgact tctcatata tgatagatgt ggccgtcttg 480
tatatcatct tggtttgctt ttttcttcc taactttccc atatgtagaa gaagccatta 540
agattgotta ctgtgaaaaa aaaaaaaaaa aaa 573

5 <210> 27
<211> 544
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 27

gagaggttta cacctgccaa gtggagcacc caagcctgac gagccctctc acagtggaat 60
ggagagcacg gtctgaatct gcacagagca agatgctgag tggagtcggg ggcttcgtgc 120
tgggcctgct ctctcttggg gccgggctgt tcatctactt caggaatcag aaaggacact 180
ctggacttca gccaacagga ttcttgagct gaagtgaaga tgaccacatt caaggaagaa 240
ccttctgccc cagctttgca ggatgaaaca ctccccgct tggctctcat tcttccacaa 300
gagagacctt tctcggacc tggttgctac tggttcagca gctctgcaga aaatgtctc 360
ccttggtgct gcctcagctc gtacctttgg cctgaagtc cagcattaat ggcagccct 420
catcttccaa gttttgtget cccctttacc taatgettcc tgcttccat gcctctgtac 480
tctgtctgtg ccacaaacac attacattat taaatgttcc tcaaacaaaa aaaaaaaaaa 540
aaaa 544

10
15 <210> 28
<211> 500
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 28

ES 2 584 438 T3

atttataggt agagggcaca aacctaccga gcctgggtgat agctgggtgt ccaagataga 60
 atcttagttc aactttaaat ttgcccacag aaccctctaa atccccttgt aaatttaact 120
 gttagtccaa agaggaacag ctctttggac actaggaaaa aaccttgtag agagagtaaa 180
 aaatttaaca cccatagtag gcctaaaagc agccaccaat taagaaagcg ttcaagctca 240
 acacccacta cctaaaaaat cccaaacata taactgaact cctcacacc aattggacca 300
 atctatcacc ctatagaaga actaatgtta gtataagtaa catgaaaaca ttctcctcgg 360
 cataagcctg cgtcagatta aaacaactgaa ctgacaatta acagcccaat atctacaatc 420
 aaccaacaag tcattattac cctcactgtc aaccaaacac aggcattgctc ataaggaaag 480
 gttaaaaaaa aaaaaaaaaa 500

5 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 29
 ttaccctctg actttgtca 20

15 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 30
 cgccagggtt ttccagtcg cgac 24

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene SEQ ID NO: 1.
3. Una composición que comprende el polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2 y al menos un polipéptido adicional que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos de una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 2-14.
- 10 4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho péptido adicional comprende una secuencia que se selecciona de entre SEQ ID NO: 2-14.
- 15 5. El polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en donde dicho polipéptido está unido a una superficie o a una fase sólida.
- 20 6. El polipéptido o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichas superficie o fase sólida se seleccionan de entre el grupo que consiste en una placa de microtitulación, una membrana de nilón, una perla de cristal, una perla de plástico, un soporte de celulosa, un soporte de sílice y un soporte de agarosa.
- 25 7. El polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 para su uso como diagnóstico.
8. El uso *in vitro* de un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4 para detectar la presencia y/o la cantidad de anticuerpos específicos contra el polipéptido o contra al menos un polipéptido de dicha composición en un fluido corporal de un mamífero.
- 30 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho mamífero es un ser humano.
- 30 10. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 en donde dicho fluido corporal es plasma sanguíneo, suero sanguíneo o líquido sinovial.
- 35 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que dicha detección: (a) es mediante procesos inmunoenzimáticos que comprenden ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), técnicas inmunofluorescentes, ensayos radioinmunológicos (RIA), inmunotransferencia o transferencia LINE; o (b) comprende la detección visual, espectrofotométrica, electroquímica, fluorescente o luminométrica.
- 40 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en el que la detección y/o la cantidad de al menos un anticuerpo específico es indicativa de artritis reumatoide.
- 45 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en el que la detección y/o la cantidad de al menos un anticuerpo específico es indicativa de artritis reumatoide en un paciente con un estadio de enfermedad de menos de 1 año.
- 50 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en el que la detección y/o la cantidad de al menos un anticuerpo específico es indicativa de artritis reumatoide en un paciente cuyo fluido corporal es seronegativo para el factor reumatoide y/o anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos.
- 50 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 que comprende además la detección del factor reumatoide.
- 55 16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 que comprende además la detección de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos.
- 60 17. Un método para evaluar el pronóstico y/o la gravedad de la enfermedad de artritis reumatoide en un paciente, que comprende i) detectar la presencia de al menos un anticuerpo en un fluido corporal derivado de dicho paciente en donde dicho anticuerpo tiene una especificidad por el polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2 y en donde ii) la presencia de dicho anticuerpo indica que dicho paciente tiene niveles de inflamación más altos en el momento de la toma de muestras y es predictiva de mayor inflamación en el seguimiento.
- 60 18. Un kit de diagnóstico para la detección de artritis reumatoide que comprende un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4.
- 65 19. El kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende además un anticuerpo que se une específicamente a una inmunoglobulina humana.

