

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 353**

51 Int. Cl.:

C07K 14/43 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2009 PCT/EP2009/067840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09799354 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2367846**

54 Título: **Péptidos HnRNP A3 relacionados y uso del mismo para el diagnóstico de artritis reumatoide**

30 Prioridad:

23.12.2008 EP 08172809

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

21.12.2017

73 Titular/es:

**CHARITÉ UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
(100.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**SKRINER, KARL;
ADOLPH, KERSTIN y
HOLLIDT, JÖRG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 647 353 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).

Péptidos HnRNP A3 relacionados y uso del mismo para el diagnóstico de artritis reumatoide**Descripción****5 Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a nuevos péptidos relacionados hnRNP A3 que reaccionan con autoanticuerpos asociados con reumatismo, el uso de estos péptidos y un kit de diagnóstico que comprenden dichos péptidos. Además, esta invención se refiere a un método para detectar autoanticuerpos contra dichos péptidos.

10

Antecedentes de la invención

Las enfermedades reumáticas son algunas de las enfermedades más comunes en Alemania. Una prueba de diagnóstico que permite atribuir la condición médica de un paciente particular a la tensión muscular inofensiva, la artrosis o las más frecuentes y graves de dichas enfermedades, la artritis reumatoide (AR) no se conoce hasta la fecha.

15

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune en la que los mecanismos de defensa del cuerpo humano equivocadamente consideran cartílago endógeno de la articulación como extraño y hostil y atacan dicho cartílago. Aproximadamente 1 de cada 100 humanos en los países de Europa occidental sufren de artritis reumatoide. La enfermedad progresa muy rápidamente en los primeros meses.

20

Una estrategia clave importante en reumatología moderna, por tanto, es el inicio temprano del tratamiento, por ejemplo, con medicamentos que pueden modificar positivamente el curso de la enfermedad. Numerosos estudios clínicos han demostrado que se pueden conseguir muy buenos resultados terapéuticos y tasas de respuesta usando compuestos activos adecuados, por ejemplo antagonistas de TNF, si dichos compuestos se usan en pacientes que ya están en las primeras etapas de la enfermedad. Los reumatólogos intentan utilizar la ventana de tiempo estrecha entre el inicio de la enfermedad y la aparición de daño estructural articular. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha descrito en la técnica anterior ninguna detección fiable y sensible de artritis reumatoide dentro de dicha ventana temporal.

25

30

La artritis reumatoide se diagnostica de acuerdo con los criterios de clasificación del ACR (American College of Rheumatology). De acuerdo con los criterios de la ACR, el factor reumatoide es actualmente el indicador serológico fundamental para el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR). Los factores reumatoides son un subgrupo de inmunoglobulinas que se distinguen por la reacción inmunológica cruzada con la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Sin embargo, la presencia de un factor reumatoide no se limita a los trastornos de tipo reumático (por lo tanto, requiere una prueba diagnóstica diferencial), y también se encuentran factores reumatoides en el suero de pacientes que padecen enfermedades infecciosas, hiperglobulinemias, trastornos linfoproliferativos de células B, y generalmente en la población de mayor edad.

35

40

Por lo general, las concentraciones elevadas de factores reumatoides están asociadas con un curso más grave de la enfermedad. Dichas concentraciones no se correlacionan con el grado de actividad y el éxito terapéutico. Un pronóstico sensible y específico de la aparición de la artritis reumatoide no se puede hacer sobre la base de la concentración de factores reumatoides. Las personas sanas pueden tener una concentración elevada de factor reumatoide sin verse afectadas, mientras que algunos pacientes sin concentraciones elevadas de factor reumatoide sufren de una forma muy agresiva de artritis reumatoide.

45

Otros marcadores serológicos, tales como anticuerpos anti-citrulina (CCP) o la puntuación inicial HAQ que se utiliza para evaluar las capacidades de la vida diaria o de rayos X o tomografía computerizada (CT) de formación de imágenes proporcionan solamente poca información sobre la forma temprana y no son, por sí mismos, lo suficientemente significativos como para poder evaluar el pronóstico del paciente.

