

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 052**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2012 PCT/GB2012/050203**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12703569 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2671084**

54 Título: **Biomarcadores para osteoartritis**

30 Prioridad:

**31.01.2011 GB 201101639**

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

**06.02.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIÈGE (33.3%)  
Place du 20 Août 7  
4000 Liège, BE;  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE  
LIÉGEOIS (33.3%) y  
THE UNIVERSITY OF BRISTOL (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SHARIF, MOHAMMED;  
MALAISE, MICHEL y  
DE SENY, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 600 052 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 osteoartritis

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a biomarcadores que pueden usarse individualmente o en combinación para el diagnóstico de la osteoartritis. Los biomarcadores son particularmente útiles ya que pueden utilizarse para diagnosticar la enfermedad antes de la aparición de síntomas significativos.

### Antecedentes de la invención

10 La osteoartritis (OA) es una de las enfermedades articulares crónicas más frecuentes que producen deficiencias de salud sustanciales<sup>1</sup> y está siendo cada vez más frecuente a medida que la población envejece. La obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la OA y los datos recientes sugieren que habrá una epidemia de osteoartritis relacionada con la obesidad en la población general<sup>2</sup>. El diagnóstico actual de la OA depende del dolor y la discapacidad que presenta el sujeto y se confirma por radiografía simple de las articulaciones afectadas. Actualmente no hay pruebas bioquímicas disponibles que se puedan utilizar para diagnosticar, predecir las consecuencias de la enfermedad o controlar la respuesta al tratamiento. La disponibilidad de buenos marcadores bioquímicos ayudaría con el seguimiento precoz de la actividad de la enfermedad y las consecuencias y, sin duda va a acelerar el desarrollo de fármacos específicos para OA.

15 OA se caracteriza por la desregulación de la homeostasis normal de las articulaciones que conduce a la degradación del tejido intrarticular, el intento de reparación y la inflamación mediada por citocinas y factores de crecimiento. Los inventores y otros han demostrado que las concentraciones en el suero de macromoléculas (biomarcadores) pueden proporcionar una forma de medir estos procesos<sup>3-8</sup>. Los estudios previos de los inventores que describen la extensa gama de biomarcadores han demostrado que hay muchas macromoléculas que son supuestos marcadores de las consecuencias de la enfermedad radiográfica de OA de la rodilla, mientras que otros tienen algún valor de diagnóstico<sup>9-11</sup>. En su estudio más reciente, los inventores examinaron 20 biomarcadores diferentes e identificaron 8 que estaban relacionados con procesos biológicos y patológicos en la OA de la rodilla. Varios de estos biomarcadores también tenían valor de diagnóstico y predecían la evolución radiológica de la enfermedad, así como el dolor y la discapacidad<sup>12</sup>. Sin embargo, estos biomarcadores (por separado o en combinación) carecen de especificidad y sensibilidad para discriminar a cada sujeto de la referencia o sugerir una posible evolución de la enfermedad para el sujeto a lo largo del tiempo. Por lo tanto existe una urgente necesidad de buscar biomarcadores nuevos y más específicos para la investigación de la OA y otras enfermedades de las articulaciones.

20 SELDI-TOF-MS (de sus siglas en inglés: Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry) Espectrometría de Masas en Tiempo de Vuelo mediante Desorción-Ionización por Láser de Superficie es una tecnología ProteinChip muy potente que investiga de manera diferenciada las concentraciones de proteínas de bajo peso molecular (<20 kDa) en líquidos biológicos tales como suero<sup>13-15</sup>. En estudios de este tipo, pocas veces señales altas o bajas de proteínas son del interés principal y se consideran como posibles biomarcadores de la enfermedad. Superficies SELDI ProteinChip comprenden un conjunto de química cromatográfica clásica para la captura de proteínas en función de sus propiedades físico-químicas y la presentación de varios perfiles de proteínas de la misma muestra biológica estudiada, aumentando de este modo considerablemente las posibilidades de atrapar biomarcadores específicos.

25 En el presente estudio, se analizaron por SELDI-TOF-MS muestras de suero de grupos caracterizados pocillo a pocillo de sujetos con OA, referencias sanas y referencias de enfermedad [(sujetos con artritis reumatoide (AR))] para buscar biomarcadores nuevos y específicos para la OA. Los inventores fueron capaces de identificar una serie de marcadores que muestran en particular una alta especificidad y selectividad por OA y que pueden ser utilizados individualmente o en combinación entre sí y/u otros marcadores de OA.

### Compendio de la invención

30 Se proporciona un método de diagnóstico de la osteoartritis o de seguimiento de la evolución de la enfermedad de la osteoartritis, que comprende identificar la presencia de un aumento de la concentración de un marcador seleccionado del fragmento de vitronectina V65 o de fragmentos, variantes o productos de degradación de la misma en una muestra extraída de un sujeto, en donde el fragmento de vitronectina V65 o los fragmentos, variantes o productos de degradación de la misma comprenden un producto final con extremo terminal C se presentan en el dominio de unión de la heparina.

35 El término osteoartritis es bien conocido en la técnica. La expresión "diagnóstico de la osteoartritis" como se emplea en la presente memoria, quiere decir que confirma que un individuo tiene OA, si el individuo es sintomático o no. Comprende la identificación de un individuo que es probable que desarrolle síntomas de OA, especialmente si no se administra el tratamiento. La expresión "seguir la evolución de la enfermedad" y expresiones relacionadas significan identificar si una enfermedad ha empeorado o si la enfermedad del sujeto ha mejorado. Dichas expresiones incluyen el seguimiento de la respuesta de un sujeto al tratamiento.

El sujeto es preferible un mamífero, especialmente un primate. En una realización, el sujeto es un ser humano.

La muestra puede ser cualquier muestra extraíble del sujeto, tal como sangre, suero, orina o líquido sinovial. Es preferiblemente una muestra de suero o una muestra de líquido sinovial, sobre todo de una articulación que se cree que está, o que es probable que esté afectada por OA.

5 Los marcadores utilizados en la presente invención incluyen el fragmento o fragmentos de vitronectina V65 en el terminal C o variantes de los mismos, en donde el fragmento o fragmentos de vitronectina V65, variantes o productos de degradación de los mismos comprenden un producto final de la vitronectina V65 se presentan en el dominio de unión de la heparina. Ellos pueden denominarse en conjunto en la presente memoria "los marcadores" y una referencia a "los marcadores" puede ser una referencia a todos los marcadores.

10 El fragmento de vitronectina V65 del terminal C significa un producto final del terminal C de la subunidad vitronectina V65 en el dominio de unión a heparina. La secuencia de aminoácidos del fragmento vitronectina V65 del terminal C es:

SQRGHSRGRNQNSRRPS

15 C3f es un fragmento del complemento y es bien conocido en la técnica. Es un fragmento liberado durante la degradación catabólica de C3b por el Factor H después de la activación de C3. Los fragmentos o variantes de C3f son formas modificadas, especialmente truncadas, de C3f o formas en las que uno, dos, tres, cuatro o más aminoácidos han sido cambiados, eliminados, añadidos, sustituidos o modificados de otra manera. En fragmentos o variantes específicos incluyen fragmentos y variantes truncados en los que 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos se han eliminado del extremo terminal C del péptido. Los fragmentos y variantes son preferiblemente funcionales, es decir que tienen propiedades similares a la proteína completa y están unidos específicamente por moléculas de unión similares, tales como anticuerpos. La secuencia de aminoácidos del fragmento C3f es:

20 SSKITHRIHWESASLLR

25 La proteína CTAPIII es bien conocido en la técnica y también conocida como factor-4 plaquetario de baja afinidad. Los fragmentos o variantes de la proteína CTAPIII son formas modificadas de la proteína CTAPIII o formas en las que uno, dos, tres, cuatro o más aminoácidos han sido cambiados, eliminados, añadidos, sustituidos o modificados de otra manera. En fragmentos o variantes específicos incluyen fragmentos y variantes truncados en los que 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos se han eliminado del extremo terminal N del péptido. Los fragmentos específicos incluyen un fragmento en el que se han eliminado 4 aminoácidos del extremo terminal N del péptido ( $\beta$ -tromboglobulina) y un fragmento en el que se han eliminado 2 aminoácidos del extremo terminal N del péptido. La secuencia de aminoácidos de una proteína CTAPIII es:

NLAKGKEESLDSLDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTNCNQVEVIATLKD  
GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD

30 La concentración de los marcadores en la muestra se puede medir por cualquier medio conocido. Se mide preferiblemente por SELDI-TOF-MS.