Figura 1

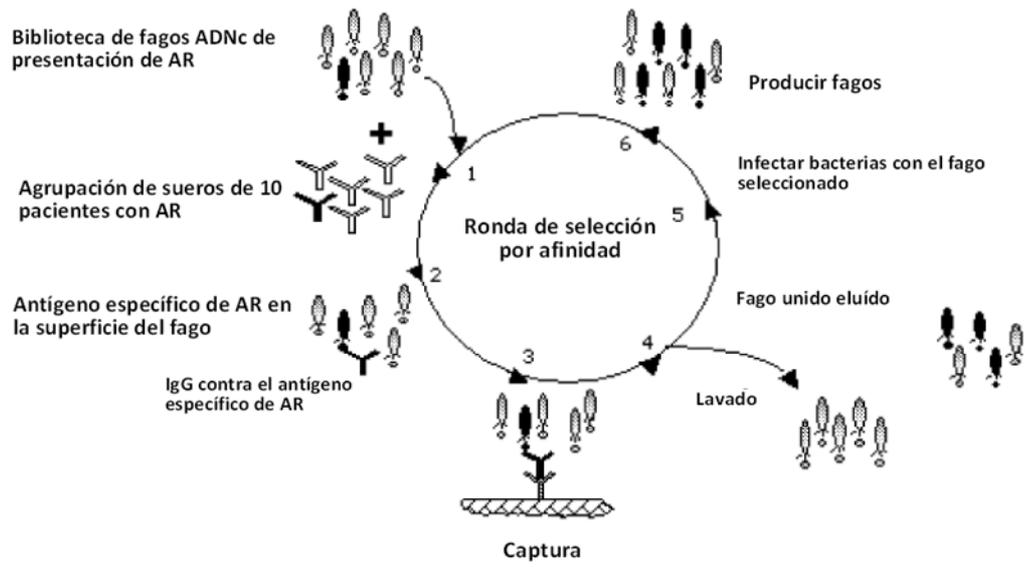
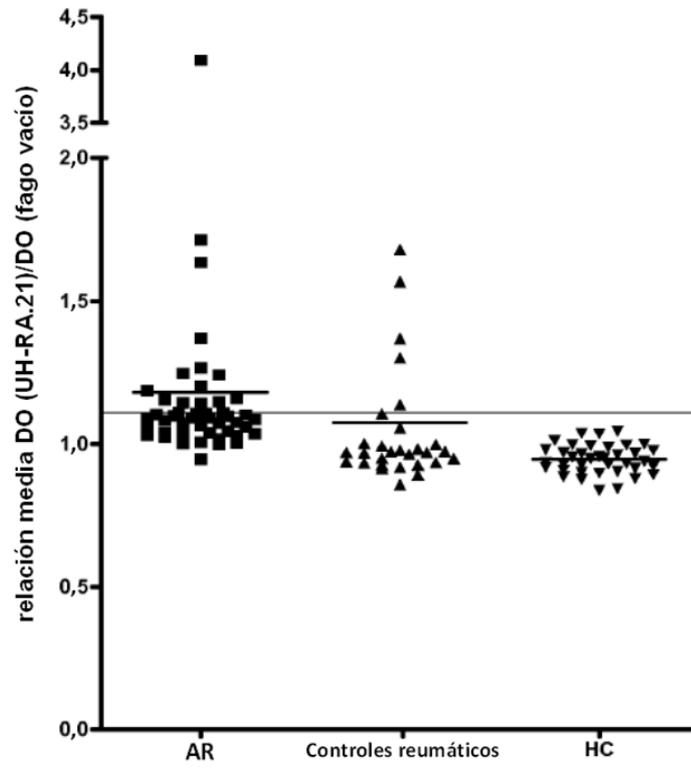