50

Con el fin de optimizar los criterios de clasificación existentes de la ACR, el Colegio Americano de Reumatología propone siete criterios de clasificación que indican un mal pronóstico:

55

1. rigidez matutina de las articulaciones que dura más de una hora,
2. artritis de tres o más articulaciones,
3. inflamación de al menos tres áreas articulares al mismo tiempo,
4. articulaciones de la mano o dedos también se ven afectadas,
5. sensibilidad bilateral de las articulaciones metacarpofalángicas a la presión,
6. erosiones en radiografías, y
7. detección de factores reumatoides especiales y positividad del factor anti-perinuclear (APF).

60

Los autoanticuerpos contra el "factor anti-perinuclear" fueron descritos por primera vez por Young et al. para pacientes que tienen artritis reumatoide (Young, B.J.J. et al., Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis, B.M.J., 2 (1979), 97-99). Debido a su reacción específica al epitelio queratinoso del estrato córneo en las secciones del

65

esófago de la rata, se ha considerado que la queratina es el antígeno correspondiente (Vincent, CH et al., High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called "antikeratin antibodies", Ann. Rheumat. Dis. 48 (1989), 712-722). Por esta razón, los anticuerpos son hoy en día conocidos como anticuerpos de antiqueratina (AKA) (Vincent, CH et al., Natural IgG to Epidermal Cytokeratins vs IgG to the Stratum Corneum of the Rat Oesophagus Epithelium, so-called "Antikeratin Antibodies", in Rheumatoid Arthritis and other Rheumatic Diseases; J. of Autoimmunity 4 (1991), 493 - 505; F'aimela, L. et al., Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid Arthritis, Ann. Rheumat. Dis., 51 (1992) 743 - 746).

Estudios posteriores han demostrado que al menos algunos sueros reactivos AKA o APF también exhiben actividad de anticuerpo anti-filagrina. Por lo tanto, la proteína básica filagrina se ha identificado como un antígeno diana. La proteína de 40 kDa agrega filamentos de citoqueratina y ayuda a formar la matriz de fibra intracelular de las células queratínicas (Simon, M. et al., The Cytokeratin Filament-Aggregating Protein Filaggrin is the Target of the So-called "Antikeratin Antibodies", Autoantibodies Specific for Rheumatoid Arthritis, J. Clin. Invest., 92 (1993), 1387 - 93).

Al reaccionar de la misma manera sueros que contienen APFs, AKAs y anticuerpos anti-filagrina, estos sistemas de anticuerpos parecen ser idénticos. Los anticuerpos anti-filagrina de tipo IgG que tienen una especificidad de más del 99% son marcadores altamente específicos para la artritis reumatoide. Varios estudios encontraron correlaciones positivas con respecto a la gravedad y la actividad de la enfermedad. Los anticuerpos anti-filagrina no se correlacionan con la edad, el sexo o la duración de la enfermedad.

El uso de métodos actualmente habituales, sin embargo, dichos anticuerpos se pueden encontrar en el suero de sólo aprox. 40% de los casos de AR.

Recientemente, se ha informado de que hnRNP A2 o ciertos epítomos de los mismos son adecuados para detectar los autoanticuerpos en el suero de pacientes con artritis reumatoide, véase por ejemplo Hayer Silvia et al. (Journal of Immunology, volumen 175, nº 12, 2005, páginas 8327 - 8336) y Steiner Gunter et al. (Zeitschrift fur Rheumatologie, volumen 6, nº 6, 2002, páginas 667 - 673).

Además, Sueleymanoglu E. informó de algunas de las características físico-químicas preliminares de plegamiento de ARN-proteína y los patrones de estabilidad de hnRNP A3 recién caracterizado con implicaciones funcionales adicionales en el desarrollo de estados autoinmunes humanos sistémicos (Progress in Biochemistry and Biophysic, vol. 31, no. 3, 2004, páginas 219-224).

Por lo tanto, fue el objeto de la presente invención proporcionar nuevos polipéptidos para detectar anticuerpos asociados con la artritis reumatoide, que permitan un diagnóstico mejorado de la AR.

Solución proporcionada por la invención

Este problema se resolvió mediante la presente invención proporcionando un péptido como se define en las reivindicaciones.

El péptido de la invención se refiere a un péptido como se define en la reivindicación 1 con una longitud de 10 a 20 residuos de aminoácidos, caracterizado porque el péptido

a) comprende al menos un residuo de citrulina, y

b) presenta una identidad de secuencia sobre toda la secuencia del péptido de $\geq 80\%$ en comparación con la SEQ ID N° 2,

en el que al menos un residuo de citrulina se encuentra en una posición en la secuencia del péptido de la invención correspondiente a un residuo de arginina en la secuencia respectiva de proteína humana hnRNP A3.