35 La expresión "aumento de la concentración" significa preferiblemente que la concentración del marcador en cuestión en la muestra es mayor que la concentración esperada para ese marcador. La expresión "disminución de la concentración" significa preferiblemente que la concentración del marcador en cuestión en la muestra es menor que la concentración esperada para ese marcador.

La concentración esperada de un marcador puede identificarse de numerosas de maneras. Por ejemplo, la muestra puede compararse con una muestra comparable de otro sujeto. Si la concentración de un marcador es mayor o menor que la de la muestra comparable, puede considerarse que la concentración ha aumentado o disminuido, respectivamente.

40 La concentración de un marcador en la muestra se puede comparar con una concentración patrón del marcador o con el intervalo de concentraciones apropiado del marcador para el tipo de muestra y el sujeto del que se extrae la muestra. Los intervalos de referencia pueden crearse analizando un gran número de muestras comparables de un número de sujetos en un intervalo de edades. Dichos intervalos de referencia pueden permitir la determinación de la distribución de las concentraciones del marcador. Las muestras comparables son el mismo tipo de muestra que cada una de las demás. Por ejemplo, se toman muestras comparables de los sujetos de la misma especie, género y grupo de edad. Las muestras también se deben tomar a la misma hora del día, ya que las variaciones diurnas pueden afectar a las concentraciones de marcadores. Igualmente, las muestras de líquido sinovial se deben comparar con otras muestras de líquido sinovial, las muestras de suero con otras muestras de suero, etc.

50 El aumento o la disminución en la concentración de cada marcador preferiblemente es estadísticamente significativo. Por ejemplo, el cambio de concentración es al menos del 5%, preferiblemente al menos del 10%, más

preferiblemente al menos del 15%, más preferiblemente al menos del 20%, más preferiblemente al menos del 25%, más preferiblemente al menos del 30%, más preferiblemente al menos del 35%.

5 Alternativamente, la muestra puede compararse con una concentración de marcador proyectada, creada haciendo pruebas al mismo sujeto en una fecha anterior y prediciendo la concentración de marcador que es probable que se observe si el sujeto tiene OA. La predicción puede ser simplemente un aumento o disminución en la concentración de marcador, o puede ser posible cuantificar el cambio probable.

El método puede implicar pruebas de un fragmento de vitronectina V65 y C3f y/o CTAPIII. El método también puede incluir pruebas de otros marcadores de OA o enfermedades relacionadas, tales como TNF- $\alpha$ , MMP-3 y COMP y CTX2.

10 La invención se describirá en detalle a continuación, sólo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras.

### Figuras

Figura 1: A), B), C), D) - Distribución de la intensidad máxima de biomarcadores detectados después del estudio de validación 1 en CM10 ( $m/z$  = 1979, 2021, 3762 y 9292) en los 7 grupos de sujetos (NC, K&L0 1, 2, 3, 4 y AR). E), F) y G) - Espectros de visión del gel proporcionados por 20 pacientes con OA (10 con K&L0 y 10 con K&L4) que representan 1979 y 2021, 3762 y 9292 marcadores de  $m/z$ , respectivamente. H), I) y J) - Distribución de la intensidad máxima de biomarcadores detectados después del estudio de validación 2 en IMAC-Ni ( $m/z$  = 1691, 1778 y 1865) en los grupos K&L0 y K&L4. K) - Espectros de visión del gel proporcionados por 20 pacientes con OA (10 con K&L0 y 10 con K&L4) que representan 1691, 1778, 1865 y 2021 marcadores de  $m/z$ .

Figura 2: Estudio proteómico en espectros de suero y de líquido sinovial emparejados proporcionados a partir de pacientes con OA (K&L1 a K&L4) y con AR, que ilustra la presencia o ausencia de picos en valores de  $m/z$  de 1979 (A), 2021 (A y B), 1691 (B), 1778 (B), 1865 (B), 3762 (C) y 9292 (D) en ambos líquidos.

Figura 3: Purificación e identificación de los fragmentos de proteínas al valor  $m/z$  de 1979, 2021, 3762 y 9292 como fragmento de vitronectina V65, fragmento C3f del complemento, sigue siendo desconocido ( $m/z$  = 3762) y las proteínas CTAPIII. A) Enriquecimiento del fragmento V65 de vitronectina con el equipo Proteominer y el proceso de ultrafiltración en YM-10, y la identificación mediante el uso de ProteinChip y el MALDI-TOF-MSMS. Se cargó péptido sintético en el último espectro. B) Identificación del complemento C3f por  $\mu$ HPLC-ESI-TRAP-MSMS después de la purificación en columna IMAC-Ni y resina C18. También se cargó péptido sintético en el último espectro. C) Enriquecimiento del péptido correspondiente al valor 3762 de  $m/z$  usando el equipo Proteominer y el proceso de concentración en YM-10 y D) Identificación de las proteínas CTAPIII por agotamiento de suero empleando anticuerpos específicos e inespecíficos seguido de la elución de los inmunocomplejos.

### Pacientes y métodos

#### *Pacientes*

Se inscribieron 284 pacientes con OA de rodilla mediante cuestionarios de comunidad, consultas de atención primaria, consultas externas hospitalarias<sup>9,10</sup> y se clasificaron según su puntuación K&L (16). 25 pacientes con AR que cumplían los criterios del American College of Rheumatology de 1987 (17) y 36 individuos sanos [(denominado referencias negativas (NC)] se incluyeron en el estudio como referencias. Se distribuyeron muestras de suero de OA y NC en dos grupos de muestras: el conjunto de análisis (130 OA y 20 CN) y el conjunto de validación (154 OA y 16 CN). Las muestras con AR ( $n$  = 25), sólo se incluyeron en el conjunto de validación. 20 pares de muestras de líquidos de suero/sinovial (12 pacientes con OA y 7 con AR) se utilizaron para la correlación entre ambos líquidos. Los datos demográficos y epidemiológicos de estos pacientes se resumen en la Tabla 1. El protocolo de estudio fue aprobado por las juntas de revisión institucional (Comité de Ética de Investigación), tanto de la confianza del patronato del United Bristol Healthcare NHS, Bristol, Reino Unido como del University Hospital, CHU de Lieja, Bélgica.

#### *Muestras de suero y líquidos sinoviales*

45 Se recogieron muestras de suero en tubos planos de vidrio, se dejaron coagular, y se centrifugaron a 2.800 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Los líquidos sinoviales se procesaron utilizando las mismas condiciones experimentales que el suero. Los sobrenadantes se dividieron en partes alícuotas y se congelaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesitaron para el análisis de SELDI-TOF-MS.

#### *Preparación de la matriz ProteinChip*

50 Las 150 muestras de suero utilizadas para análisis (Tabla 1a) se cargaron en duplicados en dos tipos de matrices ProteinChip (BioRad, EE.UU.) con el fin de capturar una amplia gama de posibles biomarcadores: una aniónica (CM10) y una captura por afinidad de metal inmovilizado unido por enlace covalente con  $\text{Ni}^{2+}$  (IMAC-Ni). Un año después, se llevó a cabo un primer estudio de validación (Validación 1) en las mismas condiciones experimentales y del marco temporal, con un conjunto independiente de 195 muestras de suero (Tabla 1b) y se cargó en matrices

CM10 solamente. Un segundo estudio de validación (Validación 2) se realizó al mes siguiente utilizando un subconjunto de 39 muestras de suero de la Validación 1 incluidas las etapas K&L0 y K&L4 solamente (Tabla 1b). La Validación 2 se realizó en un día en ambas matrices CM10 e IMAC-Ni. Por último, pares de muestras de suero y de líquido sinovial de 12 pacientes con OA (K&L1 a 4) y 7 con AR (Tabla 1c) se cargaron en matrices CM10 y se analizaron para comprobar la presencia de los nuevos biomarcadores en ambos líquidos.

Para todos los estudios, las muestras de suero y líquidos sinoviales se desnaturalizaron en primer lugar en 1,5 volúmenes de urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2% y Tris 50 mM (pH 9), y después se diluyó 6 veces en los siguientes tampones: Tris 100 mM, pH 9 (CM10) y tampón de fosfato 100 mM que contiene NaCl 250 mM, pH 7 (IMAC-Ni). Se prepararon matrices ProteinChip según las instrucciones del fabricante, y como se describió anteriormente<sup>18,19</sup>. Se añadió 1 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Biorad) diluido 2 veces y 1 µl de ácido sinapínico (SPA, BioRad) a cada punto de CM10 e IMAC-Ni, respectivamente. Para la validación 2 realizada en IMAC-Ni, se utilizó CHCA para visualizar mejor los péptidos pequeños. Se cargaron líquidos sinoviales como muestras de suero. Las matrices se analizaron con un pBSII y un lector de PCS4000 ProteinChip para el análisis y el estudio de validación, respectivamente. Los espectros se obtuvieron en una m/z (relación masa a carga) de 1800-20.000 y 1.500 a 20.000 para CM10 e IMAC-Ni, respectivamente.