Figura 2

a



b

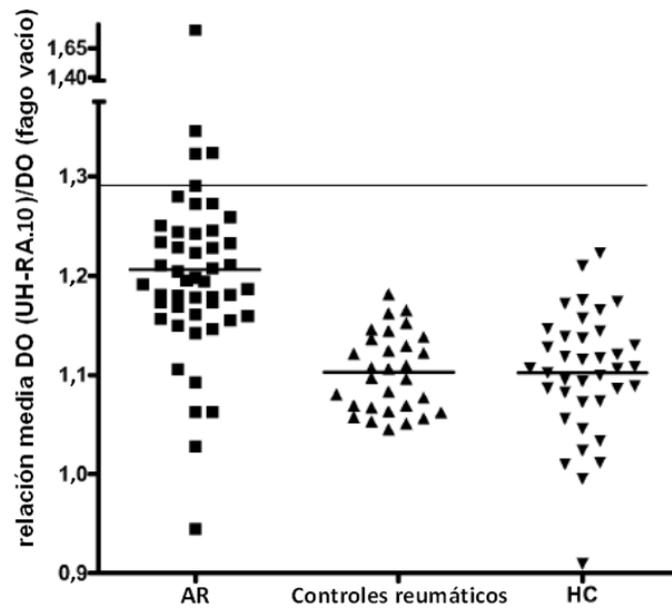


Figura 3

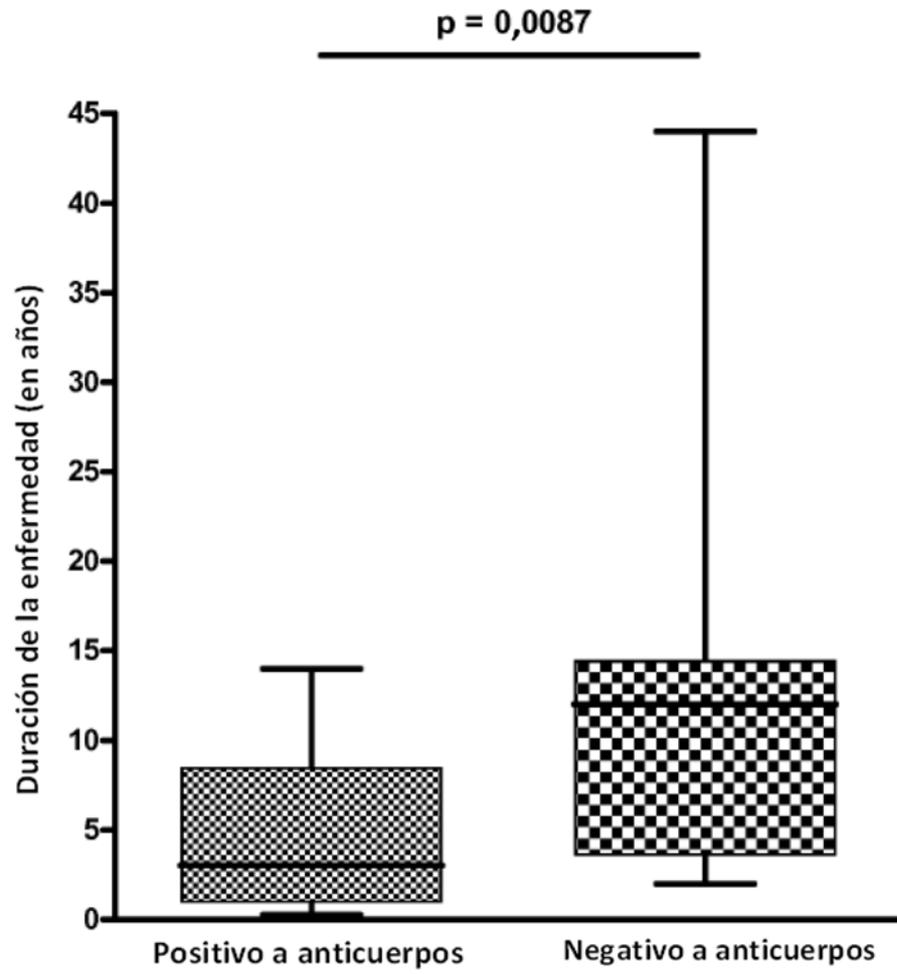
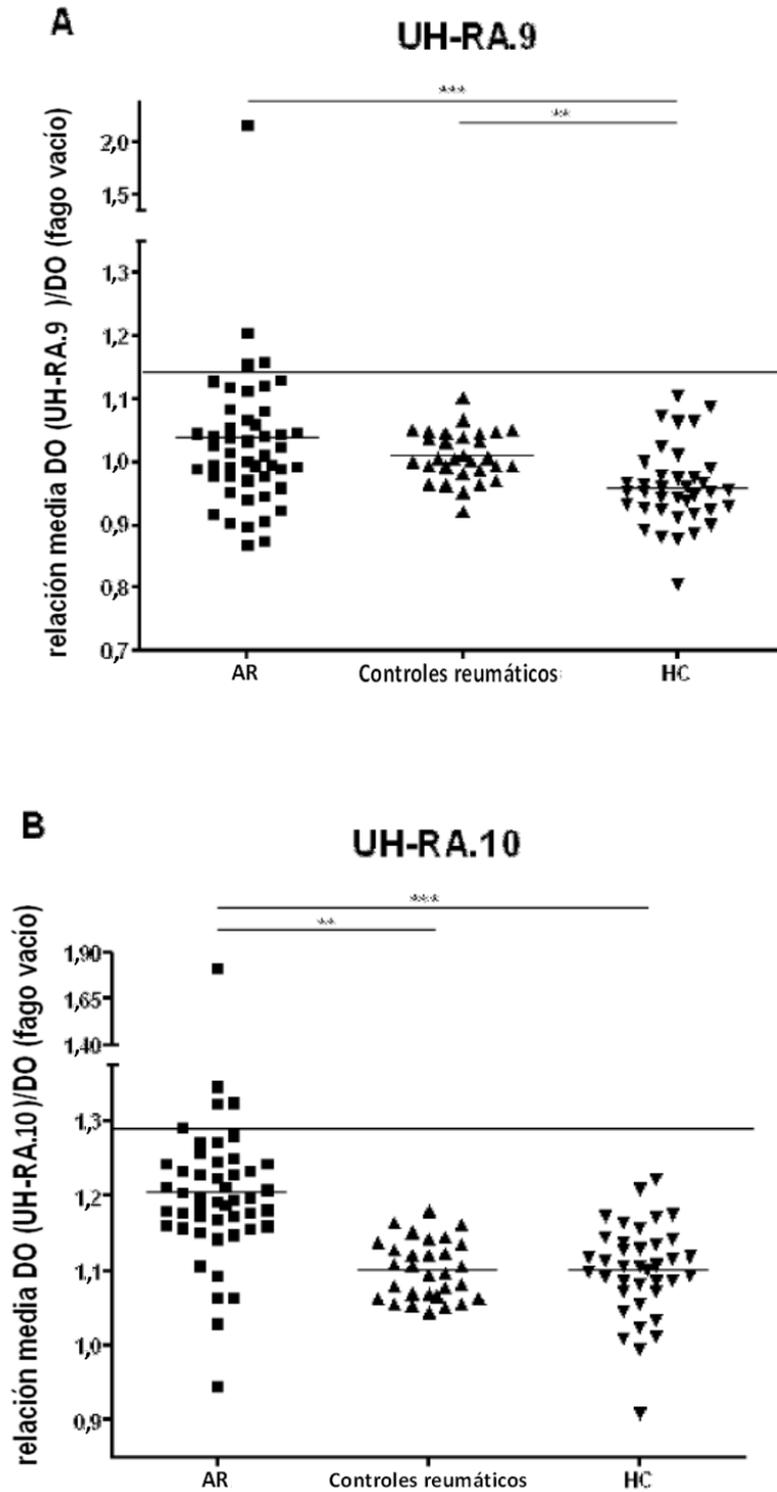