Se encontró sorprendentemente que tales péptidos de la invención se detectaron por autoanticuerpos a partir de fluidos corporales de un número notable de pacientes con AR, mientras que prácticamente ninguna reactividad específica fue encontrado con los fluidos corporales de los individuos con enfermedad reumática no AR, la osteoartritis o de voluntarios sanos (véase Tabla 1). Además, los péptidos de la invención revelan reactividad específica con fluidos corporales de pacientes con AR que han sido negativos en el ELISA anti CCP (véase la Tabla 2). En una comparación de un ELISA de péptidos de la invención y ELISA anti-CCP, se predijo AR con sensibilidad y especificidad mejoradas frente a ELISA anti-CCP solo (véase la Tabla 3). Sorprendentemente, los péptidos de la invención resultaron ser particularmente útiles en el diagnóstico de AR con un curso erosivo de la enfermedad (véase la Tabla 3). De este modo, el uso de los péptidos de la presente invención permite un diagnóstico mejorado de AR y contribuye adicionalmente al diagnóstico de AR sin la necesidad de un esquema de diagnóstico diferencial.

El péptido de la presente invención es un polímero formado mediante la vinculación de los residuos de aminoácidos entre sí mediante un enlace peptídico. Los péptidos según la invención pueden formarse a partir de

aminoácidos α -, β -, y γ -, y/o D- y L-. Los péptidos pueden comprender aminoácidos de origen natural, aminoácidos modificados naturales y/o aminoácidos sintéticos. Los péptidos de la invención pueden comprender aminoácidos que llevan una o más modificaciones en sus grupos laterales, término amino y/o extremo carboxilo. Dichos péptidos pueden modificarse para mostrar los grupos funcionales deseados, como por ejemplo, un radical alquilo, un grupo ácido carboxílico, un grupo amino y/o un grupo éster. Dicho péptido también puede ser un péptido cíclico. El experto conoce las técnicas adecuadas para fabricar péptidos cíclicos o péptidos modificados de otro modo.

El péptido de la invención tiene una longitud seleccionada de 20 a 10 aminoácidos, siendo preferible que el péptido tenga una longitud de 15 residuos de aminoácidos.

El péptido de la invención comprende al menos un residuo de aminoácido de citrulina. El péptido puede comprender más de un residuo de citrulina. El al menos un residuo de citrulina se encuentra en una posición en la secuencia del péptido de la invención correspondiente a un residuo de arginina en la secuencia correspondiente de la proteína humana hnRNP A3.

Se da a conocer un péptido que presenta una identidad de secuencia sobre toda la secuencia del péptido de $\geq 70\%$ en comparación con la proteína humana hnRNP A3 (ID SEC N° 1; SWISS PROT ID N° P51991). Preferiblemente, el péptido descrito exhibe una identidad de secuencia sobre toda la secuencia del péptido de $\geq 80\%$ en comparación con proteína humana hnRNP A3 (ID SEC N° 1), más preferiblemente de $\geq 90\%$, más preferiblemente de $\geq 95\%$. La identidad de secuencia puede determinarse usando el algoritmo BLASTP (disponible via <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El péptido de la invención puede abarcar uno o más aminoácidos que difieren del correspondiente motivo de secuencia de la SEQ ID N° 1. Uno o más de las siguientes diferencias de aminoácidos pueden estar presentes en los péptidos preferidos de la invención: 20 (R>H), 21 (R>W), 64 (V>L), 98 (E>T), 176 (C>R), 240 (G>D), 279 (G>S), 283 (Y<C), 359 (G<S); en el que los números dan la posición del aminoácido correspondiente con en la SEQ ID N° 1.

El péptido de la invención muestra una identidad de secuencia sobre toda la secuencia del péptido de $\geq 80\%$, más preferiblemente $\geq 90\%$, más preferiblemente $\geq 95\%$, en comparación con una secuencia seleccionada de aminoácidos No 227 (G) a 285 (S) de hnRNP A3, que se designa SEQ ID N° 2.

En una realización preferida adicional, el péptido de la invención tiene la secuencia de una de las secuencias con la SEQ ID N° 3, 5, 7, o 9 a 29.