Se leyeron matrices ProteinChip en el transcurso de una semana para limitar la variabilidad a través del tiempo. Se llevó a cabo normalización de las condiciones experimentales en un esfuerzo para minimizar los efectos de las fuentes de fluctuación irrelevantes. Se aplicaron muestras de suero al azar con el fin de evitar la detección de artefactos debido a una manipulación experimental.

#### *Purificación de proteínas para Identificación de biomarcadores*

El estudio proteómico detectó 4 proteínas a diferentes relaciones m/z como nuevos biomarcadores posibles y una gama de métodos bioquímicos se utilizaron para caracterizar e identificar estos marcadores. El fragmento al valor 1979 de m/z se enriqueció en primer lugar en 1 ml de suero con el equipo Proteominer® (BioRad) según las instrucciones del fabricante, a continuación se dializó frente a una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Lonza, Bélgica) y se filtró usando filtros YM10 (Microcon, Millipore, MA). Se aplicaron péptidos en la fracción de flujo a través en matrices CM10 según las condiciones experimentales descritas previamente. La matriz ProteinChip se analizó a continuación por espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex II, Bruker) para la identificación de este péptido. El segundo péptido al valor 2.021 de m/z se purificó usando 100 µl de suero en una cromatografía en columna IMAC-Ni (Affiland, Bélgica) con tampón de fosfato 100 mM, imidazol 100 mM, NaCl 0,3 M, pH 7,5 como solución de elución. Los péptidos eluidos se concentraron en Dynabeads RPC 18 (Invitrogen, Bélgica) y se eluyeron con 20 µl de acetonitrilo al 50% a ser identificados por µHPLC-ESI-TRAP-MSMS (Esquire, Bruker). El péptido al valor 3762 de m/z se enriqueció también utilizando el equipo proteominer (BioRad) y se concentró en filtros YM10 (Microcon). La solución concentrada se cargó en el fraccionador Offgel (Agilent) según las instrucciones del fabricante. Las fracciones recogidas se analizaron en la matriz H50 ProteinChip (BioRad). El cuarto péptido al valor 9.292 de m/z fue identificado por inmunoeeliminación utilizando 50 µl de suero. El suero se inmunoeeliminó usando perlas de proteína G-agarosa (Santa Cruz) recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-CTAPIII (anti-péptido III activador del tejido conectivo) (Abcam, UK). El fragmento de proteína se eluyó usando ácido acético 100 mM en 30% de ACN, y se detectó en la matriz ProteinChip de IMAC-Ni (BioRad). El anticuerpo monoclonal anti-cistatina B (Santa Cruz) se utilizó como referencia negativa.

#### *Síntesis de péptidos*

Se sintetizaron péptidos sintéticos C3f del complemento y fragmento de vitronectina V65, por síntesis de péptidos en fase sólida (Eurogentec, Bélgica) y se aplicaron en matrices ProteinChip para compararlos con sus correspondientes péptidos purificados.

#### *Correlación con ensayos de biomarcadores disponibles actualmente*

Con el fin de caracterizar mejor los 4 nuevos biomarcadores, se correlacionaron intensidades máximas de biomarcadores a valores m/z de 1979, 2021, 3762 y 9292 con 20 marcadores bioquímicos diferentes relacionados con el cartílago, el hueso y el metabolismo del tejido sinovial. Estos marcadores se habían medido previamente por ensayos ELISA (12) en 93 de las 154 muestras de suero OA utilizadas en el conjunto de validación 1, y se distribuye por igual entre las puntuaciones de K&L.

#### *Análisis estadístico*

El preprocesamiento de los espectros que implican calibración, sustracción del valor de referencia y normalización se completaron antes del análisis estadístico. La detección de picos se realizó utilizando el programa ProteinChip Biomarker Wizard 3.0 (BioRad). Los datos se analizaron por dos métodos estadísticos: una prueba de la U no paramétrica de Mann-Whitney y un algoritmo de aprendizaje de máquina denominado *extra-Trees N*. El último método es un análisis multifactorial de árbol de decisiones utilizado para construir modelos de clasificación y para clasificar los picos según su contribución relativa en la clasificación de los 2 grupos (20). En este modelo, los valores máximos de m/z se clasificaron en relación con su porcentaje de importancia [Imp (%)] para diferenciar K&L0 de los grupos K&L4. Los primeros valores representan posibles biomarcadores implicados en el desarrollo de OA. Los

valores de  $P$  se asocian a esta clasificación y se consideran significativos si  $\leq 0,05$ . Para determinar la asociación con biomarcadores disponibles en la actualidad, se utilizaron datos clasificados para calcular los coeficientes de correlación de Spearman. Los valores  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## Resultados

### 5 *Reproducibilidad.*

Se determinaron por coeficiente de variaciones (CV) máximos de variabilidad de intensidad en los perfiles proteicos SELDI proporcionados por la misma muestra de suero aplicada 8 veces en el mismo chip (intra-experimento) o aplicada de forma consecutiva durante 7 días (inter-experimento) como describe de Seny *et al.*(19). Se evaluaron variaciones intra-chip en matrices CM10 a 12,4% y 10% para el estudio de análisis y validación, respectivamente, y en matrices IMAC-Ni a 13,3% para el estudio de análisis. Se determinaron variaciones inter-chip después de 7 días en matrices CM10 al 18,5% y 30% para el análisis y estudio de validación, respectivamente, y en matrices IMAC-Ni al 24,1% para el estudio de análisis. La variabilidad de los biomarcadores en el valor pico de  $m/z$  1979, 2021, 3762 y 9292 también se determinó durante el estudio de validación utilizando una muestra de suero de control de calidad K&L0 y K&L4. Se descubrió que los CV estaban comprendidos en el intervalo del 5,1% al 10,4% para intra-experimentos y del 27,5% al 33,6% para inter-experimentos. Los CV calculados están en el intervalo de los datos publicados.

### *Estudio de análisis de sueros*

De las 130 muestras de suero OA y 20 NC (conjunto de análisis, Tabla 1a), se obtuvieron 300 espectros tanto en matrices ProteinChip CM10 como IMAC-Ni. El programa informático Biomarker Wizard resolvió 156 y 134 picos en CM10 y IMAC-Ni, respectivamente. La clasificación de los biomarcadores en máximo 19 se resume en la Tabla 2 de la sección Análisis y está hecha según la Imp (%) dada por el análisis multifactorial. También se calculó un valor  $P$  para cada biomarcador.

### *Estudios de validación de sueros*

Se diseñó un nuevo estudio proteómico (Validación 1) con un conjunto independiente de muestras para confirmar la solidez de los biomarcadores detectados después de un estudio de análisis. La validación 1 se realizó en matrices CM10 ProteinChip solamente. Este estudio utilizó 154 muestras de suero de OA (Tabla 1b) clasificadas según su puntuación K&L, más 16 sueros de individuos sanos (grupo NC) y 25 sueros de pacientes con AR. Todas las muestras se cargaron por duplicado en CM10, generando un total de 390 espectros. Los mismos métodos estadísticos que se han empleado para el conjunto de análisis se utilizaron para la clasificación de los picos [Tabla 2 – sección Validación 1].

La comparación del análisis y los estudios de validación permitió llevar a cabo 4 biomarcadores potencialmente nuevos a valores  $m/z$  de 1979, 2021, 3762 y 9292 (Figura 1). La distribución de las intensidades de los picos en grupos NC, en OA (K&L0 a 4) y en AR se muestran en la figura 1A, B, C, D.

Las intensidades máximas a valores  $m/z$  de 1979 y 2021 se encontraron significativamente aumentadas ( $P < 0,0001$ ) en todas las muestras de OA en comparación con las muestras de NC y AR y más aumentadas con las puntuaciones crecientes de K&L (Fig. 1A, B). Con un umbral de intensidad máxima de 2,4 (media + 2 D.T. de las referencias), la sensibilidad para el pico 1979 de  $m/z$  fue de 29% en K&L0, 41% en K&L1, 38% en K&L2, 57% en K&L3 y 66% en K&L4, mientras que su especificidad fue del 97%. Con un umbral de intensidad máxima de 1,5 (media + 2 D.T. de las referencias), la sensibilidad para el pico 2021 de  $m/z$  fue de 91% en K&L0, 100% en K&L1, 72% en K&L2, 87% en K&L3 y 93% en K&L4, mientras que su especificidad fue del 92%. Las intensidades a valores 3762 y 9292 de  $m/z$  fueron significativamente mayores ( $m/z = 3762$ ) ( $P = 0,014$ ) o menor ( $m/z = 9292$ ) ( $P = 0,004$ ) en pacientes con OA que en los grupos de referencia, y el anterior (Figura 1C) aumentó con puntuaciones crecientes de K&L de pacientes con OA mientras que el segundo (Figura 1d) disminuyó con el aumento de las puntuaciones de K&L. Las figuras 1E, F y G presentan las cuatro biomarcadores en espectros de visión en gel de 10 pacientes con OA con K&L0 y 10 con K&L4. La figura demuestra que los biomarcadores con valores de  $m/z$  a 1979, 2021 y 3762 son apenas detectables en K&L0 pero están presentes a concentraciones mucho más elevadas en muestras de suero de pacientes con puntuaciones de K&L de 4, mientras que lo contrario es cierto para el biomarcador al valor  $m/z$  de 9292.

