

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 331**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 17/00** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/564** (2006.01)  
**C40B 40/10** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/CA2012/050748**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13056377**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12842377 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2768851**

54 Título: **Antígenos derivados de la proteína 14-3-3 citrulinada y usos de estos en el diagnóstico de la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

**21.10.2011 US 201161550046 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2017**

73 Titular/es:

**AUGUREX LIFE SCIENCES CORP. (100.0%)  
125-1 887 Great Northern Way  
Vancouver, BC V5T 4T5, CA**

72 Inventor/es:

**MAROTTA, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 638 331 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

Antígenos derivados de la proteína 14-3-3 citrulinada y usos de estos en el diagnóstico de la artritis reumatoide

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, generalmente, a una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta que son reconocidos de manera específica por autoanticuerpos anti-14-3-3 eta. La invención se refiere, además, a una composición y estuche que comprende tal proteína o fragmento de esta, a un anticuerpo dirigido a una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta, y a un huésped no humano que produce tal anticuerpo. La invención se refiere, además, a un método para diagnosticar y/o pronosticar una afección artrítica con el uso de una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta.

## Antecedentes de la invención

15 Artritis, o artralgia se refiere, generalmente, a trastornos inflamatorios en las articulaciones del cuerpo, y suele acompañarse de dolor, hinchazón y rigidez. La artritis puede ser el resultado de cualquiera de varias causas que incluyen infecciones, trauma, trastornos degenerativos, trastornos metabólicos o alteraciones u otras etiologías desconocidas.

20 La Artritis Reumatoide (RA), por ejemplo, es un trastorno inflamatorio crónico de las membranas sinoviales, y es una de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas más comunes. El diagnóstico de la RA depende principalmente de las manifestaciones clínicas, pero los resultados de laboratorio son útiles en el diagnóstico diferencial y el manejo de la enfermedad. El diagnóstico temprano de RA es importante tanto en el tratamiento como en el manejo de enfermedades. Kim y Weisman (2000) Arthritis. Rheum. 43:473-84.

25 El suero de los pacientes afectados contiene factores que pueden ser marcadores de la enfermedad, lo que permite el diagnóstico temprano. Históricamente, el factor reumatoide (RF) ha sido por mucho tiempo uno de los principales indicadores serológicos de la RA. Además, los autoanticuerpos anti-queratina (AKA), conocidos también como autoanticuerpos anti-perinucleares, se detectan en el 40-55 % de pacientes con RA y en el 40-50 % de pacientes con RA diagnosticados clínicamente que fueron negativos al RF. Vincent y otros (1989) Ann. Rheum. Dis. 48:712-22; Corconnier y otros (1996) Br. J. Rheumatol. 35:620-4; Gabay y otros (1993) Ann. Rheum. Dis. 52:785-9. Generalmente, se considera que AKA es significativamente más específico que RF. Además, AKA puede preceder a la aparición clínica de RA por meses o años. La publicación PCT núm. 2010102412 titulada "Composiciones y Métodos para Caracterizar Afecciones Artríticas" también describe autoanticuerpos a proteínas 14-3-3 y métodos para usarlos para evaluar las afecciones artríticas tales como RA. Por ejemplo, la proteína 14-3-3 eta es normalmente una proteína intracelular y sólo en el estado de la enfermedad se libera en el espacio extracelular. Como tal, la proteína 14-3-3 eta en suero y/o los anticuerpos a la misma tienen la misma utilidad diagnóstica como marcadores que complementan otros indicadores serológicos en RA temprana y establecida y se asocian con daño articular en RA y PsA.

40 Recientemente se determinó que AKA reconoce un epítipo que contiene citrulina. von Venrooj (2000) Arthritis Res. 52:785-9. La citrulinación es una forma de una modificación postraduccional (PTM) mediante la que las peptidilargininadeiminadas (PAD) catalizan la deiminación del aminoácido arginina (R) a citrulina (C) lo que resulta en un cambio químico que libera una porción basada en nitrógeno. La citrulinación descontrolada parece ser un proceso activo en condiciones inflamatorias como RA por lo que un "insulto" resulta en 1) activación de PAD; 2) liberación de las enzimas PAD en el espacio sinovial; 3) citrulinación de proteínas extracelulares como vimentina y filagrina; 4) una respuesta humoral inmunológica contra los antígenos citrulinados y 5) la perpetuación de la enfermedad. La detección de estos anticuerpos anti-proteínas citrulinadas puede ser útil en el diagnóstico temprano de la RA. Los anticuerpos IgG contra un péptido sintético que contiene citrulina conocido como CCP (Péptido Citrulinado Cíclico) han probado ser mejores que la prueba de AKA o de RF para diferenciar la RA de otras enfermedades autoinmunitarias, y la presencia de anticuerpo anti-CCP se produce independientemente de los niveles elevados de RF en pacientes con RA. Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes se encuentran o permanecen seronegativos para anti-CCP. En consecuencia, permanece una necesidad significativa en la técnica de indicadores diagnósticos mejores y más específicos de esta enfermedad.

## Resumen de la invención

55 Como se describe en la presente descripción, los sitios de citrulinación de la proteína 14-3-3 eta humana se identifican *in silico*, *in vitro*, y mediante el uso de muestras clínicas. La forma citrulinada de la proteína 14-3-3 eta y/o los autoanticuerpos anti-14-3-3 eta específicos para estas modificaciones postraduracionales en comparación con la forma nativa o no citrulinada de la proteína 14-3-3 eta pueden usarse para el diagnóstico y el pronóstico de la artritis reumatoide, incluso en pacientes negativos a anti-CCP. En particular, y como se describe en la presente descripción por primera vez, la proteína 14-3-3 eta representa un nuevo objetivo de citrulinación que se expresa diferencialmente en pacientes con RA negativos a anti-CCP

frente a controles saludables, lo que indica que la detección de la proteína citrulinada, y/o de los autoanticuerpos específicos a la proteína 14-3-3 eta citrulinada puede mejorar significativamente el diagnóstico de la RA.

5 En consecuencia, en el primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína 14-3-3 eta citrulinada aislada o fragmento de esta que son reconocidos de manera específica por autoanticuerpos anti-14-3-3 eta presentes en el suero de un paciente que padece de una afección artrítica; en donde la proteína 14-3-3 eta o fragmento de esta comprende un residuo de citrulina en una posición seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5.

10 En el segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada de conformidad con el primer aspecto unida a un soporte sólido.

15 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un estuche que comprende al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada de conformidad con el primer aspecto.

20 En un cuarto aspecto la invención proporciona un método para diagnosticar una afección artrítica en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento citrulinado de esta en una condición adecuada para la formación de al menos un complejo inmunológico entre la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta y autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta que pueden encontrarse en la muestra biológica; y detectar la presencia de complejos inmunológicos entre la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta y de autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta, en donde la presencia de dichos complejos inmunológicos es indicativa de una afección artrítica en dicho sujeto.

25 En un quinto aspecto la invención proporciona un anticuerpo dirigido a la proteína 14-3-3 citrulinada de conformidad con el primer aspecto, en donde dicho anticuerpo se une selectivamente a una posición citrulinada seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5.

30 En un sexto aspecto, la invención proporciona un huésped no humano que produce un anticuerpo de conformidad con el quinto aspecto.

35 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar y/o pronosticar una afección artrítica en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a una proteína 14-3-3 citrulinada humana o un fragmento de esta en una condición adecuada para la formación de al menos un complejo inmunológico entre el anticuerpo y las proteínas 14-3-3 citrulinadas que puede encontrarse en la muestra biológica; y detectar la presencia, grado y/o ubicación de al menos un residuo de citrulina dentro de dicha proteína 14-3-3 citrulinada, en donde dicha presencia, grado y/o ubicación de dicho al menos un residuo de citrulina es indicativo de una afección artrítica en dicho sujeto o informativo de un pronóstico para dicho sujeto.

40 La presente invención se refiere al hallazgo de que la presencia/cantidad de autoanticuerpos dirigidos contra la forma citrulinada de la proteína 14-3-3 eta en una muestra biológica es indicativa de la existencia y/o estado de la afección artrítica en el sujeto. En la presente descripción se proporcionan, además, los métodos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto mamífero que comprenden detectar complejos inmunológicos circulantes con al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta en una muestra biológica de un sujeto.

45 La proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta comprende al menos un residuo de citrulina en al menos un sitio de citrulinación, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 o la posición 227 de la secuencia de la proteína 14-3-3 eta nativa, o combinaciones de estas. La proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta por lo tanto puede aislarse o, más preferentemente, unirse a un soporte sólido como se describe con más detalle en la presente descripción.

50 En consecuencia, en la presente descripción se describen métodos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto mamífero que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta y detectar un autoanticuerpo contra la proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta, en donde la presencia/cantidad de un autoanticuerpo contra al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta es indicativa de la existencia y/o estado de la afección artrítica en el sujeto. Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto mamífero que comprende detectar complejos inmunológicos circulantes entre un autoanticuerpo y al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada en una muestra biológica del sujeto, en donde la presencia/cantidad de los complejos inmunológicos existentes en la muestra es indicativa de la existencia y/o estado de la afección artrítica en el sujeto.

5 En una modalidad, el paso de detección incluye cuantificar/medir el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta en la muestra biológica para la comparación con una muestra de control. En consecuencia, los métodos actualmente reivindicados para evaluar una afección artrítica en un sujeto pueden proporcionar determinaciones pronósticas así como también diagnósticas.

10 En una modalidad, la muestra de control es una muestra normal, y la comparación es indicativa de un diagnóstico de artritis. En una modalidad, un aumento del nivel de autoanticuerpo contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta en dicha muestra biológica en comparación con una muestra de control normal (p. ej., de otro sujeto que no tiene una afección artrítica) es un indicador diagnóstico de una afección artrítica en dicho sujeto.

15 En consecuencia, en algunas modalidades, la presencia de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 eta citrulinada o complejos inmunológicos de estos en la muestra biológica del sujeto y/o la presencia de un aumento del nivel de tales autoanticuerpos o complejos inmunológicos en la muestra biológica del sujeto en relación con un nivel de tales autoanticuerpos o complejos inmunológicos en una muestra de control normal (es decir, no artrítica) proporciona un diagnóstico de que el sujeto tiene una afección artrítica.

20 En una modalidad, la muestra control es una muestra biológica previa del sujeto mamífero, y la comparación es indicativa de progresión de la enfermedad y/o eficacia de un régimen terapéutico. En una modalidad, una disminución del nivel de autoanticuerpos a la proteína 14-3-3 eta citrulinada o complejos inmunológicos circulantes de estos en dicha muestra en comparación con la muestra previa (p. ej., una muestra biológica de línea base de dicho sujeto) es indicativo de la eficacia de un régimen terapéutico continuado. En otra modalidad, un aumento del nivel de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 eta citrulinada o complejos inmunológicos circulantes de estos en dicha muestra en comparación con la muestra previa es indicativo de una pérdida de una respuesta a un régimen terapéutico.

25 En consecuencia, en algunas modalidades, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta detectado en la muestra biológica del sujeto en comparación con el nivel de tales autoanticuerpos o complejos presentes en una muestra biológica de línea base del mismo sujeto proporciona una indicación pronóstica de la afección artrítica, y/o una indicación terapéutica de la eficacia potencial de un régimen terapéutico propuesto.

30 En una modalidad, la muestra control es la misma muestra biológica del sujeto mamífero, y la comparación es con el nivel relativo o cantidad de autoanticuerpos dirigidos a la proteína 14-3-3 eta nativa o no citrulinada, lo que puede ser indicativo también de la progresión de la enfermedad y/o la eficacia de un régimen terapéutico potencial como se describe en la presente descripción. En una modalidad, el aumento de los niveles de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 eta citrulinada o complejos inmunológicos circulantes de estos en dicha muestra en comparación con los niveles de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 eta nativa o no citrulinada o complejos inmunológicos circulantes de estos en la misma muestra es indicativo del estadio y/o pronóstico de la enfermedad, o sugiere intervenciones terapéuticas potenciales (p. ej. inhibidores que se dirigen directamente a las peptidilargininadeiminasas y similares).

35 En consecuencia, en algunas modalidades, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta detectado en la muestra biológica del sujeto en comparación con el nivel de autoanticuerpos o complejos a la forma nativa o no citrulinada en la(s) misma(s) muestra(s) biológica(s) o secuenciales(s) del sujeto proporciona una indicación pronóstica de la afección artrítica, y/o una indicación terapéutica de la eficacia potencial de un régimen terapéutico propuesto.

40 En una modalidad, la muestra de control es un control artrítico, y la comparación es indicativa del pronóstico de la enfermedad. En una modalidad, el nivel relativo de autoanticuerpos a la proteína 14-3-3 eta citrulinada o complejos inmunológicos de estos en comparación con una muestra de control artrítica (p. ej., de otro sujeto con una afección artrítica bien definida) es un indicador pronóstico de la artritis.