En otra realización preferida, el péptido de la invención tiene la secuencia de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, o SEQ ID N° 9 y los péptidos con la SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 y SEQ ID N° 13, respectivamente, en donde los péptidos con SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 13 son péptidos cíclicos.

El péptido de la invención puede comprender además una entidad efectora acoplada covalentemente al péptido a través de una estructura de enlazador. Una entidad efectora en el sentido de la presente invención puede ser cualquier molécula que permita o facilite un uso específico del péptido. Las entidades efectoras preferidas, por ejemplo, permiten:

- inmovilización del péptido a un vehículo, como por ejemplo un compuesto polimérico, preferiblemente una molécula de poliestireno o poliestireno, un cordón, un cordón magnético, microesferas compatibles con la tecnología xMAP® de Luminax Corporation o similar, una etiqueta, preferiblemente una etiqueta His, biotina, estreptavidina, Ahx-biotina, etc.;
- detección del péptido in vitro y/o in vivo, como un cordón o microesfera compatible con la tecnología xMAP® de Luminax Corporation, un colorante fluorescente, un colorante radiactivo, un colorante compatible con otro colorante para dar un par de colorantes FRET, un colorante compatible con detección de CT o MR, o cualquier otro tinte detectable; y/o
- purificación del péptido, como por ejemplo, una etiqueta, preferiblemente una etiqueta His, biotina, estreptavidina, BSA, Ahx-biotina, etc.

El efector está acoplado de forma covalente al péptido de la invención a través de una estructura de enlazador. Dicha estructura enlazadora puede ser un enlace covalente o cualquier molécula adecuada para conectar el efector al péptido sin disminuir sustancialmente la funcionalidad del efector y el péptido. En una realización preferida, el conector es un ácido aminohexanoico de biotina (Ahx-biotina) acoplado al C- y/o N-terminal del péptido de la invención.

La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica un péptido de la invención. Los ejemplos de ácidos nucleicos adecuados son ADN y ARN, en particular ADNc. Dichos ácidos nucleicos se pueden clonar en vectores eucariotas o procariotas habituales y se pueden expresar en células hospedadoras adecuadas para la preparación recombinante del péptido de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para el diagnóstico de una enfermedad que comprende un péptido de acuerdo con la invención. En una realización preferida, el kit se usa para el diagnóstico de artritis reumatoide. El kit puede comprender un péptido de la invención con una única secuencia específica. Alternativamente, el kit puede comprender adicionalmente un segundo o más péptidos de acuerdo con la invención. Además, el kit puede comprender además un péptido CCP y/o MCV como se define en el documento WO 07/000320.

Además, el kit de diagnóstico puede comprender componentes habituales, tales como tampones, disolventes, un vehículo adecuado y/o grupos de marcación. Vehículos adecuados son macromoléculas tales como ADN, ARN, polímeros médicamente compatibles tales como, por ejemplo, polietileno, poli-D, L-láctidos, poli-D, L-láctido coglicólidos, biopolímeros sintéticos tales como, por ejemplo, polilisinas y dextranos y proteínas tales como, por ejemplo, albúmina sérica y hemocianina. Se prefiere el uso de dextranos en un "proceso de revestimiento por hidrocobertura" (Gregorius, K., Mouritsen, S. y Elsner, HI, Hydrocoating: a new method for coupling biomolecules to solid phases, J.Immunol. Methods 12 (1995), 65-73).

El péptido de la invención puede usarse para el diagnóstico de la artritis reumatoide, preferiblemente para el diagnóstico de la artritis reumatoide temprana. El péptido de la invención también se puede usar para distinguir un curso erosivo de la enfermedad de un curso no erosivo. En una realización de la invención, el péptido de la invención se usa para fabricar un medicamento para diagnosticar la artritis reumatoide.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la detección in vitro de anticuerpos contra un péptido de la invención que comprende las etapas:

- a) uso de un fluido corporal aislado y un péptido de acuerdo con la invención,
- b) poner en contacto el fluido corporal aislado y el péptido del paso a), y
- c) determinar si los anticuerpos del fluido corporal aislado están unidos al péptido.

Dicho método permite determinar la presencia y/o la concentración de autoanticuerpos contra el péptido de la invención en un fluido corporal dado y permite un diagnóstico a realizar y clasificación y/o evaluación de la gravedad de la enfermedad.