La validación 2 se llevó a cabo en un solo día en 39 pacientes K&L0 y K&L4 utilizados en la validación 1, para asegurar que estos 4 biomarcadores no estaban artefactos debido al tiempo empleado durante el estudio de validación 1 realizado durante 7 días. Esto permitió descartar cualquier ambigüedad técnica y reforzar la validez de los 4 biomarcadores de los inventores que muestran todavía valores  $P$  inferiores a 0,05 [Tabla 2 - validación 2]. Por otra parte, debido a la utilización de CHCA que visualiza mejor los péptidos pequeños, se detectaron nuevos biomarcadores a valores de  $m/z$  de 1691, 1778 y 1865 en IMAC-Ni. Estos nuevos biomarcadores se ilustran en la figura 1H, I, J, K y se encontró que eran variantes del pico de  $m/z$  2021 como se expone más adelante. El biomarcador de  $m/z$  2021 también puede visualizarse en espectros K&L4 de visión en gel (matrices IMAC-Ni) (Figura 1K).

*Estudio de análisis del líquido sinovial*

Se identificaron al mismo tiempo valores máximos de m/z a 1979, 2021 y 3762, en ambas muestras de suero y líquido sinovial de pacientes con OA en diferentes puntuaciones K&L (Figura 2). Picos en el valor 9292 de m/z solamente se detectaron en el suero, pero no en los líquidos sinoviales de pacientes con AR y OA. El pico de m/z 1979 también estaba presente en 2/7 espectros de líquido sinovial de AR pero no en su muestra de suero correspondiente (datos no mostrados). Por último, también se detectaron picos correspondientes a variantes del biomarcador m/z 2021 tanto en muestras de suero como de líquido sinovial de todos los pacientes con OA, sino también en 3/7 pacientes con AR.

*Identificación de biomarcadores*

Se purificaron proteínas a valores 1979 y 3762 de m/z (Fig. 3A y C) y se aplicaron en matrices ProteinChip (CM10 y H50, respectivamente) para ser analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. El valor 1979 de m/z se identificó como un producto final del terminal C de la subunidad vitronectina V65 cuando el valor 3762 de m/z permanecía indetectable debido a su muy alta hidrofobia. La proteína con m/z 2021 se identificó después de los procedimientos de purificación (Figura 3B) por  $\mu$ HPLC-ESI-TRAP-MSMS como péptido C3f del complemento. La identificación de proteínas en el valor 9292 de m/z se llevó a cabo mediante por inmunoeeliminación usando perlas de proteína G-agarosa recubiertas con anticuerpos anti-CTAPIII (Figura 3D). CTAPIII se eluyó de su inmunocomplejo y se aplica en matrices ProteinChip para ser analizado por SELDI-TOF-MS.

Los picos en valores 1691, 1778, 1865 y 2021 de m/z se encontraron agrupados en espectros proporcionados por matrices IMAC-Ni y por lo tanto son variantes (forma truncada en el extremo terminal C por 3, 2 y 1 aminoácido, respectivamente) de péptidos C3f del complemento.

La misma observación se hizo para los picos 8862, 9060 y 9292 de m/z ya que estas proteínas eluyeron simultáneamente de su inmunocomplejo. El valor de m/z 8862 es una forma truncada de 4 aminoácidos en el extremo del terminal N de CTAPIII y se conoce mejor como proteína  $\beta$ -tromboglobulina ( $\beta$ -TG) (masa del péptido de 8865 Da). El pico 9060 de m/z es una forma truncada de 2 aminoácidos en el extremo del terminal N de CTAPIII (masa del péptido de 9064). Por otra parte, los picos en valores de 4430, 4530 y 4644 de m/z representan formas con doble carga ( $2H^+$ ) de valores 8862, 9060 y 9292 de m/z. Estas formas se encontraron estadísticamente significativas en el estudio de análisis, pero no en el de validación.

*Correlación con ensayos de biomarcadores disponibles actualmente*

Las intensidades de los picos correspondientes a valores de m/z de 1979 (fragmento de vitronectina V65), 2021 (C3f), 3762 (desconocido) y 9292 (CTAPIII) y detectados en los espectros generados por 93 muestras de suero OA, se correlacionaron con una amplia gama de biomarcadores disponibles en la actualidad (Tabla 3). El fragmento de vitronectina V65 se correlacionó positivamente con C-telopéptido de colágeno tipo II (CTXII) y negativamente con agrecano y metaloproteína 1 de la promatriz (pro-MMPI). El péptido C3f se correlacionó negativamente con agrecano y piridinolina (pyd). El fragmento de proteína en el valor 3762 de m/z presentó una correlación positiva con la glucoproteína 39 del cartílago (YKL-40), MMP-3, pyd y desoxipiridinolina (dpd), y una correlación negativa con el epítipo 5D4 de sulfato de queratano (KS). Por último, CTAPIII se correlacionó positivamente con MMP-3, el factor  $\alpha$  de la necrosis tumoral (FNT- $\alpha$ ) y agrecano.

*Exposición*

La tecnología SELDI-TOF-MS es una técnica muy potente para investigar proteomas de centenares de muestras de suero o líquidos sinoviales y para detectar posibles biomarcadores de proteínas implicados en la patología de OA. Usando este enfoque proteómico, los autores han detectado 4 nuevos biomarcadores para OA, y todos ellos parecían discriminar pacientes con OA de las referencias (NC y AR). Dos de ellos han sido identificados como el producto final del terminal C de la subunidad vitronectina V65 y el péptido C3f del complemento. Un tercero al valor 3762 de m/z permanece sin identificar debido a su hidrofobia demasiado alta. Se descubrió que estos tres biomarcadores aumentados en el suero de pacientes con OA grave y también se detectaron en líquidos sinoviales de los mismos pacientes. El cuarto nuevo biomarcador fue identificado como una proteína específica de plaquetas, CTAPIII, y había disminuido en el suero de pacientes con OA grave.

*Fragmento de vitronectina V65*

El pico 1979 de m/z identificado como un producto final del terminal C de la subunidad vitronectina V65 en el dominio de unión a heparina, se detectó predominantemente en espectros CM10 de pacientes con OA con enfermedad empeorada (K&L3 y 4) en estudios tanto de análisis como de validación. Sin embargo, las intensidades máximas fueron significativamente mayores en todos los subconjuntos de OA, incluido K&L0, en comparación con las referencias (NC y AR) y aumentó aún más al aumentar las puntuaciones K&L. El estudio de la proteómica preliminar sobre pares de muestras de suero y líquidos sinoviales de pacientes con OA puso de manifiesto la presencia de este fragmento en ambos líquidos. El pico 1979 de m/z se detectó también en 2/7 espectros de líquido sinovial de AR pero no en su correspondiente muestra de suero (datos no mostrados). Por consiguiente, el fragmento de vitronectina V65 del suero puede proceder de líquidos/tejidos de las articulaciones y parecía ser un

marcador interesante de OA con una sensibilidad global (todos los subconjuntos OA) del 47% y una especificidad del 97%.

La vitronectina es un factor de adhesión celular y dispersión encontrado en el suero y en muchos tejidos, incluidos el cartílago y la sinovia<sup>21</sup>. Es reconocido por los receptores de integrina  $\alpha\beta3$ . La interacción entre la vitronectina a través de su arginina glicina y el motivo de ácido aspártico (RGD)<sup>22</sup> ha sido muy descrita<sup>23-25</sup>. Se han detectado integrinas  $\alpha\beta3$  muy expresadas en osteoclastos de resorción ósea y se demostró que desempeñan una función esencial en la mediación de la unión de los osteoclastos a la matriz ósea permitiendo la resorción ósea activa<sup>23,26,27</sup>. También se ha observado una débil expresión del receptor de integrina  $\alpha\beta3$  en los condrocitos<sup>28</sup> y se ha descrito como un protagonista en la regulación de los mediadores inflamatorios (IL-1 $\beta$ , NO y PGE<sub>2</sub>) en el cartílago afectado por osteoartritis<sup>29</sup> pero no se cree que esté involucrado en la adherencia de los condrocitos al cartílago<sup>30</sup> o de transmisión para la desdiferenciación de condrocitos<sup>31</sup>. La integrina  $\alpha\beta3$  también se encuentra en otros tejidos de las articulaciones tales como sinoviocitos similares a fibroblastos<sup>32</sup>.