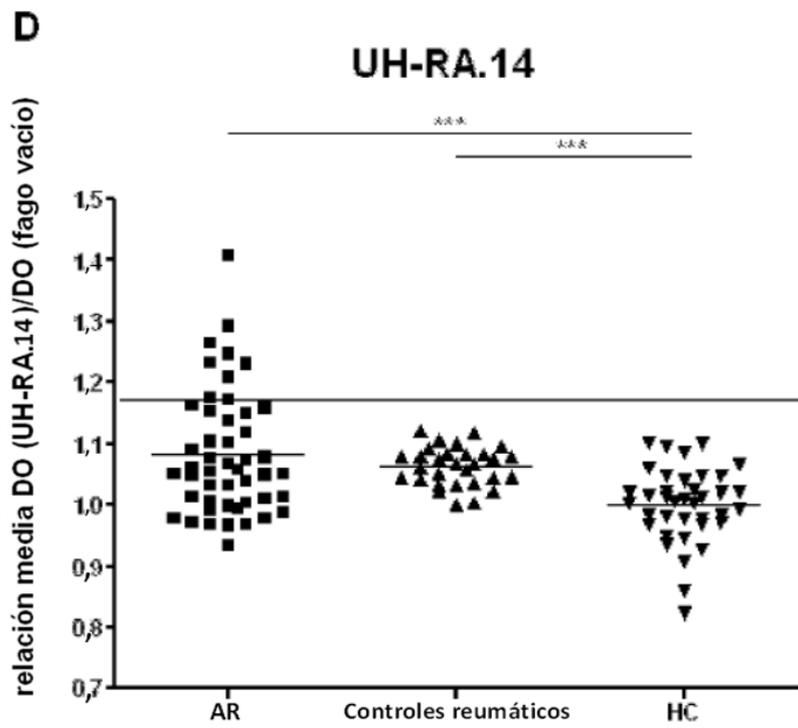
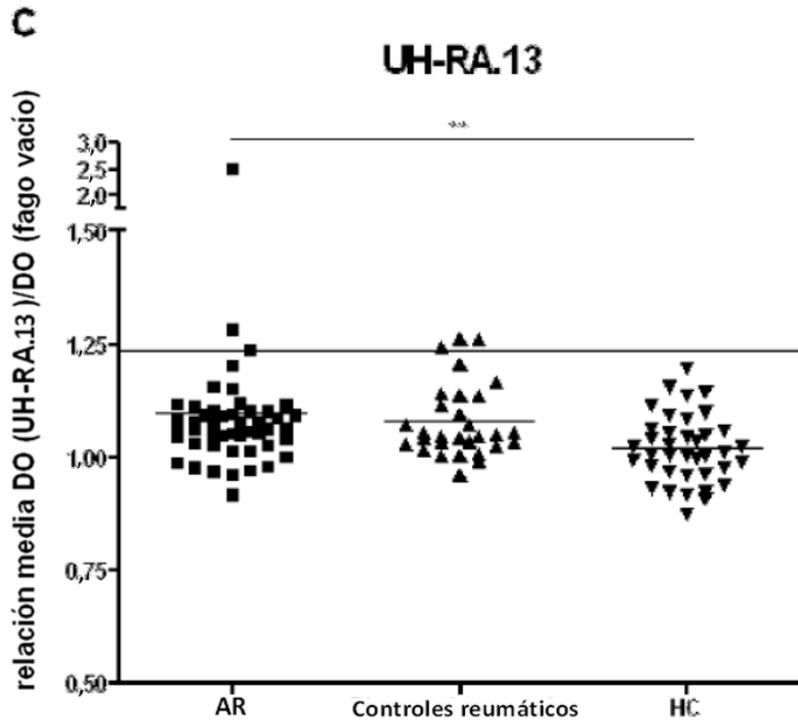
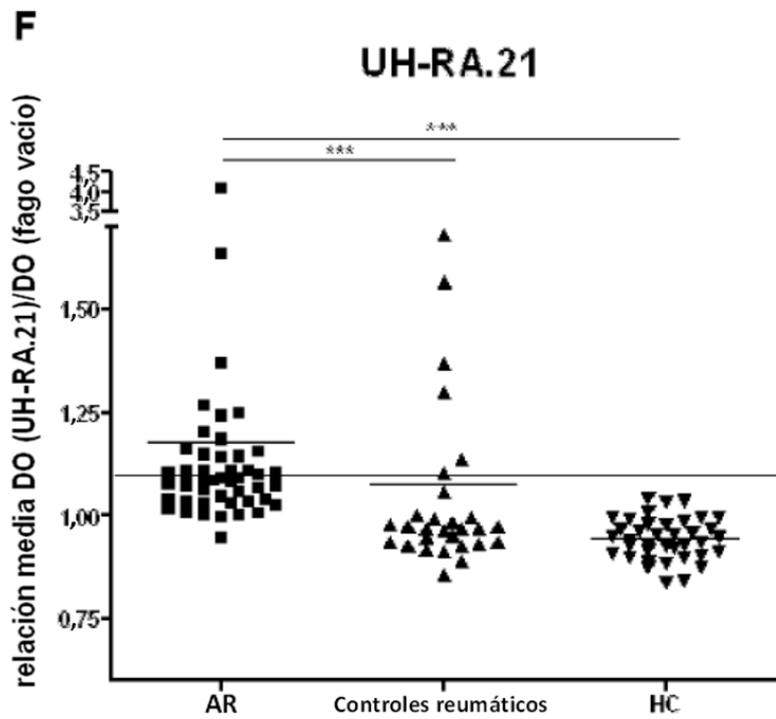
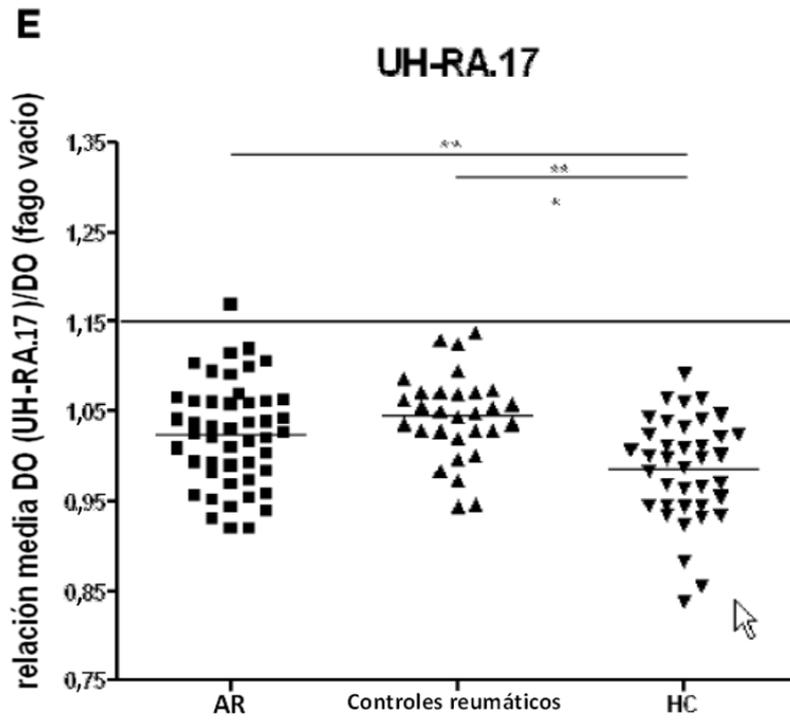