En el método de acuerdo con la invención, se utiliza el fluido corporal aislado. Los fluidos corporales preferidos son sangre, plasma, suero, líquido sinovial, orina, heces, líquido intersticial, líquido linfático, saliva, sudor, fluido espinal y/o fluido lagrimal, los preferidos son la sangre, el plasma, el suero, el líquido linfático y/o el líquido sinovial.

En el método de acuerdo con la invención, el fluido corporal aislado se pone en contacto con al menos un péptido de la invención. En otra realización del método, el fluido corporal aislado se pone en contacto con un segundo o más péptidos de la invención. En una realización preferida del método, el fluido corporal aislado se pone en contacto adicionalmente con un péptido CCP y/o MCV como se define en el documento WO 07/000320. En el método de la invención, la unión de anticuerpos del fluido corporal aislado a dos o más de los múltiples componentes nombrados anteriormente se determina simultáneamente en una muestra en forma de un sistema de ensayo múltiple.

Los métodos de detección que pueden utilizarse en el método de la invención comprenden cualquier habitual método en el campo del diagnóstico, como por ejemplo,

- a) métodos enzimológicos,
- b) métodos basados en una luminiscencia, o
- c) métodos radioquímicos.

Los métodos de detección adecuados preferidos en el proceso de la invención son un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo quimiluminiscencia, un ensayo de inmunotransferencia (por ejemplo, ensayos basados en transferencia Western) o un inmunoensayo enzimático, por ejemplo un ELISA, o un ensayo de flujo lateral o un ensayo de tira de ensayo.

De acuerdo con una realización del método de la invención, el fluido corporal a analizar se pone en contacto con un péptido de la invención unido a un vehículo. Después de la incubación de dicha muestra, los componentes no unidos se eliminan por lavado. Los autoanticuerpos unidos específicamente al péptido de la invención se detectan por medio de un aglutinante secundario que lleva un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquier resto que se pueda acoplar a un aglutinante secundario dado y que permita la detección de la presencia de dicho resto. Los ejemplos de restos detectables adecuados para el método de la invención comprenden una enzima tal como, por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina, un radiomarcador o un grupo de marcaje luminiscente tal como, por ejemplo, compuestos de acridinio.

Como aglutinante secundario, cualquier compuesto puede ser utilizado que permite la unión del aglutinante

secundario a los anticuerpos del fluido corporal unido específicamente a un péptido de la invención específico. El aglutinante secundario se puede unir directamente al anticuerpo del fluido corporal o puede ser específico para el complejo formado por el anticuerpo del fluido corporal unido al péptido de la invención. Ejemplos de aglutinantes secundarios adecuados para el método de la invención son anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, péptidos, ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos dirigidos y específicos para anticuerpos humanos tales como, por ejemplo, IgG, IgM, IgA y/e IgE, por ejemplo, la porción Fc de IgG humana.

De acuerdo con el método de la invención, la unión de un anticuerpo a partir del fluido corporal con el péptido de la invención puede ser determinado ya sea por aumento de la señal detectable. En este formato de ensayo, se usa un aglutinante secundario, que se une al anticuerpo del fluido corporal unido al péptido de la invención directamente o a un complejo formado por un anticuerpo unido a péptido o que detecta un cambio conformacional en el péptido de la invención al producirse la unión entre el anticuerpo del fluido corporal y el péptido de la invención.

Alternativamente, en un método de la invención, la unión de un anticuerpo a partir del fluido corporal con el péptido o la invención se puede determinar mediante la detección de una disminución de la señal. En este formato de ensayo, se usa un aglutinante secundario, que se une directamente al péptido de la invención y compite con un anticuerpo del fluido corporal para el mismo epítipo del péptido. Si la muestra de prueba contiene anticuerpo específico para el péptido de la invención, dicho anticuerpo compite con el aglutinante secundario por la unión al péptido. Se alcanza un equilibrio y, dependiendo de la cantidad de anticuerpo específico del fluido corporal presente en la muestra, se puede detectar una disminución más o menos pronunciada de la señal.

La presente invención se ilustra mediante las siguientes Figuras y ejemplos.

Figuras

Fig. 1 Reactividad de los péptidos de la invención con suero de pacientes con AR y voluntarios sanos en comparación con sus equivalentes no citrulinados.