Dado que la pérdida de cartílago y la inflamación sinovial leve a moderada son características reconocidas de OA especialmente en estadios avanzados (K&L3 y 4) de la enfermedad, el fragmento de vitronectina V65 podría desempeñar una función importante en la patogenia de OA. Por otra parte, en el presente estudio, la evolución de OA se caracteriza por concentraciones elevadas en el suero de fragmentos de vitronectina V65 y CTX-II, y bajas concentraciones en el suero de agregano y pro-MMP-1, un patrón típico de OA progresiva cuando el número de células disminuye<sup>33</sup>, por lo tanto, el fragmento de vitronectina V65 también puede ser un marcador importante de la evolución de la enfermedad en OA.

#### 20 Péptido C3f del complemento y variantes

El pico 2021 de m/z identificado como péptido C3f del complemento se detectó predominantemente en espectros IMAC-Ni<sup>2+</sup> de pacientes con OA con enfermedad empeorada (K&L3 y 4) tanto en estudios de análisis como de validación. Por otra parte, las concentraciones en el suero de péptido C3f fueron significativamente mayores en todos los subconjuntos de OA, incluido K&L0, en comparación con las referencias (NC y AR) y aumentaron aún más con al aumentar las puntuaciones K&L. Un segundo estudio de validación (Validación 2) se llevó a cabo en un solo día para eludir la detección de biomarcadores falsos positivos debido a los procedimientos extensos de manipulación de muestras como describen West-Norager *et al.*<sup>35</sup>, y fue considerado como un estudio de control de calidad. CHCA en lugar de la matriz SPA se utilizó, sin embargo, en la Validación 2 para visualizar mejor los péptidos pequeños por debajo de 2000 Da. Se detectaron tres picos, a valores 1691, 1778 y 1865 de m/z, por tanto, con un elevado poder discriminatorio al comparar pacientes con OA con OA radiográfica empeorada (puntuación K&L 4) con pacientes sin OA radiográfica (puntuación K&L 0). Estos picos se agruparon en los espectros y sus valores m/z corresponden a variantes truncadas de C3f del complemento. El péptido C3f es un fragmento liberado durante la degradación catabólica de C3b por el Factor H después de la activación de C3<sup>36</sup>. C3f se degrada más para formar C3f-des-Arg (masa del péptido de 1.865 Da) y variantes por carboxipeptidasa N. El estudio proteómico preliminar sobre muestras de suero y líquidos sinoviales de pacientes con OA puso de manifiesto la presencia de péptidos C3f en ambos líquidos, pero también en 3/7 pares suero de AR/líquido sinovial (datos no mostrados). Sin embargo, como para fragmentos de vitronectina V65, se encontró que el péptido C3f tiene algunos valores de diagnóstico en OA, con una sensibilidad global (todos los subconjuntos de OA) del 87% y una especificidad del 92%. Por otra parte, las concentraciones en el suero de péptido C3f estaban significativamente (y positivamente) correlacionados con las concentraciones en el suero de vitronectina V65 en pacientes con OA probada. Curiosamente, la vitronectina también está implicada en la cascada del complemento, inhibiendo el ensamblaje del complejo de ataque de a la membrana. Por último, el biomarcador C3f también mostró correlaciones negativas significativas con las concentraciones de agregano y pyd en el suero.

Funciones fisiopatológicas importantes podrían ser protagonizadas por el complemento C3f en el metabolismo del cartílago y en otro tejido articular. De hecho, pueden encontrarse componentes del complemento en cartílagos sanos ya que son expresados por los condrocitos. Sin embargo, su producción puede aumentar en presencia de mediadores patológicos. El cartílago se compone principalmente de ECM hecho de proteoglicano altamente cargado negativamente (agregano). ECM se encuentra asentado en redes de fibras de colágeno, que contienen muchas otras moléculas unidas, tales como las pequeñas proteínas con repeticiones ricas en leucina (SLRP). Algunas de estas SLRP, tales como fibromodulina (FMOD) y osteoadherina (OSAD), interactúan con el dominio de cabeza globular de C1q para activar aún más las vías clásica y alternativa de factores de complemento<sup>37,38</sup>. FMOD y OSAD, así como la condroadherina (CHAD) también interactúan con el Factor H. En patología de OA, donde la integridad de la ECM se ve comprometida por la degradación proteolítica, se liberan SLRP en el líquido sinovial que van a estar expuestas a factores del complemento favoreciendo su activación y, por lo tanto, más opsonización de los tejidos propios, la anafilaxia y la inflamación general. En los casos más graves (K&L grados 3 y 4) los fragmentos C3f en el suero eran mayores, mientras que las concentraciones de agregano y pyd circulantes eran más bajas. Esta observación es coherente con un marcado descenso de la síntesis de proteoglicanos y el estímulo de la remodelación ósea que normalmente se ve en pacientes de OA con enfermedad progresiva. Los estudios adicionales de los autores tendrán como objetivo determinar si existe una correlación directa entre estos péptidos SLRP y C3f. Los péptidos C3f del complemento habían sido detectados por otro estudio proteómico reciente<sup>39</sup> utilizando la purificación de péptidos cortos con perlas magnéticas unidas a C18, en sueros de pacientes con

esclerosis general (SSc). Los autores describieron un predominio de la forma C3f -des-Arg en sueros de pacientes con SSc.

m/z = 3762

5 Las intensidades de los picos en el valor 3762 de m/z aumentaron significativamente en pacientes con OA en comparación con pacientes con NC y/o AR, y también aumentaron al aumentar las puntuaciones K&L. Los autores no han podido identificar esta proteína de interés debido a su alta hidrofobia y la dificultad para ionizarse. Sin embargo, se correlacionó significativa y positivamente con concentraciones de YKL-40, MMP-3, pyd y dpd en el suero, y negativamente con KS. Por lo tanto, la medición de este biomarcador en el suero puede reflejar cambios generales en los principales tejidos de las articulaciones, ya que se ha asociado con el daño del cartílago (YKL-40, KS), inflamación sinovial (MMP-3) y la remodelación ósea (pyd, dpd) (40- 42).

CTAPIII y variantes

15 Las intensidades máximas de CTAPIII (valor 9292 de m/z) fueron significativamente inferiores en la población de pacientes con OA en comparación con las referencias. Y entre los subconjuntos de OA, CTAPIII continuó siendo significativamente reducida en los pacientes de OA con las enfermedades radiográficas más graves (puntuación de K&L 3 o 4). Se detectaron también variantes[ $\beta$ -TG (valor 8862 de m/z), forma truncada al valor 9060 de m/z, formas con doble carga (2H+) a valores 4644, 4430 y 4530 de m/z] como biomarcadores discriminatorios en el estudio de análisis. Sin embargo, CTAPIII fue el único biomarcador que tiene un valor *P* estadísticamente discriminante tanto en los análisis como en los estudios de validación. CTAPIII y las variantes sólo se detectaron en muestras de suero pero no en los líquidos sinoviales, lo que sugiere que estos péptidos no se producen localmente en las articulaciones y no pueden ser, por tanto, específicos del tejido de las articulaciones. Por otro lado, CTAPIII y variantes podrían ser marcadores de inflamación general, una idea que estaría apoyada por correlaciones positivas con concentraciones en el suero de TNF- $\alpha$  y MMP-3. En otras palabras, las etapas graves de la OA de rodilla se caracterizan por concentraciones bajas en el suero de CTAPIII, TNF- $\alpha$  y MMP-3, también un patrón típico de OA progresiva, cuando el número de células se reduce.

## 25 Conclusión

El estudio proteómico de los autores ha detectado 4 nuevos biomarcadores de OA. Al menos dos de ellos, el fragmento de vitronectina V65 con una especificidad del 97% y C3f del complemento con una especificidad del 92%, pueden discriminar pacientes con OA de las referencias (NC y AR) y son potenciales marcadores de diagnóstico en suero probables para la OA. La proteína no identificada restante a m/z 3762 aumentó mientras que la proteína CTAPIII disminuyó en las etapas más graves de la osteoartritis. Los 4 nuevos biomarcadores séricos tienen correlaciones significativas con grupos de parámetros que reflejan la disminución en el metabolismo del cartílago, en la inflamación local y la remodelación ósea continua a medida que la osteoartritis evoluciona. Estas correlaciones sugieren que estos nuevos biomarcadores séricos también pueden tener relevancia fisiopatológica y podrían representar interesantes puntos de partida nuevos para comprender mejor la OA.