Figura 4







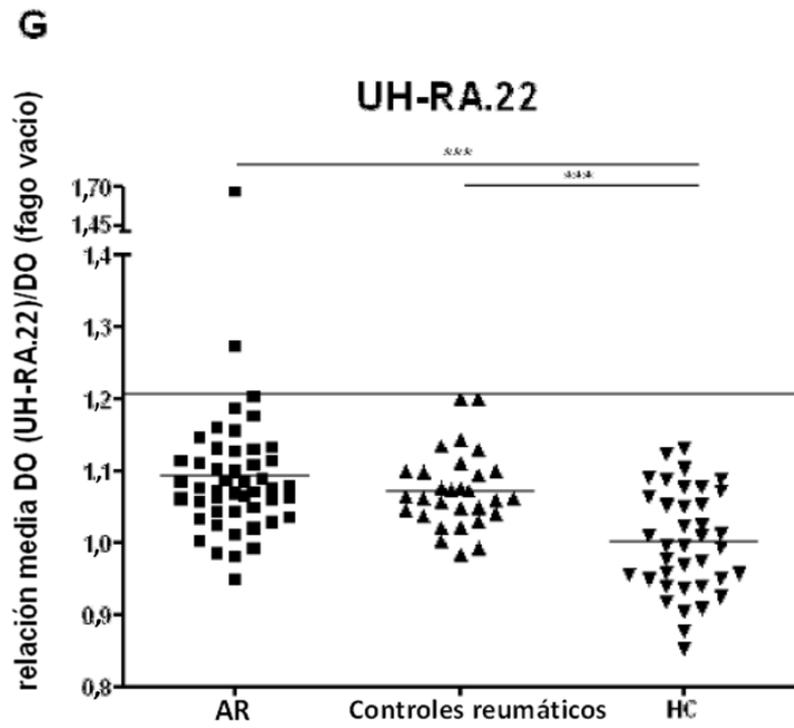
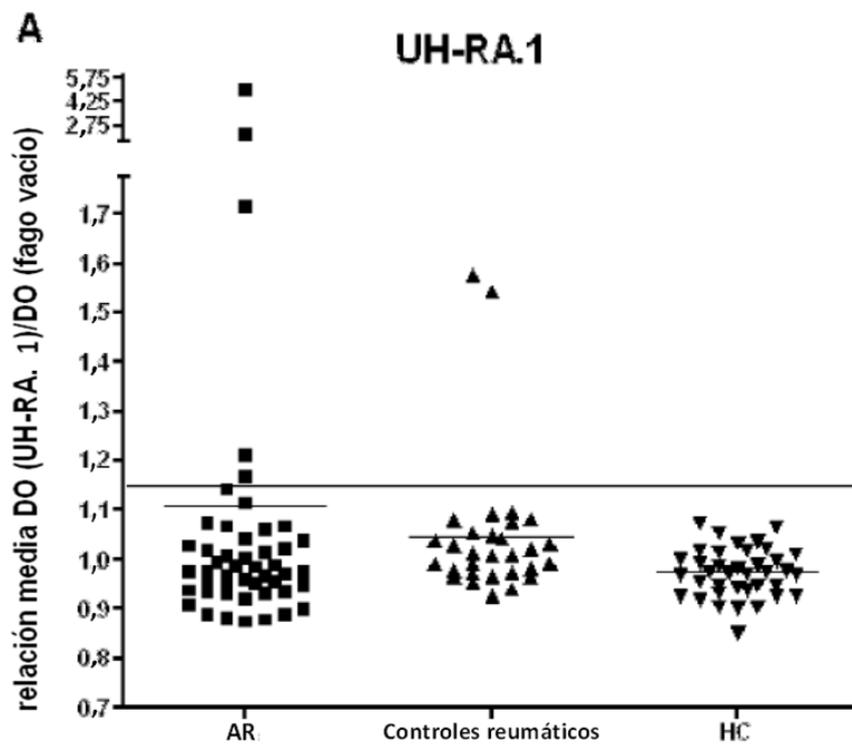
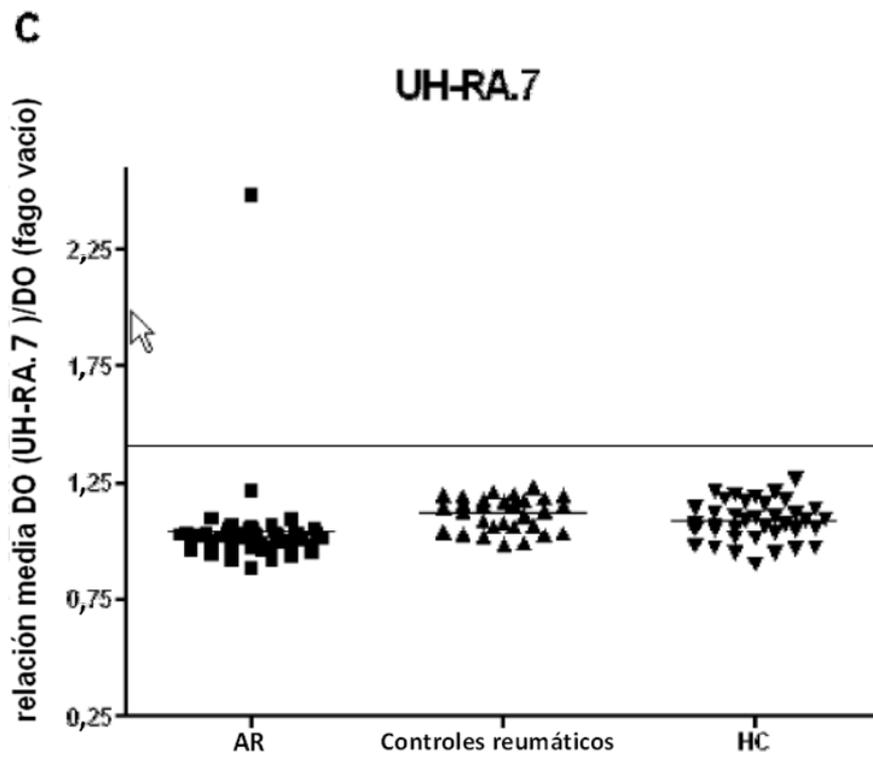