45 En consecuencia, en algunas modalidades, los sujetos con diferentes estados artríticos tienen diferencias detectables en niveles de autoanticuerpos a al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta, y/o complejos inmunológicos circulantes de tales, y estas diferencias son de una relevancia pronóstica. En un ejemplo, en la presente descripción se describen métodos que pueden usarse para determinar una etapa específica de la enfermedad o el fenotipo histopatológico de una afección artrítica basado en el nivel relativo de autoanticuerpo detectados en un sujeto en comparación con los niveles determinados anteriormente que existen a lo largo del curso de la afección artrítica, p. ej., antes del tratamiento, durante el tratamiento, después del tratamiento, en otro paciente, etcétera. En otro ejemplo, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para clasificar una muestra biológica como que es de un sujeto con alto riesgo de

manifestación de una afección artrítica basado en el nivel relativo de autoanticuerpos detectados en la muestra biológica en comparación con una muestra de control, que puede, p. ej., almacenarse en una base de datos.

5 En otra modalidad, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para propósitos terapéuticos, p. ej., para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a un régimen terapéutico propuesto basado en el nivel relativo de autoanticuerpos detectados en una muestra biológica del sujeto en comparación con una muestra de control, p. ej., de una segunda muestra biológica de un segundo sujeto que se trató exitosamente con el régimen terapéutico propuesto.

10 En consecuencia, en algunas modalidades, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto es en comparación con el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada en muestras biológicas de sujetos cuyas capacidades para responder a un tratamiento se conocen, en donde tal comparación determina la respuesta potencial del primer sujeto al tratamiento. La determinación de la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico puede usarse entonces para informar los métodos de tratamiento de un sujeto con una afección artrítica. Por ejemplo, en la presente descripción se describen métodos para tratar a un sujeto con una afección artrítica que comprenden medir el nivel de autoanticuerpo contra la proteína 14-3-3 eta citrulinada en una muestra biológica del sujeto (p. ej., mediante la medición del nivel de formación del complejo inmunológico autoanticuerpo/proteína 14-3-3 eta citrulinada), que correlaciona el nivel de autoanticuerpo contra o complejo inmunológico con la proteína 14-3-3 eta citrulinada con la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico, y proporcionar el régimen terapéutico al sujeto. En una modalidad, la invención proporciona los métodos para controlar el tratamiento de una afección artrítica, que comprenden determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta en muestras de pacientes y controlar el nivel de autoanticuerpos/complejos inmunológicos que implican proteína 14-3-3 eta citrulinada en un paciente que se somete a tratamiento.

25 En otra modalidad, en la presente descripción se proporcionan métodos para determinar y/o diferenciar los subtipos de artritis en un paciente. En esta modalidad, el nivel relativo de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto es en comparación con el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 eta citrulinada en muestras biológicas de uno u otros sujetos cuyo subtipo de artritis se conoce y/o se establece anteriormente, en donde tal comparación determina el subtipo de artritis para el primer sujeto.

30 La determinación de que los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto son similares a los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica de otro sujeto cuyo subtipo de artritis se conoce y/o se establece anteriormente puede indicar que el primer sujeto tiene el mismo subtipo de artritis que el otro sujeto. Por ejemplo, niveles similares de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto y en la muestra biológica de otro sujeto conocido por tener artritis inflamatoria, p. ej., artritis reumatoide, pueden determinar que el primer sujeto también tiene artritis inflamatoria, p. ej., artritis reumatoide.

40 Además, la determinación de que los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto son diferentes a los niveles de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica de otro sujeto cuyo subtipo de artritis se conoce y/o se establece anteriormente puede indicar que el primer sujeto tiene un subtipo de artritis diferente que el del otro sujeto. Por ejemplo, niveles diferentes de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en la muestra biológica del primer sujeto y en la muestra biológica de otro sujeto conocido por tener artritis no inflamatoria, p. ej., osteoartritis, pueden determinar que el primer sujeto tiene una artritis inflamatoria, p. ej., artritis reumatoide.

50 En una modalidad, el paso de detección comprende una técnica basada en inmunología, p. ej., inmunoprecipitación, ELISA, análisis por membrana de Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos de proteína A, ensayos de inmunolectroforesis, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayo, y similares.

60 Detectar y/o medir autoanticuerpos contra una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta de conformidad con los métodos descritos en la presente descripción puede realizarse, por lo tanto, mediante la observación de la formación de un complejo inmunológico entre el autoanticuerpo y la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en una muestra, o la determinación alternativa de la presencia de un complejo autoanticuerpo/ proteína 14-3-3 citrulinada existente en una

muestra. En una modalidad, la formación puede detectarse por medio de proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) marcada(s) detectablemente o fragmento(s) de esta(s). En otra modalidad, el complejo puede detectarse mediante la formación de un segundo complejo inmunológico entre el complejo autoanticuerpo/ proteína 14-3-3 citrulinada y un anticuerpo secundario marcado detectablemente que se une a inmunoglobulina, p. ej., el esqueleto de inmunoglobulina del autoanticuerpo.

5

En una modalidad, los métodos implican detectar autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o complejos inmunológicos circulantes de estos en la sangre, líquido sinovial, plasma, suero, o tejido (p. ej. articulación sinovial, tejido de articulación dañado, etcétera) de un paciente. En una modalidad, la detección se realiza mediante inmunoprecipitación de autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada de la sangre, líquido sinovial, plasma, suero o tejido mediante el uso de proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta. En una modalidad, la detección implica el uso de un ELISA. En una modalidad, la detección implica el análisis de membrana de Western de una muestra que comprende líquido sinovial, plasma, o suero de un paciente. En una modalidad, la detección implica el uso de radioinmunoensayo. En una modalidad, la detección implica el uso de una prueba de tira. En una modalidad, la detección implica el uso de una prueba en el punto de cuidado. En una modalidad, la detección de autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o complejos circulantes de estos se combina con la detección de otro marcador de artritis (p. ej., MMP, anti-CCP, anti-RF y / o CRP).

15

Además, en la presente descripción se proporcionan estuches que comprenden al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta, en donde la proteína o fragmento de esta comprende un residuo de citrulina en una posición seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5. En una modalidad, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta puede incluir una proteína 14-3-3 citrulinada marcada detectablemente o fragmento de esta, que puede además inmovilizarse en un soporte sólido. La proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta puede comprender un epítipo compartido entre una pluralidad de isoformas de la proteína 14-3-3, o puede comprender un único epítipo para una o un conjunto de isoformas de la proteína 14-3-3 citrulinada. En una modalidad, la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta comprende un epítipo de proteína 14-3-3 eta citrulinada compartido por al menos alguna otra isoforma de la proteína 14-3-3 citrulinada, p. ej., la proteína 14-3-3 gamma. En otra modalidad, el epítipo de proteína 14-3-3 eta citrulinada es único para la proteína 14-3-3 eta.

20

25

En otro aspecto, en la presente descripción se proporciona un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a una proteína 14-3-3 citrulinada humana o un fragmento citrulinado de esta, en donde el anticuerpo se une selectivamente a una posición citrulinada seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5. En una modalidad preferida, el anticuerpo aislado compite por la unión a una proteína 14-3-3 eta citrulinada con autoanticuerpos anti-14-3-3 eta específicos para la proteína 14-3-3 eta citrulinada pero no con autoanticuerpos anti-14-3-3 eta específicos para la forma nativa o no citrulinada de la proteína 14-3-3 eta.

30

35

En una modalidad, el anticuerpo es capaz de unirse selectivamente a dicha proteína 14-3-3 eta citrulinada o a un fragmento citrulinado de esta, sobre la proteína 14-3-3 eta nativa o fragmento 14-3-3 eta nativo de esta, respectivamente. En una modalidad preferida, el anticuerpo es capaz de unirse selectivamente a la proteína 14-3-3 eta citrulinada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 16-22 sobre una proteína 14-3-3 eta nativa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:9-15, respectivamente. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16, pero no una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17, pero no una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18, pero no una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19, pero no una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, pero no a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21, pero no a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14. En una modalidad, un anticuerpo proporcionado en la presente descripción se une selectivamente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22, pero no una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15. En otra modalidad, el anticuerpo es capaz de unirse selectivamente a la proteína gamma 14-3-3 citrulinada sobre la proteína gamma 14-3-3 nativa.

40

45

50

55

60

5 En otra modalidad, la presente invención se refiere al hallazgo de que el grado de citrulinación de las proteínas 14-3-3 eta individuales, y/o la identificación de residuos de citrulina en sitios particulares dentro de la proteína, p. ej. en cualquiera o más de las posiciones 4, 12, 19, 42, 61, 86 y 227 de la sec. con núm. de ident.: 5, es también indicativo de la existencia y/o estado de la afección artrítica en el sujeto. Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto mamífero que comprende detectar el grado y/o las posiciones específicas de citrulinación de al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada o un fragmento de esta en una muestra biológica de un sujeto mediante el uso de los anticuerpos selectivos mencionados anteriormente.

10 En consecuencia, en la presente descripción se describen los métodos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto mamífero que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con uno o más anticuerpos capaces de unirse selectivamente a una proteína 14-3-3 eta citrulinada humana o un fragmento citrulinado de esta y detectar la proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta, en donde la presencia, grado y/o ubicación de la citrulinación dentro de dicha proteína 14-3-3 eta o fragmento de esta es indicativa de la existencia y/o estado de la afección artrítica en el sujeto, en comparación con un resultado clínico definido estándar.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra un gráfico de barras que representa la respuesta de un autoanticuerpo específica a la citrulinación de la proteína 14-3-3 eta en pacientes con artritis reumatoide (RA) negativos a anti-CCP y positivos a anti-CCP como se midió por la reactividad del autoanticuerpo dirigido tanto a la forma recombinante no citrulinada como a la citrulinada del antígeno 14-3-3 eta. Los autoanticuerpos contra proteína 14-3-3 eta se unen, preferentemente, a la forma citrulinada del antígeno 14-3-3 eta tanto en pacientes negativos como positivos a anti-CCP.

25 La figura 2 es una representación gráfica que representa la respuesta del autoanticuerpo específica a la citrulinación de la proteína 14-3-3 eta en treinta controles saludables negativos a anti-CCP (●) en comparación con treinta pacientes con artritis reumatoide (RA) negativos a anti-CCP (▲). El eje y (anti-cit-14-3-3 η) representa la respuesta del autoanticuerpo hacia la forma citrulinada del antígeno 14-3-3 eta para cada sujeto individual.

30 Descripción detallada

"14-3-3" y "proteína 14-3-3" se usan indistintamente y se refieren a al menos un miembro de la familia 14-3-3. Una proteína 14-3-3 es un miembro de una familia de moléculas reguladoras intracelulares conservadas que se expresan de forma ubicua en eucariotas. Las proteínas 14-3-3 tienen la capacidad de unirse a una multitud de proteínas de señalización funcionalmente diversas, que incluyen cinasas, fosfatasa, y receptores de transmembrana. De hecho, se han informado más de 100 proteínas de señalización como ligandos de 14-3-3. Las proteínas 14-3-3 pueden considerarse miembros evolucionados de la superfamilia de Repeticiones Tetratricopeptídicas. Estas tienen, generalmente, 9 o 10 alfa hélices, y usualmente forman interacciones homo y/o hetero dímero a lo largo de sus hélices aminoterminales. Estas proteínas contienen un número de dominios conocidos, que incluyen regiones para interacción de cationes divalentes, fosforilación y acetilación, y escisión proteolítica, entre otros.

45 Existen siete isoformas codificadas genéticamente distintas de las proteínas 14-3-3 que se conocen por expresarse en mamíferos, con cada isoforma que comprende entre 242-255 aminoácidos. Las siete isoformas de la proteína 14-3-3 se designan como 14-3-3 α/β (alfa/beta), 14-3-3 δ/ξ (delta/zeta), 14-3-3 ε (epsilon), 14-3-3 γ (gamma), 14-3-3 η (eta), 14-3-3 τ/θ (tau/theta), and 14-3-3 σ (sigma/estratífina). Las proteínas 14-3-3 tienen un alto grado de similitud de secuencia, y son conocidas por experimentar procesamiento postraduccional, p. ej., fosforilación, citrulinación, etcétera Ver, p. ej., Megidish y otros (1998) J. Biol. Chem. 273 : 21834-45. Por consiguiente, los autoanticuerpos anti-14-3-3 pueden unirse específicamente a y/o reconocer más de una isoforma de la proteína 14-3-3, o pueden unirse específicamente y/o reconocer sólo una isoforma (p. ej., 14-3-3 eta).

50 La citrulinación es una forma de una modificación postraduccional (PTM) por la que las peptidilargininadeiminasa (PAD) catalizan la deiminación del aminoácido arginina (R) a citrulina (C) lo que resulta en un cambio químico que libera una porción basada en nitrógeno. En consecuencia, los términos "proteína 14-3-3 citrulinada" y "péptido 14-3-3 citrulinado" son indistintos y se refieren a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína 14-3-3 nativa (p. ej., una proteína 14-3-3 que no se ha modificado postraduccionalmente) pero por la sustitución de al menos un residuo de arginina en la secuencia nativa con un residuo de citrulina en la secuencia citrulinada.