Ejemplos

Ejemplo 1:

NeutrAvidin-Péptido-Anticuerpo-ELISA

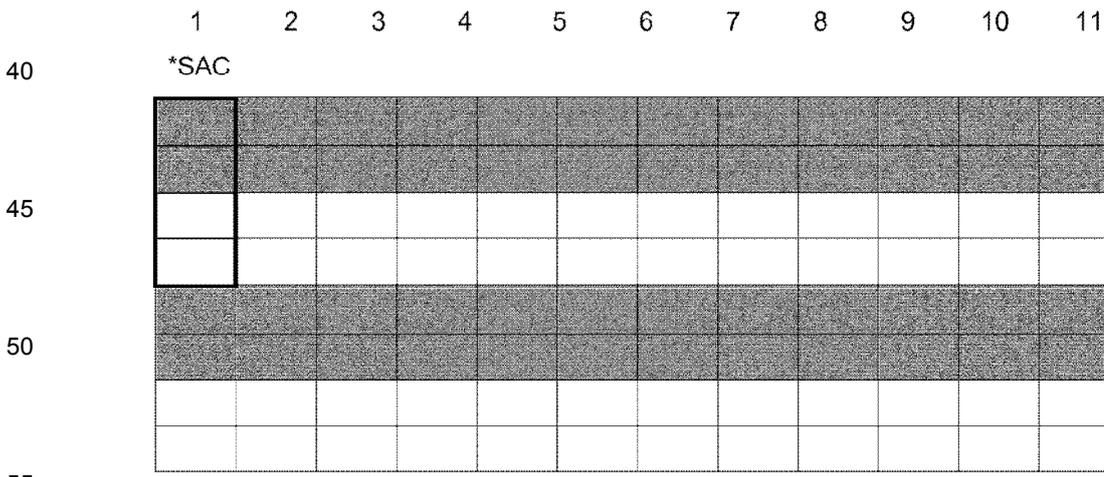
Para la detección de anticuerpos contra los péptidos de la invención, un inmunoensayo no competitivo de un solo sitio se utilizó con placas de microtitulación recubiertas-NeutrAvidin™ (Pierce, Rockford EE.UU.). El péptido fue sintetizado, biotinilado y liofilizado (Biotina-Ahx-HSXXXXXXXXXXXX-CONH₂). Primero, se produjo una reserva de péptido en agua destilada (concentración: 1 mg/ml).

1 µL de esta solución es suficiente para recubrir un pocillo (corresponde aproximadamente 500 pmol de péptido por pocillo) en un volumen total de 120 µL de tampón de bloqueo libre de proteína (Pierce, Rockford EE.UU.). Las placas revestidas se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente (600 rpm) y se incubaron durante la noche a 4°C. Los siguientes pasos de trabajo del procedimiento de prueba se enumeran en la tabla a continuación (todos los pasos a temperatura ambiente).

ES 2 647 353 T3

paso de trabajo	tampón/material	volumen pocillo	por	incubaciones/condiciones
lavado	PBS + 0,1% Tween20	300 µL		una vez por 1 minuto, 600 rpm
bloqueo	PBS + leche en polvo al 5%	140 µL		1 Stunde, 600 rpm
lavado	PBS + 0,1% Tween20	300 µL		3 veces, cada caso 1 minuto, 600 rpm
incubación con anticuerpo primario	suero diluido 1:200 en PBS + leche en polvo al 5%	120 µL		1 hora, 450 rpm
lavado	PBS + 0,1% Tween20	300 µL		3 veces, cada caso 1 minuto, 600 rpm
incubación con anticuerpo secundario	diluir anticuerpo-conjugado etiquetado con enzima en PBS + 5% de leche en polvo (α-humana IgG-HRP, 1:5.000)	120 µL		30 min, 600 rpm
lavado	PBS + 0,1% de Tween20	300 µL		4 veces, cada caso 1 minuto, 600 rpm
desarrollo del color	Sustrato TMB (BlauFast)	100 µL		espera 5 minutos
detenimiento del desarrollo	0,5 M de ácido sulfúrico	100 µL		-
medida a 450 nm	Lector ELISA	-		-
(Ref: 620 nm)				

Aquí es un esquema de la placa. Los pocillos negros están recubiertos con péptido en tampón de bloqueo libre de proteínas y los pocillos blancos son los controles de suero. Para cada suero en doble determinación se necesitan cuatro pocillos (marco negro).