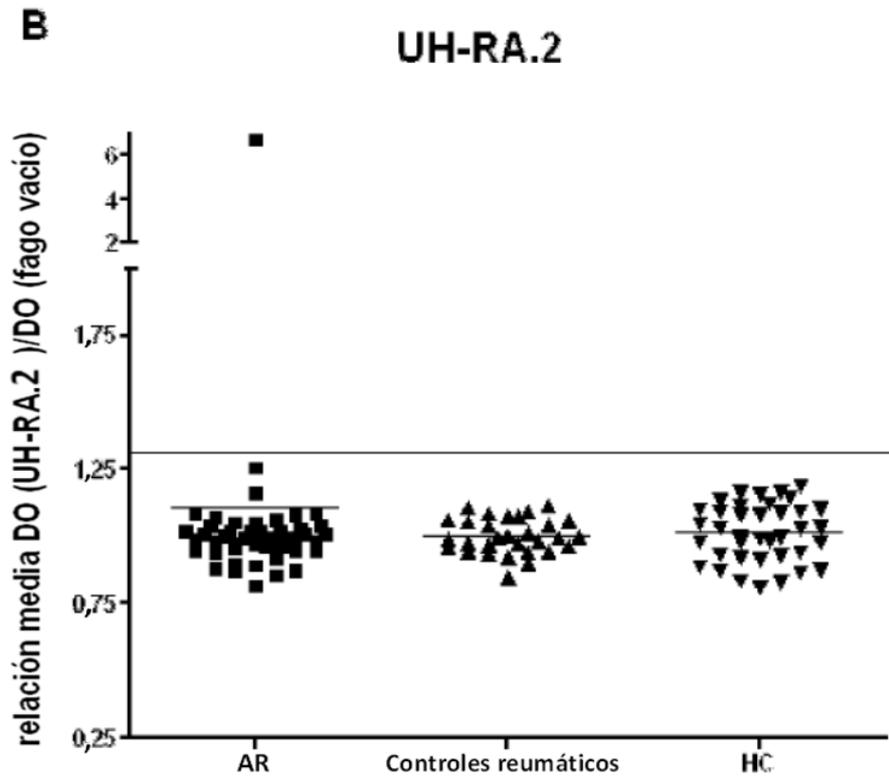
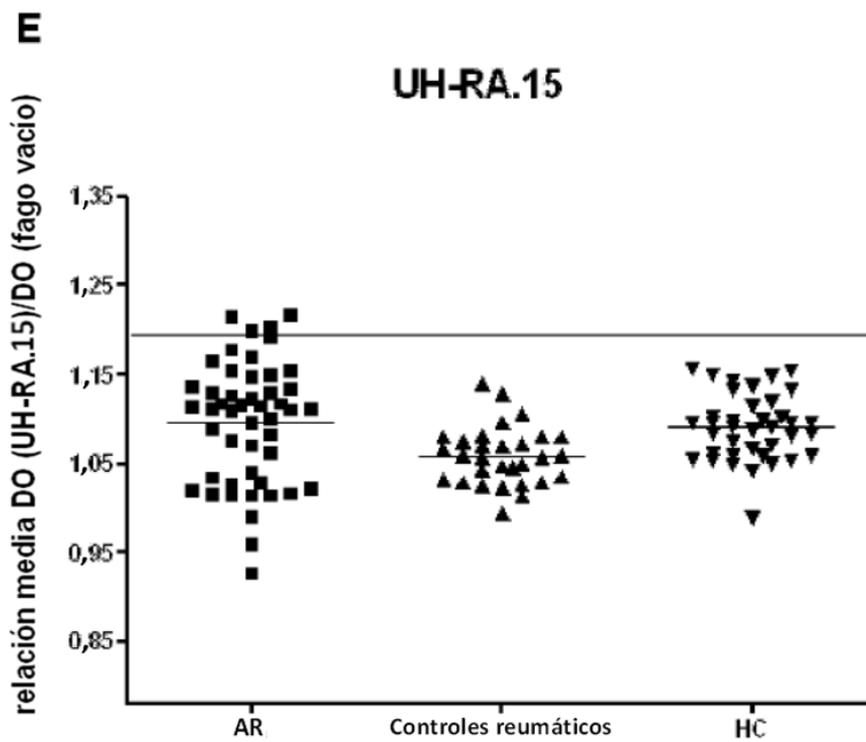
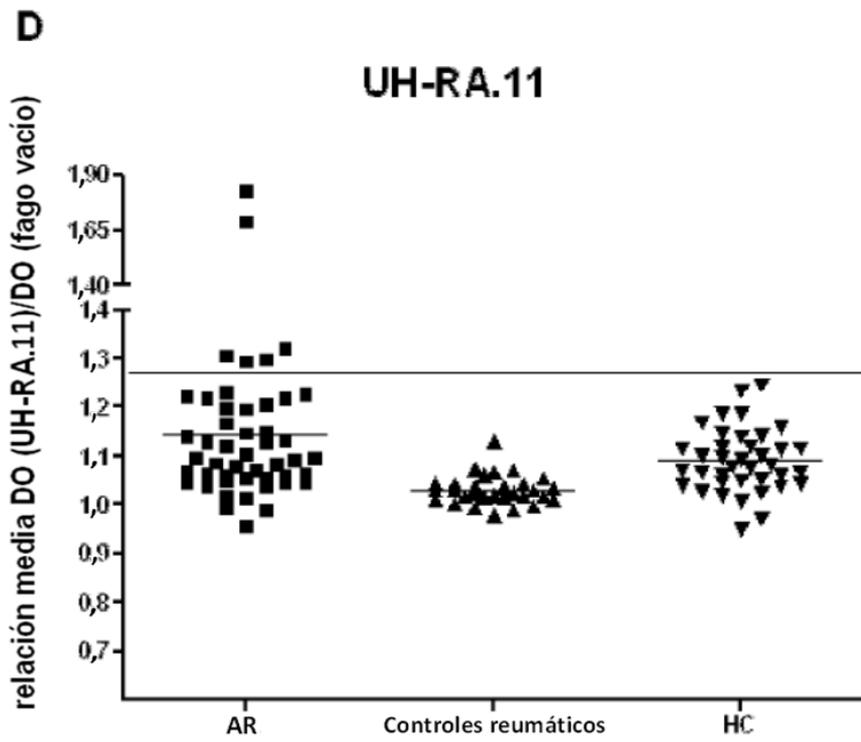