60 "Sustituido por" o "reemplazado por" incluye modificado en, p. ej., un residuo de arginina que se sustituye o se reemplaza por un residuo de citrulina puede significar también un residuo de arginina modificado en un residuo de citrulina, p. ej.,

mediante la incubación con PAD. La citrulinación por PAD comienza principalmente en el NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína, pero excepcionalmente puede comenzar desde el COOH terminal de la proteína. En el caso de que varios residuos de arginina se reemplacen por residuos de citrulina, esto significa que para dichos varios residuos de arginina cada único residuo de arginina se reemplaza por un único residuo de citrulina.

5

Las peptidilargininadeiminidasas (PAD), referidas también como deiminidasas de proteína-arginina, son una familia de enzimas de modificación postraducciona que convierten residuos de arginina en péptidos a residuos de citrulina en presencia de iones de calcio.

10 "Citrulina" y "Cit" se refiere al ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanoico y es un alfa-aminoácido con fórmula: H<sub>2</sub>NC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H.

15 Los términos "péptido" y "proteína" son equivalentes como se usa en la presente descripción y se refieren a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados por enlaces peptídicos. Los péptidos pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de estos y cualquiera de los aminoácidos de origen no natural incorporado mediante síntesis química de péptidos o mediante modificación química o enzimática. Los péptidos pueden usarse como antígenos y pueden comprender uno o más epítomos.

20 El término "derivado" "variante" y "fragmento" como se usa en la presente descripción con referencia a una proteína se refiere a moléculas que comprenden al menos la porción activa de dicha proteína, p. ej., comprende al menos el epítomo y/o el residuo de citrulina de dicha proteína, uno o ambos de los cuales se encuentran unidos específicamente por autoanticuerpos anti-14-3-3.

25 El término "epítomo" se refiere a una o varias porciones (que pueden definir un epítomo conformacional) de una proteína antigénica que es reconocida y unida específicamente por un anticuerpo o porción de este (Fab', Fab2', etcétera) o por un receptor presentado en la superficie celular de linfocitos de células B o T, y que es capaz, mediante dicha unión, de inducir una respuesta inmunológica. Los epítomos son características químicas presentes generalmente en la superficie de moléculas y son accesibles a la interacción con un anticuerpo. Las características químicas típicas son aminoácidos y porciones de azúcares, que tienen características estructurales tridimensionales así como también propiedades químicas que incluyen carga, hidrofiliidad, y lipofiliidad. Los epítomos conformacionales se distinguen de los epítomos no conformacionales por la pérdida de reactividad con un anticuerpo después de un cambio en los elementos espaciales de la molécula sin ningún cambio en la estructura química subyacente.

35 Un experto en la técnica reconocerá que los autoanticuerpos reconocen fragmentos del antígeno. En consecuencia, como se usa en la presente descripción, "fragmento de esta" y "epítomo" se usan indistintamente y se refieren, generalmente, a un determinante de 14-3-3 que es capaz de unirse a un anticuerpo, p. ej., un autoanticuerpo. En consecuencia, el término "epítomo" cuando se usa en referencia a proteínas 14-3-3 o isómeros específicos se refiere, generalmente, a un fragmento de la proteína, que incluye una proteína 14-3-3 citrulinada, que es capaz de unirse a un anticuerpo, p. ej., un autoanticuerpo.

40 En la presente descripción se describen epítomos de proteína 14-3-3 citrulinada que comprenden al menos un residuo de citrulina y que son reconocidos por autoanticuerpos en un paciente diagnosticado con artritis, particularmente artritis reumatoide, métodos de uso de tales epítomos para evaluar y/o caracterizar una afección artrítica en un sujeto, y estuches que comprenden tales epítomos. Un epítomo puede comprender 3 o más aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítomo. Generalmente, un epítomo consiste en al menos 6 de tales aminoácidos, y más usualmente, al menos 45 8-10 de tales aminoácidos. Los métodos para determinar los aminoácidos que conforman un epítomo incluyen cristalografía por rayos x, resonancia magnética nuclear bidimensional, y mapeo de epítomos.

"Anticuerpo" se refiere a una composición que comprende una proteína que se une específicamente a un antígeno correspondiente y tiene una estructura común, general de inmunoglobulinas. El término anticuerpo cubre específicamente anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Típicamente, un anticuerpo comprenderá al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras interconectadas mediante enlaces disulfuro, que cuando se combinan forman un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada consiste en tres dominios, CH1, CH2 y CH3, y pueden ser del isotipo mu, delta, gamma, alfa o epsilon. De manera similar, la cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera consiste en un dominio, CL, que puede ser del isotipo kappa o lambda. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada 60

VH y VL consisten en tres CDR y cuatro FR, distribuidos desde el amino terminal hasta el carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1 , CDR1 , FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, que incluyen varias células del sistema inmunológico (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. La región constante de cadena pesada media la unión de la inmunoglobulina al tejido huésped o factores huésped, particularmente a través de receptores tales como los receptores Fc (p. ej., FcγRI, FcγRII, FcγRIII, etcétera). Como se usa en la presente descripción, anticuerpo incluye, además, una porción de unión a antígeno de una inmunoglobulina que mantiene la capacidad de unión al antígeno. Estos incluyen, como ejemplos, F(ab), un fragmento monovalente de los dominios del anticuerpo VL CL y VH CH; y fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. El término anticuerpo se refiere, además, a fragmentos Fv recombinantes de cadena única (scFv) y moléculas biespecíficas tales como, p. ej., diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos (ver, p. ej., la patente de los Estados Unidos núm. 5,844,094).

"Antígeno" debe interpretarse ampliamente y se refiere a cualquier molécula, composición, o partícula que puede unirse específicamente a un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más epítopos que interactúan con el anticuerpo, aunque no necesariamente induce la producción de este anticuerpo.

Los "autoanticuerpos" son anticuerpos endógenos que se unen específicamente a antígenos propios, es decir, un componente de tejido normal. Un autoanticuerpo se produce en respuesta a un antígeno de origen natural del mismo cuerpo que produce el autoanticuerpo. En consecuencia, los términos "autoanticuerpos contra 14-3-3" y "autoanticuerpos a 14-3-3" se usan indistintamente y se refieren a anticuerpos endógenos producidos por un sujeto mamífero que se une específicamente a una proteína 14-3-3, que puede citrulinarse, o un fragmento de esta de dicho huésped.

"Unión inmunológica" y "formación de un complejo inmunológico" se usan indistintamente y como se usa en este contexto, se refieren generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre un anticuerpo, p. ej., un autoanticuerpo, y un antígeno para el que el anticuerpo es específico. La fuerza, o la afinidad de las interacciones de uniones inmunológicas pueden expresarse en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en donde una menor  $K_d$  representa una mayor afinidad. Las propiedades de las uniones inmunológicas pueden cuantificarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, ver Davies y otros (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473. Se dice que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de este, "se une específicamente," "se une inmunológicamente," y/o es "reactivo inmunológicamente" si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ensayo de ELISA) con el ligando, y no reacciona detectablemente con ligandos no relacionados bajo condiciones similares.

La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo, cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y de otros compuestos biológicos. El término "dirigido contra" una proteína o péptido, cuando se refiere a un anticuerpo, se refiere también a la reacción de unión específica que es determinante de la presencia de la proteína por dicho anticuerpo en una población heterogénea de proteínas y de otros compuestos biológicos. Por lo tanto, bajo las condiciones de inmunoensayos designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales presentados al marcador "X" de especies específicas tales como rata, ratón, o ser humano pueden seleccionarse para obtener sólo aquellos anticuerpos policlonales que son inmunoreactivos específicamente con el marcador "X" y no con otras proteínas, excepto para las variantes polimórficas y alelos del marcador "X". Esta selección puede lograrse restando los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas del marcador "X" de otras especies. Una variedad de formatos de inmunoensayos pueden usarse para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína (ver, p. ej., Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

"Diagnóstico" significa identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica en un sujeto basado en la presencia o ausencia de uno o más autoanticuerpos para la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) descrita(s) en la presente descripción. El método de diagnóstico hace la correlación entre la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) y la ocurrencia de una enfermedad específica, p. ej., artritis reumatoide, o un grupo de enfermedades (p. ej. afecciones artríticas).

"Pronóstico" significa determinar la progresión o resultado potencial de un proceso de afección patológica y/o de enfermedades en un sujeto, con o sin tratamiento, basado en la presencia/ausencia y/o cantidad de uno o más anticuerpos

a la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) descrita(s) en la presente descripción. El método de pronóstico hace la correlación entre la presencia y/o cantidad de autoanticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) y la progresión y/o resultado probable de la afección artrítica.

5 "Teranóstico" significa determinar la reacción potencial y/o probable para un protocolo de tratamiento propuesto para un proceso de afección patológica y/o de enfermedades en un sujeto, basado en la presencia/ausencia y/o cantidad de uno o más anticuerpos para la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) descrita(s) en la presente descripción, y adaptar un tratamiento apropiado para el sujeto basado en los resultados. El método teranóstico hace la correlación entre la presencia y/o cantidad de autoanticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) y la eficacia probable de las diferentes opciones de  
10 tratamiento en la afección artrítica en el sujeto.

"Sujeto" y "paciente" se usan indistintamente y se refieren a, excepto cuando se indica, mamíferos tales como seres humanos y primates no humanos, así como también conejos, ratas, ratones, carneros, cerdos, y otras especies de mamíferos.

15 "Afección artrítica," "artritis," y "artralgia" se usan indistintamente, y generalmente se refieren a, excepto cuando se indique, un trastorno inflamatorio de las articulaciones del cuerpo. El dolor, la hinchazón, la rigidez, y la dificultad de movimiento se asocian frecuentemente con afecciones artríticas. La artritis consiste en más de 100 afecciones diferentes. Estas pueden ser cualquiera desde formas relativamente suaves hasta formas sistémicas incapacitantes, ver, p. ej., [www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1](http://www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1). Una afección artrítica puede ser el resultado de cualquiera de  
20 varias causas, que incluyen infección, trauma, trastornos degenerativos, trastornos o alteraciones metabólicas, u otras etiologías desconocidas.

Una afección artrítica puede describirse más específicamente de conformidad con el subtipo, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), artritis inducida por cristales, artritis reactiva, espondilartropatía, osteoartritis, sarcoidosis, reumatismo palindrómico, artritis postraumática, artritis relacionada con malignidad, artritis séptica, artritis de Lyme, osteoartritis, artritis bacteriana, infecciosa, etcétera. La artritis puede acompañar, además, otros trastornos identificados, que incluyen gota, espondilitis alquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, soriasis, etcétera. La afección artrítica bien definida se refiere al conocimiento con respecto al tipo de artritis y su etapa, p.  
30 ej., aparición, remisión, recaída, etcétera.

#### Proteínas 14-3-3 citrulinadas

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas 14-3-3 nativas se exponen en la Tabla 1. En algunas modalidades, una proteína 14-3-3 es idéntica a las secuencias de la proteína 14-3-3 nativa proporcionada en la Tabla 1. La proteína 14-3-3 también puede ser sustancialmente homóloga a la secuencia de la proteína 14-3-3 nativa proporcionada en la Tabla 1 y conserva la actividad funcional de la proteína 14-3-3, p. ej., la unión específica a un autoanticuerpo anti-14-3-3, pero difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagénesis.

40 Tabla 1: proteínas 14-3-3.

Proteína 14-3-3	Núm. de acceso a NCBI	Sec. con núm. de ident.:
14-3-3 $\alpha/\beta$	NP_003395.1	1
14-3-3 $\delta/\xi$	NP_001129171.1	2
14-3-3 $\epsilon$	NP_006752.1	3
14-3-3 $\gamma$	NP_036611.2	4
14-3-3 $\eta$	NP_003396.1	5
14-3-3 $\tau/\theta$	NP_006817.1	6
14-3-3 $\sigma$	NP_006133.1	7

Como se usa en la presente descripción, la frase "proteína 14-3-3 eta" se refiere a una proteína que comprende la sec. con núm. de ident.: 5 así como también una proteína sustancialmente homóloga a esta, p. ej., una proteína que tiene al menos 75 %, aún más preferentemente 80 % a 90 %, incluso más preferentemente 90 %-95 %, de nuevo más preferentemente 95

%, y con mayor preferencia al menos 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la sec. con núm. de ident.: 5. La secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 se proporciona a continuación.

5 MGDREQLLQR ARLAEQAERY DDMASAMKAV TELNEPLSNE DRNLLSVAYK NVVGARRSSW RVISSIEQKT  
MADGNEKKLE KVKAYREKIE KELETVCNDV LSLLDKFLIK NCNDFQYESK VFYLMKMGDY YRYLAEVASG EKKNSVVEAS  
EAAYKEAFEI SKEQMQRPTHP IRLGLALNFS VFYYEIQNAP EQACLLAKQA FDDAIAELDT LNEDSYKDST LIMQLLRDNL  
TLWTSDQQDE EAGEGN

10 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de polinucleótidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse interrupciones en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas no pueden tenerse en cuenta para propósitos de comparación). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es de al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, aún más preferentemente al menos 60 %, y aún más preferentemente al menos 70 %  
15 %, 80 % o 90 % de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia se encuentra ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o de nucleótidos que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente descripción la "identidad" de aminoácidos o de polinucleótidos es equivalente a la "homología" de aminoácidos o de polinucleótidos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

25 La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático. En una modalidad preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), mediante el uso ya sea de una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de interrupción de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Aún en otra modalidad preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el uso del programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), mediante el uso de una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de interrupción de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra modalidad, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), mediante el uso de una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4.