*SAC-control secundario de anticuerpo

Con los valores en bruto de DO de cada muestra (suero y el control de suero correspondiente) en cada caso que se genera el valor mediano. Al restar SAC y en blanco se obtienen los valores netos. Entonces se calcula la diferencia de los dos valores netos.

A partir del análisis estadístico de controles sanos, se deriva el valor de corte específico del péptido. Para la evaluación positiva/negativa, el nivel doble de corte se utiliza para reducir los sueros de falsos positivos (especificidad alta).

Ejemplo 2:

El propósito de este experimento consistió en determinar si los péptidos de la invención pueden usarse para diagnosticar específicamente AR.

Los sueros (véase la tabla) de pacientes con AR, SLE, MCTD, esclerosis sistémica, poli/dermatomiositis, síndrome de Sjögren primario, artritis reactiva, y la osteoartritis y controles sanos se investigaron. Los sueros fueron tomados del banco de suero local y fueron derivados de pacientes clínicamente y serológicamente bien definidos. Todos los pacientes con AR cumplieron los criterios revisados de 1987 del Colegio Americano de Reumatología; todos los pacientes con LES obtuvieron los criterios de 1982 del Colegio Estadounidense de Reumatología, y todos los pacientes con MCTD cumplieron con los criterios de Alarcon-Segovia et al. Para los estudios con artritis temprana, se seleccionaron 54 sueros de pacientes con una autorreactividad comercial CCP2 ELISA. Los anticuerpos anti-CCP se midieron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (de segunda generación) (ELISA, Axis Shields Diagnostics) y se consideraron positivos en un valor de corte >5 unidades arbitrarias según lo sugerido por el fabricante.

Como se muestra en la Figura 1, los péptidos z2 (SEQ ID N° 3), z4 (SEQ ID N° 5), z8 (SEQ ID N° 7) y cz8 (SEQ ID N° 9) muestran la reactividad con suero de un alto número de pacientes con AR, mientras que los que no contienen citrulina no mostraron una reactividad significativa con el suero de pacientes con AR. Los péptidos z2, z4, z8 y cz8 no mostraron reactividad significativa con el suero de controles sanos.

Como se muestra en la Tabla 1, los péptidos de la invención son capaces de detectar específicamente el suero de pacientes con AR y no revelan reactividad cruzada significativa con suero de otros pacientes negativos para AR.

Tabla 1. Los resultados positivos de ELISA se presentan acumulados para los péptidos Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7)

Diagnóstico	n	Positivo (n)	Porcentaje
AR temprana	54	24	44%
Artritis reumatoide	29	22	76%
Enfermedad de tejido conectivo mezclado	20	0	0%
Síndrome de Sjögren primario	21	0	0%
Poli/dermatomiositis	10	0	0%
Esclerodermia	24	0	0%
SLE	20	0	0%
Artritis reactiva	22	0	0%
Osteoartritis	26	1	4%
Controles sanos	24	1	4%

Mientras tanto, el número total de individuos con AR temprana que han sido probados se ha ampliado 54 a 92, mientras que el porcentaje de positivos sigue siendo el mismo.

Ejemplo 3:

Los objetivos específicos de este estudio fueron (i) para determinar la frecuencia de Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7) en artritis temprana y positividad en artritis erosiva en pacientes con AR muy temprana; (ii) comparar la reactividad de Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7) y CCP2 de pacientes diagnosticados con AR temprana que progresaron a desarrollar erosiones para vincular la progresión radiológica y las variables serológicas, y así determinar posibles factores pronósticos para el desarrollo de enfermedad erosiva. Además, se ensayó el líquido sinovial de pacientes con AR.

Las pruebas de ELISA se realizaron como se describió anteriormente.

Como se muestra en la Tabla 2, los péptidos Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7) son capaces de detectar AR temprana con una sensibilidad significativa y pueden identificar AR temprana que no fue detectada por CCP2 ELISA.