Figura 5







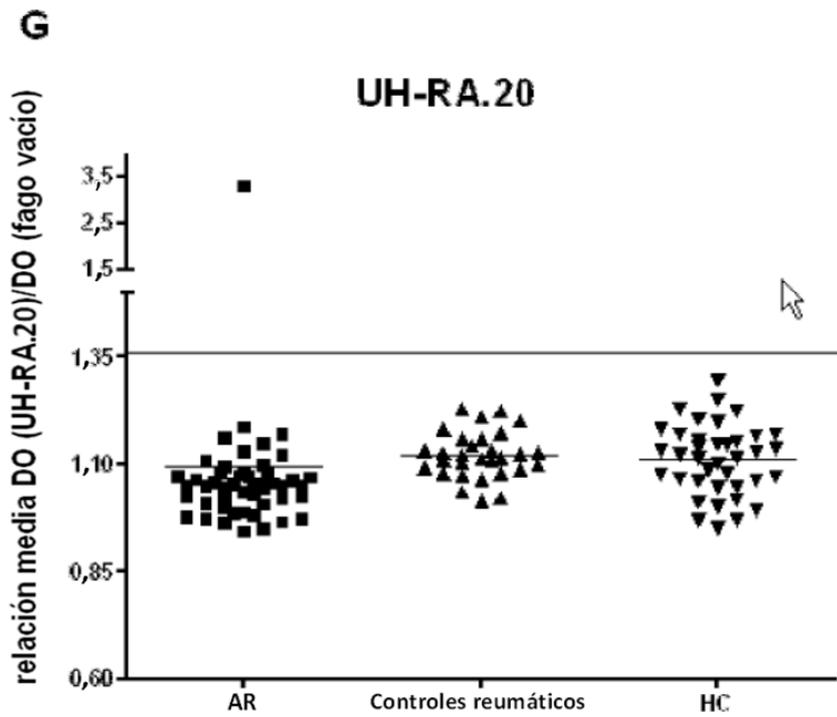
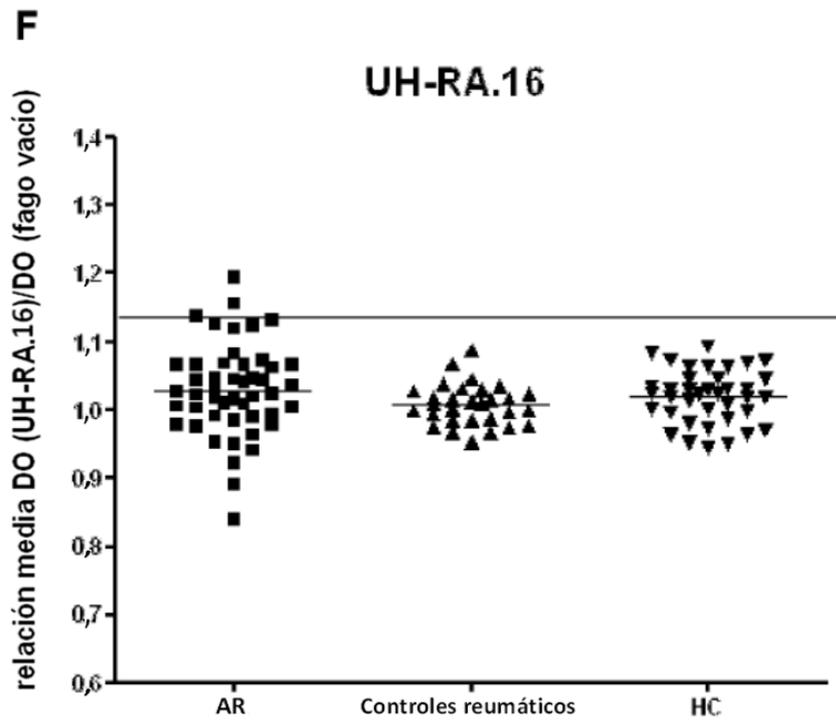
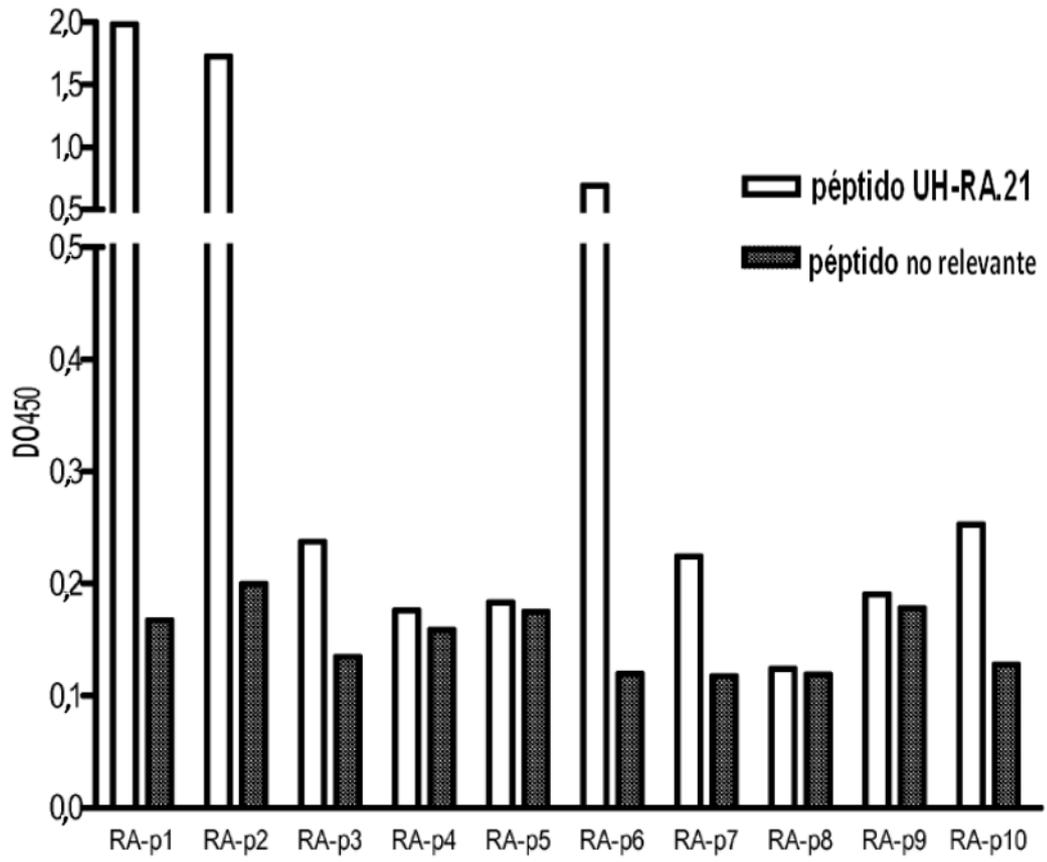
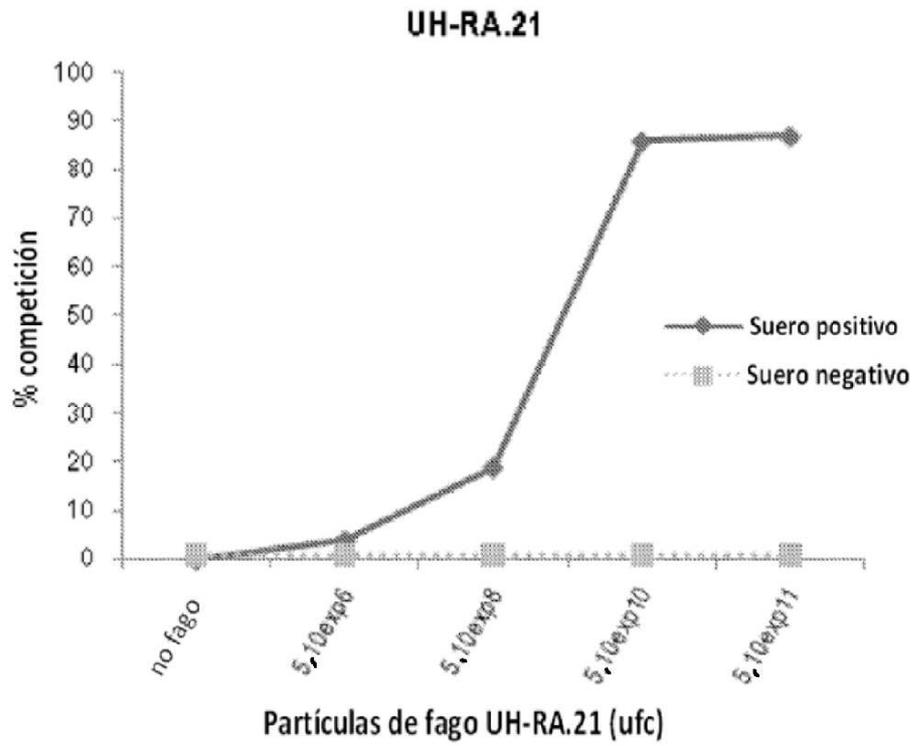