40 Las secuencias de proteína de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse mediante el uso de los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y otros (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de polinucleótido de la invención. Las búsquedas de proteínas en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína 14-3-3 de la invención. Para obtener los alineamientos interrumpidos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y otros, (1997) Polynucleotides Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST), p. ej., en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

50 La incubación de una proteína 14-3-3, fragmento, o fusión de esta con una peptidilargininadeiminasa de conformidad con los métodos bien conocidos resulta en una proteína 14-3-3 citrulinada, fragmento o fusión de esta. Tal proteína 14-3-3 citrulinada, fragmento o fusión de esta puede usarse como un inmunógeno, para producir anticuerpos anti-14-3-3, purificar anticuerpos anti-14-3-3, y en ensayos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos como se describe en la presente descripción.

55 De acuerdo con la presente invención, los sitios de citrulinación de la proteína 14-3-3 humana identificados *in silico*, *in vitro* y mediante el uso de muestras clínicas se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2

Posición AA	Secuencia AA	Péptido arginilado	Péptido citrulinado
4	1 - 12	MGD[R]EQLLQRAR (sec. con núm. de ident.:9)	MGD[Cit]EQLLQRAR (sec. con núm. de ident.:16)
12	4 - 18	REQLLQRA[R]LAEQAE (sec. con núm. de ident.: 10)	REQLLQRA[Cit]LAEQAE (sec. con núm. de ident.:17)
19	12 - 26	RLAEQAE[R]YDDMASA (sec. con núm. de ident.: 11)	RLAEQAE[Cit]YDDMASA (sec. con núm. de ident.:18)
42	29 - 45	KAVTELNEPLSNED[R]NLL (sec. con núm. de ident.: 12)	KAVTELNEPLSNED[Cit]NLL (sec. con núm. de ident.:19)
61	50 - 69	KNVVGARRSSW[R]VISSIEQK (sec. con núm. de ident.:13)	KNVVGARRSSW[Cit]VISSIEQK (sec. con núm. de ident.:20)
86	77 - 89	KKLEKVKAY[R]EKI (sec. con núm. de ident.: 14)	KKLEKVKAY[Cit]EKI (sec. con núm. de ident.: 21)
227	217 - 235	KDSTLIMQLL[R]DNLTL WTS (SEQ ID NO:15)	KDSTLIMQLL[Cit]DNLTL WTS (SEQ ID NO:22)

Las proteínas citrulinadas de la invención pueden comprender un residuo de citrulina en al menos una de las posiciones de amino ácidos enumerados en la Tabla 2. En una modalidad, un fragmento de la proteína 14-3-3 eta citrulinada de conformidad con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 16-22.

Como se muestra en la Tabla 3, varios si no todos los siete sitios citrulinados enumerados en la Tabla 2 se conservan también en otras isoformas de 14-3-3. En consecuencia, en la medida que estos sitios de citrulinación se conservan en otras isoformas de 14-3-3, estos sitios pueden usarse también para determinar el estado de citrulinación de estas otras isoformas de 14-3-3 mediante el uso de métodos y materiales descritos en la presente descripción.

Tabla 3

Sitio de aminoácidos en Eta	Eta	Gamma	Alfa/beta	Epsilon	Sigma	Theta	Zeta
4	Presente	Presente	No	Presente	Presente	No	No
12	Presente	Presente	No	No	No	No	No
19	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
42	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
61	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
86	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
227	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

Varios aspectos de la invención pertenecen a proteínas 14-3-3 eta citrulinadas aisladas, y porciones biológicamente activas de estas, p. ej., fragmentos adecuados para el uso como antígenos para autoanticuerpos anti-14-3-3 citrulinada, como se describe en la presente descripción. Las proteínas 14-3-3 citrulinadas, que incluyen fragmentos de estas, pueden aislarse de

la proteína 14-3-3 natural, recombinante o sintética (que incluye fragmentos de esta, respectivamente), mediante la acción de la peptidilargininadeiminasa, p. ej., mediante la incubación de la proteína 14-3-3 nativa o fragmentos de esta, respectivamente, con peptidilargininadeimasas de conformidad con los métodos bien conocidos. Alternativamente, las proteínas 14-3-3 eta citrulinadas pueden aislarse mediante síntesis de péptidos de conformidad con métodos bien conocidos, p. ej., mediante la incorporación directa de residuos de citrulina en el péptido sintetizado.

Las proteínas 14-3-3 pueden aislarse a partir de células o fuentes de tejidos mediante un esquema de purificación apropiado mediante el uso de técnicas estándar de purificación de proteínas. En otra modalidad, las proteínas 14-3-3 se producen mediante técnicas de ADN recombinante.

Preferentemente, una proteína 14-3-3 o fragmento de esta de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para la proteína 14-3-3 o fragmento de esta se ligan en el marco de un vector de expresión de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de terminales de extremos romos o de extremos escalonados para ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar terminales apropiados, el relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada, y la ligación enzimática. Alternativamente, la amplificación por PCR de los fragmentos génicos puede llevarse a cabo mediante el uso de iniciadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden hibridarse y reamplificarse posteriormente para generar una secuencia génica c (ver, p. ej., Current Protocols In Molecular Biology, ediciones Ausubel y otros John Wiley&Sons: 1992).

Además, muchos vectores de expresión se encuentran comercialmente disponibles que ya codifican una porción, p. ej., una porción detectable. Un polinucleótido que codifica una proteína 14-3-3 o fragmento de esta puede clonarse en un vector de expresión tal de manera que una porción, p. ej., una porción detectable, se une en marco a la proteína 14-3-3 o fragmento.

Puede usarse una secuencia señal para facilitar la secreción y el aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias señal se caracterizan, típicamente, por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que se escinden, generalmente, de la proteína madura durante la secreción en uno o más de los eventos de escisión. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la invención pertenece a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, así como también a polipéptidos de los que se ha escindido proteolíticamente la secuencia señal (es decir, los productos de escisión). En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia señal puede unirse operativamente en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que no se secreta ordinariamente o de cualquier otra manera es difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como de un huésped eucariota en el que el vector de expresión se transforma, y la secuencia señal se escinde posteriormente o simultáneamente. La proteína puede entonces purificarse fácilmente a partir del medio extracelular mediante los métodos reconocidos en la técnica.

Alternativamente, la secuencia señal puede unirse a la proteína 14-3-3 nativa o citrulinada, fragmento, o fusión de esta, mediante el uso de una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

Anticuerpos a la proteína 14-3-3 citrulinada y fragmentos de esta

En otras modalidades, la invención proporciona anticuerpos, es decir, anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígenos de estos, que se unen específicamente a una proteína 14-3-3 eta citrulinada de la invención o fragmento de esta, preferentemente una proteína 14-3-3 eta de mamífero (p. ej., ser humano), que puede ser útil para diagnosticar, controlar y/o tratar la RA.

Las moléculas de anticuerpos a la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmentos citrulinados de estas, pueden producirse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante la generación de hibridomas de acuerdo con los métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera se tamizan después mediante el uso de métodos estándar, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, una proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento citrulinado de esta de la invención puede usarse, además, para inmunizar huéspedes no humanos, p. ej., burro, carnero, oveja, cobaya, hámster, conejo, rata y ratón, para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan con la proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento citrulinado de esta pero no con la proteína 14-3-3 nativa o fragmento nativo de esta. Los inmunógenos peptídicos pueden contener, además, un residuo de cisteína en el carboxilo terminal, y pueden conjugarse a un hapteno tal como hemocianina de lapa (KLH). Pueden generarse inmunógenos peptídicos adicionales mediante el reemplazo de residuos de tirosina con residuos de tirosina sulfatados. Los métodos para sintetizar tales péptidos se conocen bien en la técnica. Un polipéptido en toda su extensión de la presente invención puede usarse como el inmunógeno, o,

alternativamente, pueden usarse fragmentos peptídicos antigénicos de polipéptidos. Un péptido antigénico de un polipéptido de la presente invención comprende al menos 7 residuos continuos de aminoácidos y abarca un epítipo de manera que un anticuerpo presentado al péptido forma un complejo inmunológico específico. Preferentemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos, más preferentemente al menos 15 residuos de aminoácidos, aún más preferentemente al menos 20 residuos de aminoácidos, y con mayor preferencia al menos 30 residuos de aminoácidos.

Los anticuerpos monoclonales pueden generarse mediante otros métodos conocidos por los expertos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante. Como una alternativa para preparar hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal de la presente invención mediante el tamizaje de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (p. ej., una biblioteca de anticuerpos de presentación en fago) con un polipéptido relacionado con la presente invención (p. ej., proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento citrulinado de esta) para de esta manera aislar los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen a los polipéptidos relacionados con la presente invención (p. ej., proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento citrulinado de esta). Las técnicas y estuches comercialmente disponibles para generar y tamizar bibliotecas de presentación en fago son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para el uso en la generación y el tamizaje de bibliotecas de presentación en fago pueden encontrarse en la literatura. Por ejemplo, el método de "presentación de anticuerpos combinatorios" se conoce bien y se desarrolló para identificar y aislar fragmentos de anticuerpos que tienen una especificidad particular al antígeno, y puede utilizarse para producir anticuerpos monoclonales. Después de inmunizar un animal con un inmunógeno como se describió anteriormente, se clona el repertorio de anticuerpos del conjunto resultante de células B. Los métodos se conocen, generalmente, para obtener la secuencia de ADN de las regiones variables de una variada población de moléculas de inmunoglobulinas mediante el uso de una mezcla de iniciadores de oligómeros y PCR. Por ejemplo, pueden usarse los iniciadores de oligonucleótidos mixtos que corresponden a las secuencias líder 5' (péptido señal) y/o a las secuencias del marco de lectura 1 (FR1), así como también los iniciadores para una región constante 3' conservada, para la amplificación por PCR de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un número de anticuerpos murinos; una estrategia similar se ha usado también para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras humanas de anticuerpos humanos.

Los sueros y anticuerpos policlonales pueden producirse mediante la inmunización de un sujeto adecuado con un polipéptido de la presente invención. El título de anticuerpos del sujeto inmunizado puede controlarse en el tiempo mediante técnicas estándar, tales como ELISA mediante el uso de proteína inmovilizada. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra un polipéptido de la presente invención pueden aislarse del sujeto o medios de cultivo y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía por proteína A, para obtener una fracción de IgG.

Pueden producirse fragmentos de anticuerpos a los polipéptidos de la presente invención mediante la escisión de los anticuerpos de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab').sub.2 inmunológicamente activos pueden generarse mediante el tratamiento de los anticuerpos con una enzima tal como pepsina.

Además, pueden producirse anticuerpos quiméricos, humanizados, y de cadena única a los polipéptidos de la presente invención, que comprenden ambas porciones humana y no humana, mediante el uso de técnicas estándar de ADN recombinante y/o una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes. Estos anticuerpos humanizados pueden producirse también mediante el uso de ratones transgénicos que no son capaces de expresar genes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de las cadenas pesada y ligera humanas. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales (mAb) humanos dirigidos contra, p. ej., una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta, mediante el uso de ratones transgénicos que portan los genes de inmunoglobulina humana en vez de los genes de inmunoglobulina murina. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés pueden usarse después para producir hibridomas que secreten mAb humanos con afinidades específicas para epítipos de una proteína humana.

Los anticuerpos quiméricos, que incluyen cadenas de inmunoglobulinas quiméricas, pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de un anticuerpo monoclonal murino (o de otras especies) se digiere con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica la Fc murina, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana.

Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina pueden humanizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados, que incluyen las cadenas de inmunoglobulinas humanizadas, pueden generarse mediante el reemplazo de secuencias de la región variable Fv que no están implicadas directamente en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de las regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados se proporcionan por Morrison (1985) Science 229: 1202-07; Oi y otros (1986) BioTechniques 4:214; Queen y otros, patente de los Estados Unidos núms. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762. Estos métodos incluyen aislar, manipular, y

expresar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican todo o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulinas de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de tales secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento de este, puede clonarse después en un vector de expresión apropiado.

Las moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas humanizadas o injertadas con CDR pueden producirse mediante el injerto de CDR o sustitución de CDR, en donde pueden reemplazarse uno, dos, o todos los CDR de una cadena de inmunoglobulina. Ver, p. ej., la patente de los Estados Unidos núm. 5,225,539; Jones y otros (1986) Nature 321 :552-25; Verhoevan y otros (1988) Science 239: 1534; Beidler y otros (1988) J. Immunol. 141 :4053-60; Winter, la patente de los Estados Unidos núm. 5,225,539. Winter describe un método de injerto de CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (solicitud de patente del Reino Unido GB 2188638 A; Winter, la patente de los Estados Unidos núm. 5,225,539). Todas las CDR de un anticuerpo humano particular puede reemplazarse con al menos una porción de una CDR no humana, o sólo alguna de las CDR pueden reemplazarse con las CDR no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de las CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanos pueden producirse, además, mediante el uso de animales no humanos transgénicos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta al desafío por un antígeno. Ver, p. ej., publicación PCT WO 94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas en el huésped no humano han sido incapacitados, y los loci activos que codifican las inmunoglobulinas de cadenas pesada y ligera humanas se insertan en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, mediante el uso de cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humanos requeridos. Un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas se obtiene entonces como progenie mediante el cruce de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. La modalidad preferida de un animal no humano tal es un ratón, y se denomina el XENOMOUSE™ como se describe en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente a partir del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente a partir de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas Fv de cadena única.

Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados que se han modificado mediante, p. ej., delección, adición, o sustitución de otras porciones del anticuerpo, p. ej., la región constante, se encuentran dentro del alcance de la invención. Como ejemplos no limitantes, un anticuerpo puede modificarse mediante la delección de la región constante, mediante el reemplazo de la región constante con otra región constante, p. ej., una región constante destinada a aumentar la vida media, la estabilidad, o la afinidad del anticuerpo, o una región constante de otras especies o clases de anticuerpos, y mediante la modificación de uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glicosilación, la función celular efectora, la unión al receptor de Fc (FcR), la fijación del complemento, etcétera.

Los métodos para alterar una región constante de anticuerpos se conocen en la técnica. Los anticuerpos con función alterada, p. ej., afinidad alterada para un ligando efector, tal como FcR en una célula, o el componente C1 del complemento, pueden producirse mediante el reemplazo de al menos un residuo de aminoácido en la porción constante del anticuerpo con un residuo diferente (ver, p. ej., EP 388,151 A1, la patente de los Estados Unidos núm. 5,624,821 y la patente de los Estados Unidos núm. 5,648,260. Tipos similares de alteraciones a la inmunoglobulina murina (o de otras especies) pueden aplicarse para reducir o eliminar estas funciones, y se conocen en la técnica.

Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo (p. ej., una IgG, tal como una IgG humana) para un FcR (p. ej., R1 gamma de Fc), o para la unión a C1q mediante el reemplazo del(de los) residuo(s) con un(os) residuo(s) que tiene(n) una funcionalidad apropiada en su cadena lateral, o mediante la introducción de un grupo funcional cargado, tal como glutamato o aspartato, o un residuo aromático no polar tal como fenilalanina, tirosina, triptófano o alanina (ver, p. ej., la patente de los Estados Unidos núm. 5,624,821).

Métodos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos, y control del tratamiento

La invención como se describe en la presente descripción proporciona métodos para diagnosticar una afección artrítica que implica autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada. La presencia o ausencia de una artritis reumatoide, o pronóstico del paciente, puede determinarse mediante (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida a partir de un

sujeto mamífero con al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta; (b) detectar en la muestra el nivel de autoanticuerpos que se unen específicamente a la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta; y (c) comparar el nivel en tales anticuerpos con un control apropiado, p. ej., el nivel de proteína 14-3-3 nativa o no citrulinada.

5 Los métodos comprenden usar al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta para detectar autoanticuerpos contra la proteína. Existen una variedad de formatos de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para el uso de una proteína para detectar anticuerpos en una muestra. Ver, p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Como ejemplos no limitantes, la detección de autoanticuerpos contra 14-3-3 citrulinada puede realizarse mediante el uso de métodos o ensayos bien conocidos, p. ej. inmunoprecipitación, ELISA, análisis por membrana de Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométrico, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos con proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia, un test en tira, una prueba en punto de cuidado, y similares. El experto en la técnica reconocerá que estos métodos pueden usarse, además, para medir el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, proteínas 14-3-3 citrulinadas en la muestra biológica.

En algunas modalidades, se utiliza un ensayo de detección automatizado. Los métodos para la automatización de inmunoensayos incluyen los descritos en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,885,530, 4,981,785, 6, 159,750, y 5,358,691. En algunas modalidades, también se automatiza el análisis y la presentación de los resultados. Por ejemplo, en algunas modalidades, se utiliza el programa informático que genera un pronóstico basado en la presencia o ausencia de una serie de proteínas que corresponden a afecciones artríticas, que incluye las proteínas 14-3-3 citrulinadas.

En una modalidad, el ensayo implica el uso de al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento de esta inmovilizada sobre un soporte sólido para unirse a autoanticuerpos de captura que se unen específicamente a la(s) proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) del resto de la muestra. Los autoanticuerpos unidos pueden detectarse después mediante el uso de un reactivo de detección que contiene un grupo reportero y se une específicamente al complejo anticuerpo/proteína. Tales reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente de unión que se une específicamente al autoanticuerpo tal como un anticuerpo anti-humano.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de prueba en una placa de microtitulación o una nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o polivinilcloruro. El soporte puede ser, además, una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como los descritos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 5,359,681. La proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta puede inmovilizarse en el soporte sólido mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la patente y la literatura científica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a la asociación no covalente, tal como adsorción como a la unión covalente (que puede ser un enlace directo entre el anticuerpo y los grupos funcionales en el soporte o puede ser un enlace a través de un agente de entrecruzamiento). Se prefiere la inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede lograrse mediante el contacto del anticuerpo, en un amortiguador adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad adecuada de tiempo. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero se encuentra, típicamente, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En una modalidad, se usa una placa de microtitulación revestida con estreptavidina junto con una proteína 14-3-3 citrulinadabiotinilada o fragmento de esta.

La unión covalente de la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta a un soporte sólido puede lograrse, generalmente, mediante una primera reacción del soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte y con la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta. El autoanticuerpo de captura puede detectarse después mediante el uso de la técnica tipo "sándwich" cuando el ligando marcado para el autoanticuerpo se expone a la fase sólida lavada. Alternativamente, los formatos competitivos se basan en la introducción previa de un anticuerpo marcado a la muestra de manera que las formas marcadas y no marcadas compiten por la unión a la fase sólida. Tales técnicas de ensayo se conocen bien y se describen bien tanto en la patente como en la literatura científica. Ver, p. ej., las patentes de los Estados Unidos núms. 3,791,932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; y 4,098,876. Los métodos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) se describen con detalle en las patentes de los Estados Unidos núms. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,879,262; y 4,034,074. Los ensayos ELISA detectan muy bajos títulos de autoanticuerpos.

Los autoanticuerpos pueden detectarse también mediante radioinmunoensayo en fase sólida (RIA). La fase sólida se expone a la muestra de suero en presencia de anticuerpos marcados radioactivamente que compiten por la unión al ligando inmovilizado. En este ensayo, la cantidad de radiomarcador unido a la fase sólida se relaciona inversamente con la cantidad

de autoanticuerpos presentes inicialmente en la muestra de suero. Después de la separación de la fase sólida, el radiomarcador unido de forma no específica se elimina mediante lavado, y se determina la cantidad de radiomarcador unido a la fase sólida. La cantidad de radiomarcador unido se encuentra, a su vez, relacionado con la cantidad de autoanticuerpos presentes inicialmente en la muestra.

5 En una modalidad, el ensayo se realiza en un formato de prueba en flujo a través o en tiras, en donde la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta se inmoviliza en una membrana, tal como nitrocelulosa. En la prueba en flujo a través, los autoanticuerpos a las proteínas 14-3-3 citrulinadas dentro de la muestra se une a la proteína 14-3-3 citrulinada inmovilizada o fragmento de esta cuando la muestra se pone en contacto con la membrana. Un segundo agente de unión, marcado se une entonces al complejo inmunológico cuando una solución que contiene el segundo agente de unión se pone en contacto con la membrana. La detección del segundo agente de unión puede realizarse entonces como se describió anteriormente. En el formato de prueba en tiras, un extremo de la membrana en la que se encuentra unida la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana hacia la región que contiene el segundo agente de unión, p. ej., a los autoanticuerpos, y al área de la proteína 14-3-3 citrulinada inmovilizada o fragmento de esta. La concentración del segundo agente de unión en el área de la proteína 14-3-3 citrulinada inmovilizada o fragmento de esta indica la presencia de una afección artrítica, o el pronóstico del paciente, etcétera. Típicamente, la concentración del segundo agente de unión en este sitio genera un patrón, tal como una línea, que puede leerse visualmente. La ausencia de tal patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado sobre la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel del autoanticuerpo que sería suficiente para generar una señal positiva en el ensayo, en el formato discutido anteriormente. Los agentes de unión preferidos para el uso en tales ensayos son las proteínas 14-3-3 citrulinadas y fragmentos de estas. Tales pruebas pueden realizarse, típicamente, con una cantidad muy pequeña de muestra biológica y en el punto de cuidado, que pueden ser, además, cuantificables.

25 Además de detectar la presencia de autoanticuerpos en una muestra, pueden usarse muchos métodos para medir cuantitativamente los niveles de los autoanticuerpos. En algunos métodos, el antígeno reacciona con el autoanticuerpo en una fase líquida, y los autoanticuerpos se miden cuantitativamente mediante una técnica de inmunoprecipitación. Por ejemplo, una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta (es decir, isómero en toda su extensión o fragmentos antigénicos) puede marcarse detectablemente (p. ej., con un isótopo o una enzima). Los polipéptidos pueden marcarse durante la síntesis (p. ej., mediante la adición de <sup>35</sup>S-metionina a un sistema de traducción *in vitro* o sistema de expresión celular) o después de la síntesis. El antígeno detectable se añade directamente a una muestra biológica líquida (p. ej., un suero) para formar complejos inmunológicos. Los complejos inmunológicos pueden precipitarse con polietilenglicol. Los complejos inmunológicos pueden aislarse también con un anticuerpo secundario (p. ej., inmunoglobulina anti-humana de camero) u otro tipo de moléculas de unión (p. ej., proteína A o proteína G) que se une a un soporte sólido (p. ej., perlas de agarosa o sefarosa). Los inmunoprecipitados se lavan varias veces después de separarse de la muestra líquida y se examinan para la intensidad del marcador detectable (p. ej., radioactividad). Cualquier autoanticuerpo presente en la muestra puede, por lo tanto, detectarse y cuantificarse. Opcionalmente, un polipéptido no marcado puede añadirse, además, para competir con el polipéptido marcado por la unión a autoanticuerpos.

40 Los métodos de diagnóstico de la presente invención se dirigen, además, para detectar en un sujeto complejos inmunológicos circulantes formados entre las proteínas 14-3-3 citrulinadas y un autoanticuerpo. Los métodos discutidos anteriormente pueden modificarse fácilmente para la detección de tales complejos inmunológicos. Por ejemplo, una molécula de unión inmovilizada (p. ej., proteína A o proteína G unida a una perla) puede añadirse a una muestra biológica líquida. Después de la separación de la fase líquida, los complejos inmunológicos capturados por las moléculas de unión pueden analizarse con SDS-PAGE y probarse con varios anticuerpos contra las proteínas 14-3-3 citrulinadas. Los antígenos capturados pueden someterse también a análisis directo de secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, puede revelarse la identidad de los complejos inmunológicos. Un número de ensayos se practican rutinariamente para detectar complejos inmunológicos circulantes en un sujeto, p. ej., como se describe en Tomimori-Yamashita y otros, *LeprRev*, 70(3):261-71, 1999 (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima basado en anticuerpos); Krapf y otros, *J ClinLabImmunol*, 21(4): 183-7, 1986 (ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia); Kazeem y otros, *East AfrMed J*, 67(6):396-403, 1990 (inmunofelometría láser); y Rodrick y otros, *J ClinLabImmunol*, 7(3): 193-8, 1982 (ensayo de filtro de fibra de vidrio con proteína A, PA-GFF, y ensayo de solubilización en polietilenglicol).

55 Para mejorar la sensibilidad clínica, pueden evaluarse múltiples marcadores dentro de una muestra dada. En particular, pueden analizarse uno o más de otros marcadores de la artritis, o indicadores pronósticos, etcétera., en conjunto con autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada. Estos otros marcadores pueden ser proteínas o ácidos nucleicos. En una modalidad preferida, uno o más de los otros marcadores son proteínas MMP o ácidos nucleicos u otros factores que se usan comúnmente como indicadores de artritis, p. ej., anti-CCP, anti-RF, CRP, SAA, IL-6, SIOO, osteopontina, RF, MMP-1, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de la angiogénesis y productos del metabolismo óseo, cartilaginosa o sinovial (p.

ej. ,CTX- 1 y CTX - II), etcétera. Los métodos para aislar y evaluar ácidos nucleicos basado en las secuencias de referencia se conocen bien en la técnica, ya que son métodos para detectar proteínas de interés dentro de una muestra de paciente.

5 Un experto en la técnica reconocerá que cada uno de estos ensayos bien conocidos puede emplearse para detectar complejos inmunológicos circulantes en una muestra biológica en los métodos de la presente invención. De manera similar, cada uno de estos ensayos bien conocidos pueden emplearse mediante el uso de anticuerpos a la proteína 14-3-3 citrulinada (y fragmentos de esta) descritos en esta invención para controlar el estado de la citrulinación de una proteína 14-3-3 en una muestra biológica, p. ej., para determinar cuánta cantidad de la proteína 14-3-3 se citrulina y /o cuáles y cuántos  
10 sitios de la proteína 14-3-3 se citrulinan, como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, p. ej., en ensayos diagnósticos, pronósticos y teranósticos como se describe en la presente descripción. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente cómo adaptar cada uno de los formatos de ensayo, ensayos diagnósticos, pronósticos y teranósticos, y estuches para usar los anticuerpos a la proteína 14-3-3 citrulinada como se describe en la presente descripción para determinar el estado de la citrulinación de la proteína 14-3-3 en una muestra biológica.