## 35 Referencias

1. Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, *et al.* The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am. J. Public Health* 1994; 84:351-8.
2. Allman-Farinelli MA, Aitken R J, King LA, Bauman AE. Osteoarthritis - the forgotten obesity-related epidemic with worse to come. *Med. J. Aust.* 2008; 188:317.
- 40 3. Garnero P, Ayral X, Rousseau J C, *et al.* Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2613-24.
4. Petersson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6:33-9.
- 45 5. Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37:46-50.
6. Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 1994; 94:25-33.
- 50 7. Saxne T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br. J. Rheumatol.* 1992; 31:583-91.
8. Sharif M, Saxne T, Shepstone L, *et al.* Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Br. J. Rheumatol.* 1995; 34:306-10.

9. Sharif M, George E, Shepstone L, *et al.* Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:760-7.
10. Sharif M, Granell R, Johansen J, Clarke S, Elson C, Kirwan JR. Serum cartilage oligomeric matrix protein and other biomarker profiles in tibiofemoral and patellofemoral osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:522-6.
11. Sharif M, Kirwan JR, Elson CJ, Granell R, Clarke S. Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2479-88.
12. Davis CR, Karl J, Granell R, *et al.* Can biochemical markers serve as surrogates for imaging in knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum.* 2007; 56:4038-47.
13. De Bock M, de Seny D, Meuwis MA, *et al.* Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J. Biomed. Biotechnol.*; 2010:906082.
14. Tang N, Tomatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev.* 2004; 23:34-44.
15. Weinberger SR, Boschetti E, Santambien P, Brenac V. Surface-enhanced laser desorption-ionization retentate chromatography mass spectrometry (SELDI-RC-MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 782:307-16.
16. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 1957; 16:494-502.
17. Arnett F C, Edworthy SM, Bloch DA, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:315-24.
18. de Seny D, Fillet M, Meuwis MA, *et al.* Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:3801-12.
19. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, *et al.* Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin. Chem.* 2008; 54:1066-75.
20. Geurts P, Fillet M, de Seny D, *et al.* Proteomic mass spectra classification using decision tree based ensemble methods. *Bioinformatics* 2005; 21:3138-45.
21. Rosenblum G, Carsons S. Quantitation and distribution of vitronectin in synovial fluid and tissue of patients with rheumatic disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1996; 14:31-6.
22. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 2001; 294:339-45.
23. Horton MA. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29:721-5.
24. Nakamura I, Duong le T, Rodan SB, Rodan GA. Involvement of alpha(v) beta3 integrins in osteoclast function. *J. Bone Miner. Metab.* 2007; 25:337-44.
25. Rinaldi N, Weis D, Brado B, *et al.* Differential expression and functional behaviour of the alpha v and beta 3 integrin subunits in cytokine stimulated fibroblast-like cells derived from synovial tissue of rheumatoid arthritis and osteoarthritis in vitro. *Ann. Rheum. Dis.* 1997; 56:729-36.
26. Nesbitt S; Nesbit A, Helfrich M, Horton M. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:16737-45.
27. Shinar DM, Schmidt A, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M. Expression of alpha v and beta 3 integrin subunits in rat osteoclasts in situ. *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8:403-14.
28. Loeser RF. Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. *Arthritis Rheum.* 1993; 36:1103-10.
29. Attur M G, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR. Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J. Immunol.* 2000; 164:2684-91.
30. Kurtis MS, Schmidt TA, Bugbee WD, Loeser RF, Sah RL. Integrin-mediated adhesion of human articular chondrocytes to cartilage. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:110-8.

31. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, *et al.* In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2006; 134:510-5.
32. Nam EJ, Sa KH, You DW, *et al.* Up-regulated transforming growth factor beta-inducible gene h3 in rheumatoid arthritis mediates adhesion and migration of synoviocytes through alpha v beta3 integrin: Regulation by cytolindes. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2734-44.
33. Di Cesare PE. Pathogenesis of osteoarthritis. En: Firestein GS, Budd RC, Harris Jr. ED, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, eds. *Kelley's textbook of rheumatology.* Philadelphia, 2008:1525-46.
34. Imai K, Shikata H, Okada Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett.* 1995; 369:249-51.
35. West-Norager M, Kelstrup CD, Schou C, Hogdall EV, Hogdall CK, Heegaard NH. Unravelling *in vitro* variables of major importance for the outcome of mass spectrometry-based serum proteomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 847:30-7.
36. Ganu VS, Muller-Eberhard HJ, Hugh TE. Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized. *Mol. Immunol.* 1989; 26:939-48.
37. Sjoberg A, Onnerord P, Morgelin M, Heinegard D, Blom AM. The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:32301-8.
38. Sjoberg AP, Manderson GA, Morgelin M, Day AJ, Heinegard D, Blom AM. Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol. Immunol.* 2008.
39. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, *et al.* Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:2018-30.
40. Johansen JS, Hvolris J, Hansen M, Backer V, Lorenzen I, Price PA. Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint. *Br. J. Rheumatol.* 1996; 35:553-9.
41. Manicourt DH, Fujimoto N, Obata K, Thonar EJ. Serum levels of collagenase, stromelysin-1, and TIMP-1. Age- and sex-related differences in normal subjects and relationship to the extent of joint involvement and serum levels of antigenic keratan sulfate in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:1774-83.
42. Mora S, Pitukcheewanont P, Kaufman F R, Nelson J C, Gilsanz V. Biochemical markers of bone turnover and the volume and the density of bone in children at different stages of sexual development. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14:1664-71.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los pacientes y referencias utilizados en el estudio \*

Descripción	OA					
	NC	K&L0	K&L1	K&L2	K&L3	K&L4
Número de pacientes	20	44	17	20	23	26
Mujeres,%	60	75	71	70	65	35
Edad a la entrada	57,5 (47-63)	57 (34-79)	59 (51-71)	60,5 (50-81)	60 (30-83)	62,5 (51-78)
Edad al inicio	/	44 (25-74)	50 (16-67)	47 (23-66)	51 (17-68)	41,5 (13-75)
Duración de la enfermedad	/	6 (1-44)	8 (1-44)	11 (1-49)	10 (1-42)	20 (3-64)
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>	25 (19-31)	25 (19-40)	26 (18,5-39)	23,5 (19-34)	27 (21-37)	28 (22,5-45)

ES 2 600 052 T3

a) Serie analítica (n=150)

Número de rigideces en articulaciones temprano por la mañana	/	3 (0-180)	30 (0-120)	5 (0-120)	5 (0-360)	10 (0-120)
% con CRP elevada (> 6 mg/l)	5	10	8	16	18	5

b) Serie de validación 1 (n = 195)

Descripción	NC	OA					
		K&L0	K&L1	K&L2	K&L3	K&L4	AR
Número de pacientes	16	24	22	32	61	15	25
Mujeres,%	50	58	77	75	48	46	64
Edad en la entrada	56 (49-64)	61 (43-79)	60 (38-78)	64 (45-92)	68 (43-81)	68 (52-76)	55 (25-77)
Dolor WOMAC	/	6 (2-20)	7 (0-20)	8 (2-15)	7 (1-14)	11 (5-17)	/
Rigidez WOMAC	/	4 (0-8)	4 (1-6)	4 (1-7)	4 (0-6)	4 (2-7)	/
Función WOMAC	/	21 (2-68)	27 (0-45)	27 (6-53)	24 (1-49)	34 (18-44)	/
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>	23 (20-30)	28 (21-44)	31 (23-48)	29 (19-42)	28 (22-41)	31 (23-39)	/
% con CRP elevada (> 6 mg/l)	/	21	18	22	10	14	78

c) Líquidos séricos y sinoviales emparejados (n = 19)

Descripción	NC	OA					
		K&L0	K&L1	K&L2	K&L3	K&L4	AR
Número de sujetos	/	/	2	3	3	4	7
Mujeres,%	/	/	0	67	100	100	57
Edad en la entrada	/	/	70 (64-77)	67 (67-68)	69 (65-83)	77 (62-81)	58 (44-68)
Edad de inicio	/	/	65 (62-68)	67 (62-67)	68 (60-79)	75 (61-77)	44 (24-58)
Duración de la enfermedad	/	/	5 (1-10)	1 (0,5-1)	3.5 (1-5)	3 (1-24)	10 (1,5-20)
Índice de masa corporal, kg/m <sup>2</sup>	/	/	28 (24-33)	29 (24-35)	32 (28-34)	25 (25-36)	/
% con CRP elevada (> 6 mg/l)	/	/	0	0	0	0	71

\* A menos que se indique lo contrario, los valores son la media (intervalo). NC = Referencias negativas; K&L = Puntuación Kellgren y Lawrence; CRP = proteína C reactiva; AR = artritis reumatoide y WOMAC = Índice de Osteoartritis de las Universidades Western Ontario y McMaster.