Figura 6.
A



B



C

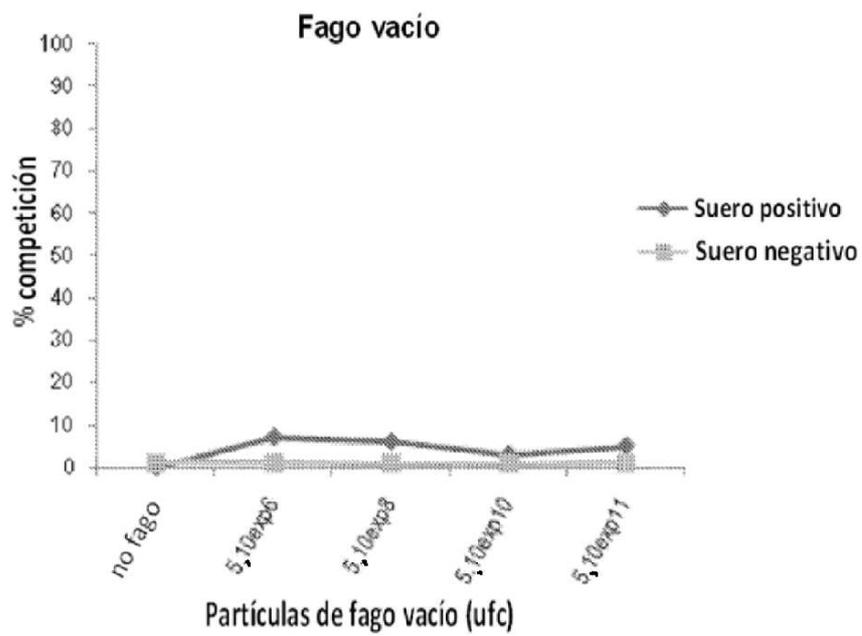


Figura 7