15 Los ensayos de combinación pueden hacerse simultáneamente o secuencialmente. La selección de marcadores puede basarse en los experimentos de rutina para determinar las combinaciones que resultan en una sensibilidad óptima.

20 La invención proporciona métodos para diagnosticar y/o pronosticar afecciones artríticas. En general, las afecciones artríticas pueden detectarse en un paciente basado en la presencia de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada en el líquido sinovial, articulación sinovial, sangre, plasma, o suero de un paciente. En otras palabras, los autoanticuerpos a la proteína 14-3-3 citrulinada pueden usarse como un marcador para indicar afecciones artríticas.

25 En una modalidad preferida, la invención proporciona métodos para diagnosticar artritis reumatoide. En general, la artritis reumatoide puede detectarse en un paciente basado en la presencia de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada en el líquido sinovial, articulación sinovial, sangre, plasma, o suero de un paciente. En otras palabras, los autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada pueden usarse como un marcador para indicar artritis reumatoide. En una modalidad particularmente preferida, la proteína 14-3-3 citrulinada es 14-3-3 eta.

30 Además, la presencia de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada, o los niveles relativos de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada, como se determina mediante el uso de una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta puede ser un indicador pronóstico de artritis reumatoide en etapa temprana, antes de su progreso a una forma debilitante. Una ventaja del pronóstico o diagnóstico temprano es la implementación más temprana de un régimen de tratamiento.

35 Para determinar la presencia o ausencia de artritis reumatoide en un sujeto, el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, proteína 14-3-3 citrulinada en una muestra biológica del sujeto puede compararse, generalmente, a un nivel de autoanticuerpos/complejos inmunológicos que corresponden a un control normal. En una modalidad preferida, el control normal se establece a partir del nivel medio promedio de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, la proteína 14-3-3 citrulinada en muestras de pacientes sin artritis reumatoide. En una modalidad alternativa, el valor control normal puede determinarse mediante el uso de una Curva Operativa del Receptor, ver por ejemplo, el método de Sackett y otros, *ClinicalEpidemiology: A Basic ScienceforClinical Medicine*, Little Brown y Co., 1985, páginas 106-7. Brevemente, en esta modalidad, el valor control puede determinarse a partir de un gráfico de pares de tasas de verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) y tasas de falsos positivos (especificidad del 100 %) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado de la prueba de diagnóstico. El valor control en el gráfico que es el más cercano a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que encierra el área más grande) proporciona el valor más exacto, y una muestra que genera una señal que es superior al valor determinado por este método puede considerarse positiva. Alternativamente, el valor control puede desplazarse hacia la izquierda a lo largo del gráfico, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos. En general, una muestra que genera una señal que es superior al valor control determinado por este método se considera positiva para la artritis.

50 En una modalidad, la invención proporciona métodos para diferenciar entre subtipos de artritis. En una modalidad, los métodos implican determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta. En una modalidad preferida, el nivel de autoanticuerpos/complejos inmunológicos a la proteína 14-3-3 citrulinada en el paciente se compara con el de muestras de sujetos cuyo subtipo de artritis se conoce y o se establece previamente.

55 En una modalidad, la invención proporciona métodos para determinar el potencial de respuesta de un paciente al tratamiento dirigido contra la artritis reumatoide. En una modalidad, los métodos implican determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en una muestra de paciente. En una modalidad preferida, el nivel de autoanticuerpos a/complejos inmunológicos con la proteína 14-3-3 citrulinada en la muestra del paciente es en comparación con el de las muestras de los sujetos cuya  
60

capacidad para responder al tratamiento se conoce. Un nivel relativamente alto de autoanticuerpos a/complejos inmunológicos con proteína 14-3-3 citrulinada en una primera muestra de paciente en comparación con una muestra de un sujeto no inflamatorio y/o una muestra de otro paciente inflamatorio puede indicar que el primer paciente es un candidato preferido para un tratamiento bien conocido, p. ej., terapia con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) tales como anti-TNF, metotrexato, minociclina, hidroxicloroquina, sulfasalazina, azatriprina, anti-IL-1, anti-IL-6r y similares. Por el contrario, un nivel relativamente bajo de autoanticuerpos/complejos inmunológicos a proteína 14-3-3 citrulinada en una primera muestra de paciente en comparación con una muestra de otro paciente inflamatorio puede indicar que el primer paciente no es un candidato preferido para un tratamiento bien conocido, especialmente si el nivel se encuentra más próximo al de una muestra de un sujeto no inflamatorio.

Los regímenes de tratamiento para diversos tipos de artritis son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un paciente diagnosticado con artritis reumatoide puede prescribirse con medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) inicialmente, para aliviar el malestar y reducir la inflamación. Otros regímenes de tratamiento pueden incluir, por ejemplo, medicamentos antiinflamatorios esteroideos (SAID, por ejemplo Cortisol, prednisona), inhibidores específicos de la ciclooxigenasa 2 (CSI), glucocorticoides, y/o fármacos antirreumáticos estándar modificadores de la enfermedad (DMARD) tales como, p. ej., agentes neutralizantes anti-TNF-alfa (p. ej., ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida), antibióticos, antimaláricos y fármacos citotóxicos (p. ej., metotrexato, sulfasalazina, leflunomida). Los regímenes de tratamiento también pueden incluir ventajosamente aquellos que se dirigen directamente a las proteínas 14-3-3 citrulinadas, ver, p. ej., PCT/CA2008/002154. Los detalles de la dosificación o ejemplos de fármacos particulares serán conocidos por los expertos en la técnica, y pueden encontrarse en, por ejemplo Harrison's Principles of Internal Medicine 15ta edición. BRAUNWALD y otros ediciones. McGraw-Hill o "The Pharmacological basis of therapeutics", 10ma edición. 5 HARDMAN HG., LIMBIRD LE. editores. McGraw-Hill, New York, y en "Clinical Oncology", 3ra edición. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor.

En una modalidad, la invención proporciona métodos para controlar el tratamiento de la artritis reumatoide. En una modalidad, los métodos implican determinar el nivel de autoanticuerpos contra, o complejos inmunológicos con, al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta en muestras de pacientes y controlar el nivel de autoanticuerpos a/complejos inmunológicos con la proteína 14-3-3 citrulinada en un paciente que experimenta un tratamiento.

La presencia de niveles relativos de autoanticuerpos a/complejos inmunológicos con la proteína 14-3-3 citrulinada puede correlacionar con la presencia o niveles relativos de otras proteínas que se conoce que se asocian con afecciones artríticas en pacientes. Los ejemplos no limitantes de proteínas bien conocidas por asociarse con una afección artrítica incluyen citocinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral, y metaloproteinasas de matriz (MMP), tales como MMP-1 o MMP-3, etcétera. Se han identificado al menos 25 MMP diferentes. La detección de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada en conjunto con la detección de al menos una citocina inflamatoria y/o MMP en una muestra de paciente puede usarse para diagnosticar artritis. Además, la presencia o niveles relativos de autoanticuerpos/complejos inmunológicos a proteína 14-3-3 en conjunto con al menos una MMP y/o al menos una citocina inflamatoria en una muestra de paciente puede usarse como un indicador pronóstico de artritis en etapa temprana, antes de que la artritis progrese a una forma debilitante.

La invención proporciona estuches para evaluar una afección artrítica, y en particular, la artritis reumatoide. Tales estuches comprenden, típicamente, dos o más componentes necesarios para realizar un ensayo diagnóstico, pronóstico y/o teranóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, recipientes, instrucciones y/o equipamiento. Por ejemplo, un recipiente dentro de un estuche puede contener una o más proteína(s) 14-3-3 citrulinada(s) o fragmento(s) de esta(s). Tales estuches también pueden contener un reactivo de detección como se describió anteriormente que contiene un grupo reportero adecuado para la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo.

En consecuencia, la invención proporciona estuches para detectar la presencia de autoanticuerpos a/complejos inmunológicos con proteína 14-3-3 citrulinada y opcionalmente otros marcadores, p. ej., las MMP, en una muestra de paciente, el estuche que es útil para proporcionar un diagnóstico o pronóstico resulta adecuado para diagnosticar o diferenciar varias afecciones artríticas, y más preferentemente, artritis reumatoide. Las indicaciones adicionales en las que puede estar implicada la presencia de proteínas 14-3-3 citrulinadas y/o autoanticuerpos también incluyen, por ejemplo, trastornos cardiovasculares y/o neurodegenerativos. En un estuche de la invención, la proteína 14-3-3 eta citrulinada o fragmento de esta opcionalmente puede marcarse detectablemente, p. ej., con un marcador radioactivo, un marcador luminiscente, un marcador fluorescente, una enzima, etcétera. Los métodos para marcar detectablemente proteínas se conocen bien en la técnica. Tal estuche puede incluir, además, reactivos de detección específicos para otros marcadores de artritis, por ejemplo, anti-CCP, anti-RF, CRP, SAA, IL-6, S100, osteopontina, RF, MMP-I, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo óseo, cartilaginosa o sinovial (p. ej., CTX - I y CTX - II), etcétera. El estuche puede incluir, además, reactivos secundarios necesarios para la detección de autoanticuerpos a proteína 14-3-3 citrulinada inmunológicamente, tales como anticuerpos secundarios marcados (p. ej., anticuerpos anti-humanos), reactivos

cromogénicos o fluorogénicos, agentes de polimerización y similares. Las instrucciones para usar el estuche con propósitos de diagnóstico o de pronóstico, que incluyen estándares de comparación apropiados para cuantificar y/o evaluar el nivel de tales autoanticuerpos en el contexto de un estado de enfermedad particular, también pueden proporcionarse ventajosamente en forma impresa y/o registradas en medios adecuados.

#### 5 Ejemplos

A medida que la proteína 14-3-3 $\eta$  se libera en el espacio sinovial en RA donde las enzimas PAD están presentes, se investigó si la proteína 14-3-3 $\eta$  es un objetivo de citrulinación que puede usarse en el diagnóstico de RA, y en caso afirmativo, si la proteína 14-3-3 $\eta$  citrulinada o fragmentos podrían usarse para identificar pacientes con RA negativos a anti-CCP. La identificación de los sitios de citrulinación en la proteína 14-3-3 $\eta$  implicó un proceso de tres (3) etapas 1) predicción *in silico*, 2) determinación *in vitro* y 3) validación o identificación con muestras clínicas.

Ejemplo 1: Identificación *in silico* de sitios de citrulinación

15 Se identificaron porciones de arginina (R) que representan sitios de citrulinación putativos basado en 1) la localización de la "R" en relación con la configuración de proteína 3D nativa; 2) la accesibilidad de "R" a la enzima PAD y 3) la secuencia que flanquea "R". Se identificaron cinco (5) sitios de citrulinación putativos que corresponden a "R": 4, 12, 19, 61 y 227.

Ejemplo 2: Determinación *in vitro* de sitios de citrulinación

20 Se realizó la citrulinación *in vitro* mediante la que se coincubó la proteína 14-3-3 eta humana recombinante ya sea con PAD2 o con PAD4 humana recombinante ya que se ha informado que estas dos isoformas son las dos más relevantes en la RA.

25 Brevemente, PAD2 (MQ16.201) y PAD4 (MQ16.203) se obtuvieron de ModíQuest Research. Las enzimas se diluyeron adicionalmente en 100  $\mu$ l de amortiguador PAD (Tris HCl 0.1 M, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 10 mM con DTT 5 mM, PMSF 1 mM, 10  $\mu$ g/ml de aprotinina, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina y 10  $\mu$ g/ml de pepstatina) lo que lleva las concentraciones primarias de PAD2 a 80 mU/ $\mu$ l y de PAD4 a 82.5 mU/ $\mu$ l.

30 Se incubaron diez (10)  $\mu$ g de la proteína 14-3-3 eta recombinante en toda su extensión ya sea con PAD2 (8mU) como con PAD4 (8.2mU). La mezcla de reacción se ajustó a 100 $\mu$ l con amortiguador PAD y se incubó a 37 °C durante 2h. Después de la incubación, la reacción se terminó mediante la adición de 25  $\mu$ l de amortiguador Lammelli 4X. Las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se cortó la banda que corresponde a la proteína 14-3-3 eta. Las bandas cortadas se eluyeron del gel, se sometieron a tripsinización y después se analizaron mediante el uso de Espectrometría de Masas por Transformada de Fourier para identificar sitios deaminados como fue descrito por otros autores. Los resultados rindieron 35 cuatro sitios de citrulinación putativos con PAD2 y 3 con PAD4 cuyos resultados se describen en la Tabla 4.