Tabla 2: Se utilizaron dos análisis estadísticos, un algoritmo de aprendizaje automático denominado Extra-Trees N (Imp %) y una prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica (Valores P), para clasificar valores de m/z según su contribución relativa para diferenciar los grupos K&L0 frente a K&L4 en estudios SELDI-TOF-MS de análisis, validación 1 y validación 2. Los valores de m/z correspondientes al alto porcentaje de información [Imp (%)] y los valores P pequeños destacan la diferente concentración de proteínas significativa entre grupos K&L0 frente a K&L4. La clasificación de valores m/z de ambos métodos se menciona en la columna "Orden".

CM10 m/z	Análisis			Validación 1			Validación 2			ID
	Imp (%)	Orden	valor P	Orden	Imp (%)	valor P	Orden	valor P	Orden	
3762	5,68	1	$1,9 \times 10^{-7}$	1	13,62	$1,1 \times 10^{-6}$	3	$4,4 \times 10^{-3}$	27	NI
2021	4,48	2	$2,8 \times 10^{-5}$	9	1,30	$2,4 \times 10^{-4}$	17	$1,5 \times 10^{-4}$	14	C3f del complemento
3364	3,98	3	$1,4 \times 10^{-6}$	2	NS	NS	NS	NS	NS	NI
4530	3,96	4	$2,1 \times 10^{-5}$	7	NS	NS	NS	NS	NS	Variante de CTAPIII <sup>+</sup> (2H <sup>+</sup> )
8862	3,80	5	$2,0 \times 10^{-6}$	4	NS	NS	NS	NS	NS	$\beta$ -TG
9292	3,46	6	$3,3 \times 10^{-5}$	10	NS	$3,4 \times 10^{-4}$	27	0,01	NS	CTAPIII
9060	2,70	7	$2,3 \times 10^{-5}$	8	NS	NS	NS	NS	NS	Variante de CTAPIII
11238	2,68	8	$1,8 \times 10^{-3}$	22	NS	NS	NS	NS	NS	NI
7766	2,59	9	$3,7 \times 10^{-5}$	11	NS	NS	NS	NS	NS	PF4
4430	2,18	11	$5,6 \times 10^{-6}$	5	NS	NS	NS	NS	NS	$\beta$ -TG <sup>+</sup> (2H <sup>+</sup> )
3157	1,99	12	$7,5 \times 10^{-5}$	13	NS	NS	NS	NS	NS	NI
4644	1,98	13	$4,7 \times 10^{-5}$	12	NS	$3,8 \times 10^{-2}$	64	NS	NS	CTAPIII <sup>+</sup> (2H <sup>+</sup> )
1979	1,21	19	$1,7 \times 10^{-3}$	21	2,27	$3,8 \times 10^{-6}$	6	$1,0 \times 10^{-3}$	23	Fragmento de vitronectina V65

IMAC m/z	Análisis			Validación 2			ID
	Imp (%)	Orden	valor P	Orden	valor P	Orden	
4286	5,64	1	$3,9 \times 10^{-4}$	3	NS	NS	NI
11683	4,45	2	$8,8 \times 10^{-5}$	1	NS	NS	SAA
2021	4,22	3	$3,2 \times 10^{-4}$	4	$2,0 \times 10^{-6}$	11	C3f del complemento
1691	ND	ND	ND	ND	$1,6 \times 10^{-7}$	6	C3f del complemento
1778	ND	ND	ND	ND	$2,2 \times 10^{-7}$	8	C3f del complemento
1865	ND	ND	ND	ND	$1,2 \times 10^{-6}$	9	C3f del complemento

NI: No identificado

ND: No detectado debido a la utilización de la matriz SPA que permite la detección de picos sólo a partir del valor 2000 de m/z

NS: No estadísticamente significativo

†: forma con doble carga ( $2H^+$ )

ES 2 600 052 T3

Tabla 3: Coeficientes de correlación entre las intensidades máximas correspondientes a vitronectina V65 (m/z = 1,979), C3f del complemento (m/z = 2021), Desconocido (m/z = 3762) y proteínas CTAPIII (m/z = 9292) y 20 biomarcadores diferentes medidos en las mismas 93 muestras de suero utilizadas en el estudio de validación.\*

	m/z 1979 Vitronectina V65	m/z 2021 C3f	m/z 3762 Desconocido	m/z 9292 CTAPIII
m/z 1979 (Vitronectina V65)	/	/	/	/
m/z 2021 (C3f )	0,35 ***	/	/	/
m/z 3762 (desconocido)	0,015	0,035	/	/
m/z 9292 (CTAPIII)	0,1	0,008	0,1	/
COMP	0,05	-0,01	0,11	0,05
CRP	0,02	0,06	0,15	-0,03
GAG	-0,14	0,05	0,16	-0,02
TNF- $\alpha$	0,09	0,2	0,22	0,29 *
YKL-40	-0,15	-0,01	0,43 **	-0,1
KS	-0,1	-0,05	0,21 *	-0,002
Agrecano	* -0,23	* -0,24	-0,06	0,22 *
MMP-1	-0,17	-0,17	0,06	0,015
MMP-3	0,13	-0,04	0,31 **	0,35 **
CTX-1	0,004	-0,05	0,1	0,053
Osteocalcina	0,07	0,05	0,09	0,02
pyd	-0,05	* -0,24	0,24 *	-0,03
dpd	0,01	-0,14	0,35 **	0,04
AH	-0,09	-0,13	0,20	-0,2
PINP	0,08	-0,08	-0,004	-0,002
pro-MMP-1	* -0,21	-0,12	0,15	0,08
anti-CCP	0,014	0,08	-0,19	0,1
SAA	0,05	0,13	0,19	-0,02
CTXII	0,31 *	-0,04	0,20	-0,16
PIIANP	-0,13	-0,14	-0,12	-0,12
IMC	0,11	0,04	0,13	0,05
Edad	-0,08	-0,1	0,3 **	-0,19

\* m/z = masa/carga; C3f = C3f del complemento; CTAPIII = péptido III activador del tejido conectivo; COMP = proteína de la matriz oligomérica del cartílago; CRP = proteína C reactiva; GAG = glucosaminoglucano; TNF- $\alpha$  = factor de necrosis tumoral; YKL-40 = glucoproteína 39 de cartílago; KS = sulfato de queratano; MMP-1 = metaloproteínasa 1 de matriz; CTX-1 = telopéptido de colágeno tipo I de reticulación en terminal C; pyd = piridinolina; dpd = desoxipiridinolina; AH = ácido hialurónico; PINP = N-propéptido de colágeno tipo I; anti-CCP = anti-péptido cíclico citrulinado; SAA = amiloide A sérico; CTXII = telopéptido de colágeno tipo II de reticulación en terminal C; IMC = índice de masa corporal

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de diagnóstico de la osteoartritis o de seguimiento de la evolución de la enfermedad de la osteoartritis, que comprende identificar la presencia de un aumento de la concentración de un marcador seleccionado del fragmento o fragmentos de vitronectina V65, una de sus variantes o productos de degradación en una muestra extraída de un paciente, en donde el fragmento o fragmentos de vitronectina V65, una de sus variantes o productos de degradación comprenden un producto en el extremo terminal C de la subunidad vitronectina V65 en el dominio de unión de la heparina.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde la muestra es sangre, suero, orina o líquido sinovial.
3. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende la identificación de la presencia de un aumento de concentración del fragmento vitronectina V65 del terminal C o uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación en la muestra.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fragmento vitronectina V65 del terminal C comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: SQRGHSRGRNQNSRRPS.
5. Un método según cualquier reivindicación precedente, que además comprende la identificación de la presencia de un aumento de la concentración del fragmento C3f del complemento o uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación en la muestra.
6. Un método según la reivindicación 5, en donde el fragmento C3f del complemento o uno de sus fragmentos o variantes comprende una de las secuencias de aminoácidos siguientes: SSKITHRIHWESASLLR, SSKITHRIHWESASLL, SSKITHRIHWESASL, y SSKITHRIHWESAS y SSKITHRIHWESA.
7. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende identificación una disminución de concentración de la proteína CTAPIII o de uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación en la muestra.
8. Un método según la reivindicación 7, en donde la proteína CTAPIII comprende una de las secuencias de aminoácidos siguientes:

NLAKGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIAT  
 LKD GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD,  
 LAKGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATL  
 KD GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD,  
 AKGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATLK  
 D GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD,  
 KGKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATLKD  
 GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD and  
 GKEESLSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATLKD  
 GRKICLDPDA PRIKKIVQKK LAGDESAD.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que comprende la identificación de al menos dos marcadores en la muestra.
10. Un método según la reivindicación 9, que comprende la identificación de al menos un aumento de concentración del fragmento de vitronectina V65 o de uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación y de un aumento de concentración del fragmento de C3f de complemento o de uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación en la muestra.
11. Un método según la reivindicación 10, que además comprende la identificación de una disminución de concentración de la proteína CTAPIII o de uno de sus fragmentos, variantes o productos de degradación en la muestra.

12. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende además la identificación de la presencia o ausencia, de aumento de la concentración o disminución de la concentración de cualquier otro marcador de osteoartritis.

Figura 1

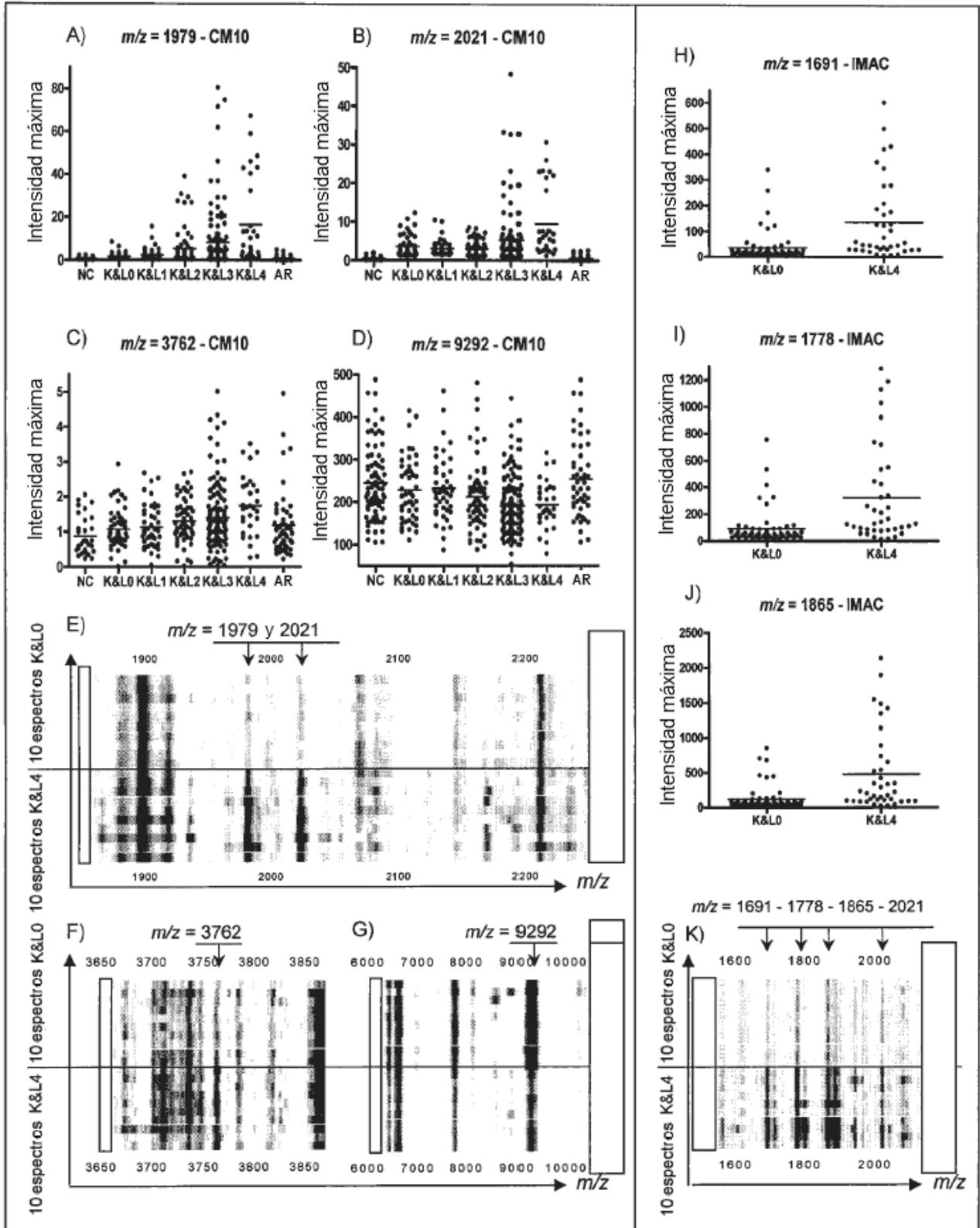


Figura 2

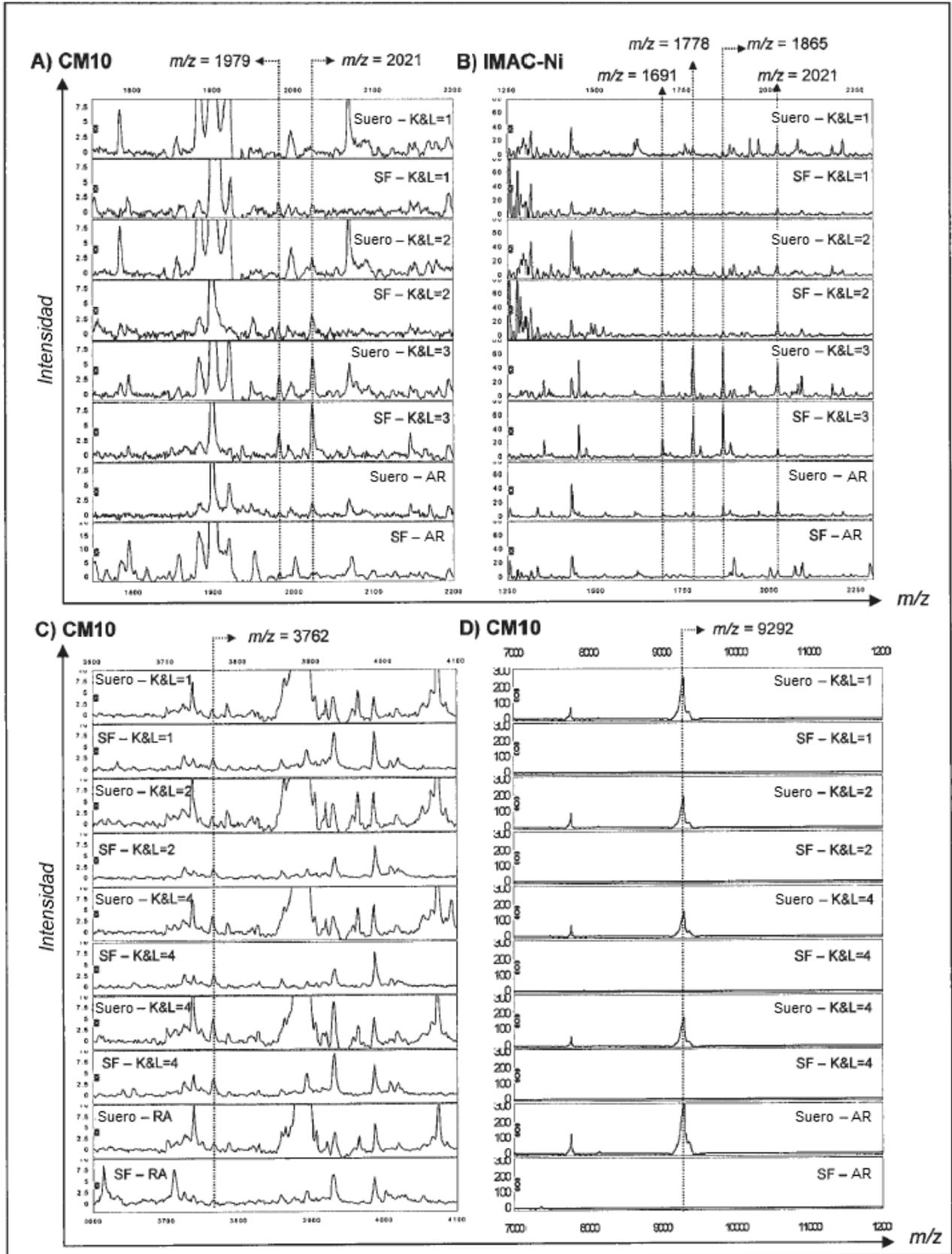


Figura 3