Tabla 4: Sitios de citrulinación para la proteína 14-3-3 $\eta$  como se determinó *in vitro*

Sitio	Secuencia	No PAD	PAD2	PAD4
Posición 4	mgdReqlq	No	Sí	Sí
Posición 19	qaeRyddma	No	Sí	Sí
Posición 42	dRnllsvayk	No	Sí	Sí
Posición 61	sswRvissie	No	Sí	No

Ejemplo 3: Detección de anticuerpos dirigidos a proteína 14-3-3 eta citrulinada mediante el uso de muestras clínicas

50 La citrulinación *in vitro* se realizó como se describe en el Ejemplo 2, y se recubrieron placas de 96 pocillos ya sea con la forma citrulinada o con la no citrulinada de la proteína 14-3-3 eta recombinante. La respuesta del autoanticuerpo humano dirigido tanto a las formas nativas o citrulinadas de la proteína 14-3-3 eta en pacientes positivos y negativos a anti-CCP se cuantificó mediante el uso de un anticuerpo anti-humano. Para evaluar si estos nuevos autoanticuerpos son detectables en 55 pacientes con RA negativos a anti-CCP y se expresan diferencialmente en comparación con controles sanos, se midió la reactividad tanto para la proteína 14-3-3 eta no citrulinada y citrulinada en 30 pacientes con RA negativos a anti-CCP y 30 controles sanos negativos a anti-CCP confirmados. Se evaluaron los niveles medios y medianos de autoanticuerpos expresados en unidades (U) y se usaron las pruebas t y las pruebas U de Mann-Whitney correspondientes para determinar diferencias dentro y entre grupos. Se generó el área bajo la curva ROC (AUC) para los estimados de la utilidad diagnóstica y para determinar las tasas de verosimilitud (LR) de varios valores de corte de anti-14-3-3 eta citrulinada. 60

La Figura 1 muestra que, en comparación con la proteína 14-3-3 eta no citrulinada, se observó una reactividad superior a 25X a la proteína 14-3-3 eta citrulinada en 2 de los 3 pacientes con RA positivos a anti-CCP, lo que revela por primera vez la expresión de autoanticuerpos a la forma citrulinada de la proteína 14-3-3 eta en la RA. Dentro del grupo con RA negativo a anti-CCP, se observó una reactividad significativamente superior a la proteína 14-3-3 eta citrulinada en comparación con la proteína 14-3-3 eta nativa (1943U frente a 395U, p=0.01). No se observaron diferencias significativas en la reactividad dentro del grupo sano. La Figura 2 muestra que la expresión de anticuerpos anti-proteína 14-3-3 eta citrulinada fue significativamente superior en pacientes con RA negativos a anti-CCP con medias (SD) y medianas (mín-máx) de 1943U (3045U) y 306U (68-8982U) en comparación con 155U (122U) y 100U (45-564U) para controles sanos, p<0.002. La ROC (AUC) correspondiente para la expresión diferencial de anticuerpos anti-14-3-3 eta citrulinada en pacientes con RA negativos a anti-CCP en comparación con controles sanos fue 0.79 (CI del 95 %: 0.68-0.91; p<0.0001). A un nivel de corte de 320U, la especificidad y la sensibilidad fueron del 90 % y del 50 % lo que proporciona un LR positivo de 5 que aumenta a 14 a 439U con una especificidad correspondiente del 97 % y sensibilidad del 47 %.

	Sano N=58	Pacientes con RA CCP-ve N=30
media (SD)	155U (122U)	1943U (3045U)
mediana (mín-máx)	100U (45-564U)	306U (68.5982U)
AUC	<b>0.79</b>	
CI del 95 %	0.68-0.91	
Valor de p	<0.0001	
Nivel de corte	439U	
LR	14	
Especificidad	97 %	
Sensibilidad	47 %	

#### Ejemplo 4: Identificación de sitios de citrulinación mediante el uso de muestras clínicas

La proteína 14-3-3 eta se inmunoprecipita a partir de muestras clínicas positivas para la proteína 14-3-3 eta y la proteína inmunoprecipitada se resuelve mediante SDS-PAGE y se corta la banda correspondiente a la proteína 14-3-3 eta. Las bandas cortadas se eluyen del gel, se tripsinizan y se analizan después mediante Espectrometría de Masas por Transformada de Fourier para identificar sitios de citrulinación en la proteína.

#### Selección de sitios de citrulinación clínicamente relevantes de la proteína 14-3-3 eta

Para identificar los sitios de citrulinación más relevantes de la proteína 14-3-3 eta, se usan péptidos que portan una porción arginilada o citrulinada para tamizar y seleccionar los sitios de citrulinación más relevantes en la proteína 14-3-3 eta que pueden usarse para distinguir tanto la forma no citrulinada de la proteína así como también diferenciar entre los individuos sanos o los afectados con una artritis.

La comparación de los niveles de expresión de la proteína 14-3-3 eta en muestras clínicas mediante el uso de dos enfoques distintos, medición mediante MRM/LC-MS y ELISA, ilustra que las diferencias en la expresión pueden atribuirse a la citrulinación ya que la deiminación de arginina que rinde citrulina da lugar a una pérdida de escisión ya que la tripsina no escinde cuando la proteína se citrulina, ver la Tabla 5. Específicamente en las muestras 1 - 6 son detectables niveles altos de la proteína 14-3-3 eta mediante ELISA pero parecen tener niveles insignificantes cuando se miden mediante espectrometría de masas en comparación con las muestras 7 - 12. Con espectrometría de masas las muestras se tripsinizan y se cuantifican los niveles de la proteína 14-3-3 eta mediante la medición de una intensidad de pico como resultado de una masa peptídica específica, cuyo péptido es "AV TEL EPLS ED" que se encuentra junto a Arg-42 que se ha descrito aquí como un sitio de citrulinación. Los anticuerpos específicos a citrulinación a Arg-42 se examinarán mediante ELISA en las muestras 1 - 12 para verificar que Arg-42 es un sitio de citrulinación clínicamente relevante.

Tabla 5

ID de la muestra	Espectrometría de masas	ELISA
1	0	297.8
2	0	23.85
3	0	33.11
4	139	1078.1
5	0	65.85
6	0	18.7
7	5679	64.47
8	1283	29.07
9	9791	7.9
10	14278	47.7
11	1602	3.2
12	2451	31.3

25 Ejemplo 5: Diagnóstico, pronóstico y/o control del tratamiento

Detección de autoanticuerpos a la proteína 14-3-3 eta citrulinada en una muestra clínica

30 Los datos presentados en la figura 1 demuestran que la detección de autoanticuerpos a la forma citrulinada de la proteína 14-3-3 eta en toda su extensión es útil en la identificación de pacientes que son negativos a anti-CCP lo que complementa, por lo tanto, la prueba anti-CCP en el diagnóstico de pacientes con RA seronegativos. La expresión diferencial en RA frente a individuos sanos presentada en la figura 2 demuestra que los autoanticuerpos anti-14-3-3 eta citrulinada son superiores en pacientes con RA y probablemente serán altamente específicos para la RA. También se utilizarán fragmentos de 14-3-3 eta citrulinada, que abarcan cada uno de los diferentes sitios citrulinados para detectar autoanticuerpos para cada uno de los diferentes sitios. Tal detección de autoanticuerpos específicos de sitio es probable que sea como o más específica para RA que la proteína 14-3-3 eta citrulinada en toda su extensión.

Determinación del estado de citrulinación de una proteína 14-3-3 en una muestra clínica

40 Si un paciente mide positivo para autoanticuerpos a la proteína 14-3-3 eta citrulinada, se evaluará el estado de citrulinación de la proteína mediante el uso de anticuerpos monoclonales presentados contra la proteína 14-3-3 eta citrulinada en toda su extensión o fragmentos citrulinados de esta para evaluar dos parámetros:

- 1) ¿Cuánto de la proteína se citrulina?
- 2) ¿Qué sitios en la proteína se citrulinan y/o cuántos sitios se citrulinan?

45 Los títulos de los autoanticuerpos contra proteína 14-3-3 eta citrulinada se examinarán por sí mismos y en relación con los niveles de proteína sérica 14-3-3 eta así como también el estado de citrulinación de la proteína. La tabla 5 a continuación define los posibles resultados.

50

55

60

Tabla 5

5	niveles de autoanticuerpos anti-14-3-3 eta citrulinada	niveles de proteína 14-3-3 eta	Pronóstico
	Superior	Superior	Malo
		Inferior	Bueno
10	Inferior	Superior	Malo
		Inferior	Bueno o la proteína 14-3-3 eta no es importante para el proceso de la enfermedad

15 Para la respuesta y control de la terapia, niveles altos de autoanticuerpos anti-14-3-3 eta citrulinada pueden implicar el uso de ciertas terapias sobre otras. Además, se espera que un % superior de la proteína que se citrulina correlacione con una carga de la enfermedad más significativa. También se espera que diferentes sitios de citrulinación puedan impartir una actividad biológica diferente sobre la proteína y, por lo tanto, se asocien con diferentes resultados clínicos. Esta información puede usarse entonces para ayudar a determinar el tipo de terapia que sería mejor para un paciente en particular y para controlar la respuesta a la terapia.

20 Por ejemplo, títulos altos y/o un estado de citrulinación alto serían útiles para el tratamiento mediante el uso de inhibidores de células B como rituximab o inhibidores que se dirigen directamente a las peptidilargininadeiminasa. También puede ser útil controlar los resultados mediante la medición de los niveles antes y después del tratamiento. Por ejemplo, si los niveles disminuyen, entonces el paciente puede estar recibiendo un beneficio del fármaco, es decir, responder a la terapia mientras que si los niveles permanecen inalterados o aumentan, entonces puede ser necesario aumentar la dosis terapéutica o puede ser necesario cambiar la clase de terapia.

Listado de secuencias

<110>AugurexLifeSciences Corp.  
Marotta, Anthony

5

<120> Antígenos derivados de la proteína 14-3-3 citrulinada y usos de estos en el diagnóstico de la artritis reumatoide

<130> 177073/PCT

10

<150> US61/550,046

<151> 2011-21-10

<160> 22

15

<170>PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 246

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 638 331 T3

Met Thr Met Asp Lys Ser Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu  
 1 5 10 15  
 5 Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Ala Val Thr  
 20 25 30  
 10 Glu Gln Gly His Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val  
 35 40 45  
 15 Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile  
 50 55 60  
 20 Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met  
 65 70 75 80  
 25 Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Cys  
 85 90 95  
 30 Asn Asp Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Pro Asn Ala Thr  
 100 105 110  
 35 Gln Pro Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe  
 115 120 125  
 40 Arg Tyr Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Asn Lys Gln Thr Thr Val  
 130 135 140  
 45 Ser Asn Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys  
 145 150 155 160  
 50 Glu Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe  
 165 170 175  
 55 Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser  
 180 185 190  
 60 Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu  
 195 200 205  
 65 Asn Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg  
 210 215 220  
 70 Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Glu Asn Gln Gly Asp Glu Gly Asp  
 225 230 235 240  
 75 Ala Gly Glu Gly Glu Asn  
 245

ES 2 638 331 T3

<210> 2  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

<400> 2  
 Met Asp Lys Asn Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Cys Met Lys Ser Val Thr Glu Gln  
 20 25 30  
 Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr  
 35 40 45  
 Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Val Ser Ser  
 50 55 60  
 Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Ala Glu Lys Lys Gln Gln Met Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Thr Glu Leu Arg Asp Ile Cys Asn Asp  
 85 90 95  
 Val Leu Ser Leu Leu Glu Lys Phe Leu Ile Pro Asn Ala Ser Gln Ala  
 100 105 110  
 Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr Arg Tyr  
 115 120 125

ES 2 638 331 T3

Leu Ala Glu Val Ala Ala Gly Asp Asp Lys Lys Gly Ile Val Asp Gln  
 130 135 140

5 Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys Glu Met  
 145 150 155 160

10 Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val  
 165 170 175

Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser Leu Ala  
 180 185 190

15 Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Ser Glu  
 195 200 205

20 Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn  
 210 215 220

25 Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Thr Gln Gly Asp Glu Ala Glu Ala Gly  
 225 230 235 240

Glu Gly Gly Glu Asn  
 245

30  
 <210> 3  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35  
 <400> 3  
 Met Asp Asp Arg Glu Asp Leu Val Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Glu Gln  
 1 5 10 15

40 Ala Glu Arg Tyr Asp Glu Met Val Glu Ser Met Lys Lys Val Ala Gly  
 20 25 30

45 Met Asp Val Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala  
 35 40 45

50 Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Ser Trp Arg Ile Ile Ser  
 50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Asn Lys Gly Gly Glu Asp Lys Leu Lys  
 65 70 75 80

55 Met Ile Arg Glu Tyr Arg Gln Met Val Glu Thr Glu Leu Lys Leu Ile  
 85 90 95

60

ES 2 638 331 T3

Cys Cys Asp Ile Leu Asp Val Leu Asp Lys His Leu Ile Pro Ala Ala  
 100 105 110  
 5 Asn Thr Gly Glu Ser Lys Val Phe Tyr Tyr Lys Met Lys Gly Asp Tyr  
 115 120 125  
 10 His Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala  
 130 135 140  
 15 Ala Glu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Lys Ala Ala Ser Asp Ile Ala Met  
 145 150 155 160  
 20 Thr Glu Leu Pro Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn  
 165 170 175  
 25 Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Asp Arg Ala Cys  
 180 185 190  
 30 Arg Leu Ala Lys Ala Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr  
 195 200 205  
 35 Leu Ser Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu  
 210 215 220  
 40 Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Met Gln Gly Asp Gly Glu  
 225 230 235 240  
 45 Glu Gln Asn Lys Glu Ala Leu Gln Asp Val Glu Asp Glu Asn Gln  
 245 250 255  
 50 <210> 4  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 4  
 Met Val Asp Arg Glu Gln Leu Val Gln Lys Ala Arg Leu Ala Glu Gln  
 1 5 10 15  
 60 Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Asn Val Thr Glu  
 20 25 30  
 65 Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala  
 35 40 45  
 70 Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser  
 50 55 60

ES 2 638 331 T3

Ser Ile Glu Gln Lys Thr Ser Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Ile Glu  
 65 70 75 80  
 5 Met Val Arg Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Ala Val  
 85 90 95  
 10 Cys Gln Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys  
 100 105 110  
 15 Ser Glu Thr Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly  
 115 120 125  
 20 Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Glu Lys Arg Ala  
 130 135 140  
 25 Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser Glu Ala His Glu Ile  
 145 150 155 160  
 30 Ser Lys Glu His Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala  
 165 170 175  
 35 Leu Asn Tyr Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln  
 180 185 190  
 40 Ala Cys His Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu  
 195 200 205  
 45 Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln  
 210 215 220  
 50 Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Asp  
 225 230 235 240  
 55 Asp Gly Gly Glu Gly Asn Asn  
 245  
 <210> 5  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln  
 1 5 10 15  
 60 Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala Met Lys Ala Val Thr Glu  
 20 25 30

ES 2 638 331 T3

Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala  
 35 40 45  
 5 Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser  
 50 55 60  
 10 Ser Ile Glu Gln Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Leu Glu  
 65 70 75 80  
 15 Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Thr Val  
 85 90 95  
 20 Cys Asn Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys  
 100 105 110  
 25 Asn Asp Phe Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly  
 115 120 125  
 30 Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn  
 130 135 140  
 35 Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala Phe Glu Ile  
 145 150 155 160  
 40 Ser Lys Glu Gln Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala  
 165 170 175  
 45 Leu Asn Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln  
 180 185 190  
 50 Ala Cys Leu Leu Ala Lys Gln Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu  
 195 200 205  
 55 Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln  
 210 215 220

<210> 6  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 638 331 T3

1 Met Glu Lys Thr Glu Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala  
 5  
 5 Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Thr Cys Met Lys Ala Val Thr Glu Gln  
 20 25 30  
 10 Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr  
 35 40 45  
 15 Lys Asn Val Val Gly Gly Arg Arg Ser Ala Trp Arg Val Ile Ser Ser  
 50 55 60  
 20 Ile Glu Gln Lys Thr Asp Thr Ser Asp Lys Lys Leu Gln Leu Ile Lys  
 65 70 75 80  
 25 Asp Tyr Arg Glu Lys Val Glu Ser Glu Leu Arg Ser Ile Cys Thr Thr  
 85 90 95  
 30 Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Ala Asn Ala Thr Asn Pro  
 100 105 110  
 35 Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe Arg Tyr  
 115 120 125  
 40 Leu Ala Glu Val Ala Cys Gly Asp Asp Arg Lys Gln Thr Ile Asp Asn  
 130 135 140  
 45 Ser Gln Gly Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Asp Ile Ser Lys Lys Glu Met  
 145 150 155 160  
 50 Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val  
 165 170 175  
 55 Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Asn Pro Glu Leu Ala Cys Thr Leu Ala  
 180 185 190  
 60 Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu  
 195 200 205  
 65 Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn  
 210 215 220  
 70 Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Ser Ala Gly Glu Glu Cys Asp Ala Ala  
 225 230 235 240  
 75 Glu Gly Ala Glu Asn  
 245

ES 2 638 331 T3

<210> 7  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

<400> 7  
 Met Glu Arg Ala Ser Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Tyr Glu Asp Met Ala Ala Phe Met Lys Gly Ala Val Glu Lys  
 20 25 30  
 Gly Glu Glu Leu Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr  
 35 40 45  
 Lys Asn Val Val Gly Gly Gln Arg Ala Ala Trp Arg Val Leu Ser Ser  
 50 55 60  
 Ile Glu Gln Lys Ser Asn Glu Glu Gly Ser Glu Glu Lys Gly Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Val Arg Glu Tyr Arg Glu Lys Val Glu Thr Glu Leu Gln Gly Val Cys  
 85 90 95  
 Asp Thr Val Leu Gly Leu Leu Asp Ser His Leu Ile Lys Glu Ala Gly  
 100 105 110  
 Asp Ala Glu Ser Arg Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr  
 115 120 125  
 Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Asp Asp Lys Lys Arg Ile Ile  
 130 135 140  
 Asp Ser Ala Arg Ser Ala Tyr Gln Glu Ala Met Asp Ile Ser Lys Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Met Pro Pro Thr Asn Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe  
 165 170 175  
 Ser Val Phe His Tyr Glu Ile Ala Asn Ser Pro Glu Glu Ala Ile Ser  
 180 185 190  
 Leu Ala Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Met Ala Asp Leu His Thr Leu  
 195 200 205  
 Ser Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg  
 210 215 220

ES 2 638 331 T3

Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ala Asp Asn Ala Gly Glu Glu Gly Gly  
 225 230 235 240

5 Glu Ala Pro Gln Glu Pro Gln Ser  
 245

10 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 8  
 Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 9  
 Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg  
 1 5 10

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

25 <400> 10  
 Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

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

30 <400> 11  
 Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 12  
 Lys Ala Val Thr Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn  
 1 5 10 15

40 Leu Leu

55

ES 2 638 331 T3

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Gln Lys  
 20  
 10 <210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 14  
 Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile  
 1 5 10  
 20 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 15  
 Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Thr Ser  
 30 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223>Citrulina  
 <400> 16  
 40 Met Gly Asp Cys Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg  
 1 5 10  
 45 <210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

ES 2 638 331 T3

<222> (9)..(9)  
 <223>Citrulina

<400> 17

5 Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu  
 1 5 10 15

<210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)..(8)  
 <223>Citrulina

<400> 18

20 Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala  
 1 5 10 15

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223>Citrulina

<400> 19  
 Lys Ala Val Thr Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn  
 1 5 10 15

35 Leu Leu

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

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223>Citrulina

<400> 20  
 Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser Ser  
 1 5 10 15

50 Ile Glu Gln Lys  
 20

55

<210> 21  
<211> 13  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
10 <222> (10)..(10)  
<223>Citrulina

<400> 21

Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile  
1 5 10

<210> 22  
<211> 19  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
25 <223>Citrulina

<400> 22

Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu  
1 5 10 15

Trp Thr Ser

30

35

40

45

50

55

Reivindicaciones

- 5 1. Una proteína 14-3-3 eta citrulinada aislada o un fragmento de esta que son reconocidos de manera específica por autoanticuerpos anti-14-3-3 eta presentes en el suero de un paciente que padece de una afección artrítica; en donde la proteína 14-3-3 eta o fragmento de esta comprenden un residuo de citrulina en una posición seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5.
- 10 2. La proteína de conformidad con la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 16-22.
- 15 3. La proteína de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha afección artrítica es artritis reumatoide.
- 15 4. Una composición que comprende al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 unida a un soporte sólido.
- 20 5. Un estuche que comprende al menos una proteína 14-3-3 eta citrulinada de conformidad con la reivindicación 1.
- 20 6. Un método para diagnosticar una afección artrítica en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos una proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento citrulinado de esta en una condición adecuada para la formación de al menos un complejo inmunológico entre la proteína 14-3-3 citrulinada o un fragmento de esta y los autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta que pueden estar presentes en la muestra biológica; y detectar la presencia de los complejos inmunológicos entre la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta y los autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta, en donde dicha presencia de dichos complejos inmunológicos es indicativa de una afección artrítica en dicho sujeto.
- 25 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicha etapa de detección comprende además medir la cantidad de autoanticuerpos contra la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta.
- 30 8. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la proteína 14-3-3 citrulinada es 14-3-3 eta citrulinada.
- 30 9. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la proteína 14-3-3 citrulinada es un fragmento de 14-3-3 eta citrulinada.
- 35 10. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta se marca de manera detectable con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador luminiscente y un marcador fluorescente, y una enzima.
- 40 11. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la proteína 14-3-3 citrulinada o fragmento de esta se une a un soporte sólido.
- 40 12. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde los autoanticuerpos se detectan mediante un ensayo ELISA.
- 45 13. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicha detección se produce mediante quimioluminiscencia.
- 45 14. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde dicha afección artrítica es artritis reumatoide.
- 50 15. Un anticuerpo dirigido a la proteína 14-3-3 citrulinada de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se une selectivamente a una posición citrulinada seleccionada del grupo que consiste en la posición 4, la posición 12, la posición 19, la posición 42, la posición 61, la posición 86 y la posición 227 de la sec. con núm. de ident.: 5.
- 55 16. Un huésped no humano que produce un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15.
- 55 17. El huésped de conformidad con la reivindicación 16, en donde el huésped es una línea celular de hibridoma.
- 60 18. Un método para diagnosticar y/o pronosticar una afección artrítica en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con al menos un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a una proteína 14-3-3

humana citrulinada o un fragmento de esta en una condición adecuada para la formación de al menos un complejo inmunológico entre el anticuerpo y las proteínas 14-3-3 citrulinadas que pueden estar presentes en la muestra biológica; y detectar la presencia, el grado y/o la localización de al menos un residuo de citrulina dentro de dicha proteína 14-3-3 citrulinada, en donde dicha presencia, grado y/o localización de dicho al menos un residuo de citrulina es indicativo de una afección artrítica en dicho sujeto o informativo de un pronóstico para dicho sujeto.

5

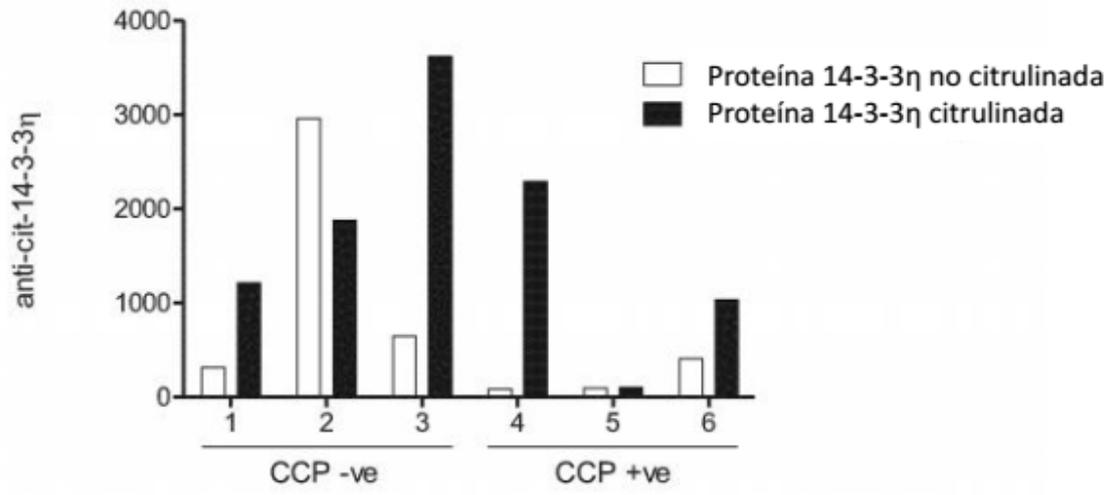


Figura 1

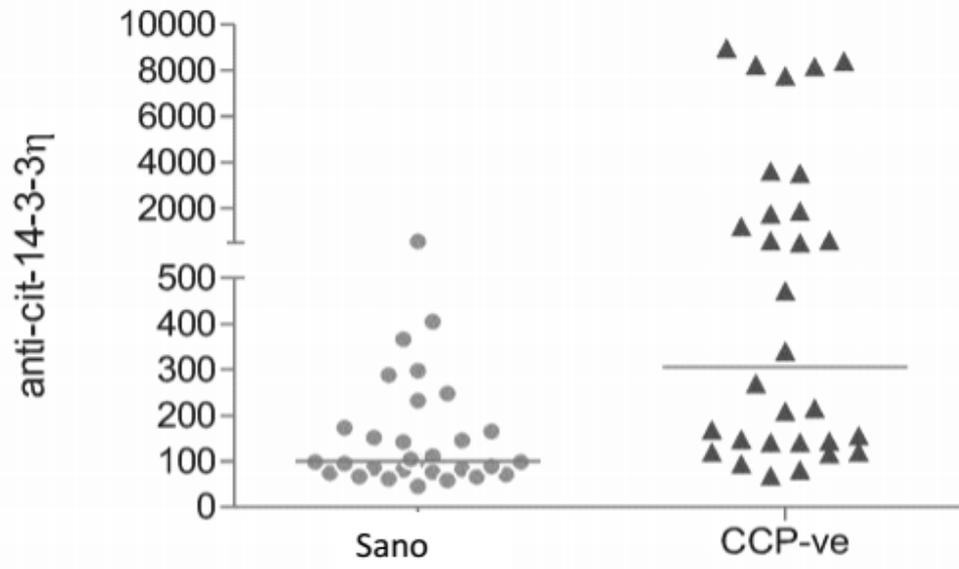


Figura 2