Tabla 2. Los resultados positivos de ELISA se dan en % de sueros ensayados para cada péptido Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7)

		Suero de AR temprana (n = 54)	Pacientes de AR sinovial (74)
5	Z1	GNFMGZGGNFGGGGG	17% 66% Cit ELISA
		negativo	28%
10	Z2	GGGGGNFGZGGNFGG	17%/100% Cit ELISA negativo
	Z3	GNFGGZGGYGGGGGG	8%/100% Cit ELISA negativo
15	Z4	GYGGGGGGSZGSYGG	25%/40% Cit ELISA negativo
	Z8	NFGZDGNFGGZGGYG	32% 90% Cit ELISA negativo
			28%

20 Tal como se resume en la Tabla 3, los péptidos Z1 (SEQ ID N° 14), Z2 (SEQ ID N° 3), Z3 (SEQ ID N° 15), Z4 (SEQ ID N° 5), Z8 (SEQ ID N° 7) se pueden usar para distinguir la AR con una progresión erosiva de la enfermedad no erosiva con una sensibilidad y precisión significativas.

25 Tabla 3. Enfermedad erosiva versus enfermedad no erosiva, los resultados de ELISA se dan para cada péptido dado

	Erosivo n = 36	No erosivo n = 30	P (Cuadrado de Pearson Chi)	PPV%	
30	RF50	21	6	p = 0.002	78
	Anti-CCP	22	3	p<0.001	88
	Anti-RA33	11	7	p =Ns	61
	acumulado para péptidos Z1, Z2, Z3, Z4 y Z8	31	4	p<0.001	91

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110>Universitätsklinikum Charite

40 <120>Nuevos péptidos relacionados con hnRNP A3 y su uso para el diagnóstico de la artritis reumatoide

<130>P576508PCT

<160>29

45 <170>PatentIn versión 3.3

<210>1

<211>378

50 <212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

55

60

65

ES 2 647 353 T3

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

ES 2 647 353 T3

				180					185					190			
5	Gly	His	Asn	Cys	Glu	Val	Lys	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Met	Gln	
			195					200					205				
10	Ser	Ala	Gly	Ser	Gln	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Phe	Met	
		210					215					220					
15	Gly	Arg	Gly	Gly	Asn	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Phe	Gly	Arg	Gly	
	225					230						235				240	
20	Gly	Asn	Phe	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
					245					250						255	
25	Arg	Gly	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Gly	Tyr	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	
				260					265					270			
30	Asp	Gly	Gly	Asn	Tyr	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Tyr	Ser	Ser	Arg	Gly	Gly	
			275					280					285				
35	Tyr	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Tyr	Gly	Asn	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	
	290						295					300					
40	Gly	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asn	Glu	Gly	Gly	Asn	Phe	Gly	Gly	
	305					310						315				320	
45	Gly	Asn	Tyr	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Tyr	Asn	Asp	Phe	Gly	Asn	Tyr	Ser	
					325					330					335		
50	Gly	Gln	Gln	Gln	Ser	Asn	Tyr	Gly	Pro	Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Phe	Gly	
				340					345					350			
55	Gly	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	
			355					360					365				
60	Gly	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ser	Arg	Arg	Phe							
		370					375										
65	<210>2																
	<211>59																

ES 2 647 353 T3

<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>2

5

Gly Gly Asn Phe Gly Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn
1 5 10 15

10

Phe Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gly
20 25 30

15

Ser Tyr Gly Gly Gly Asp Gly Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Gly Asp Gly
35 40 45

20

Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Pro Gly Tyr Ser Ser
50 55

25 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223>péptido artificial

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (9)..(9)
<223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>3

40

Gly Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Xaa Gly Gly Asn Phe Gly Gly
1 5 10 15

45 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223>péptido artificial

<400>4

55

Gly Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn Phe Gly Gly
1 5 10 15

60 <210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

65 <220>
<223>péptido artificial

ES 2 647 353 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10).. (10)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 5
 <400>5

 Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Ser Tyr Gly Gly
 10 1 5 10 15

 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15

 <220>
 <223>péptido artificial
 20
 <400>6

 Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Gly Gly
 25 1 5 10 15

 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30

 <220>
 <223>péptido artificial
 35

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11).. (11)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 45
 <400>7

 Asn Phe Gly Xaa Asp Gly Asn Phe Gly Gly Xaa Gly Gly Tyr Gly
 50 1 5 10 15

 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223>péptido artificial
 60
 <400>8

 Asn Phe Gly Arg Asp Gly Asn Phe Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly
 65 1 5 10 15

 <210> 9

ES 2 647 353 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223>péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12).. (12)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>9

20 Cys Asn Phe Gly Xaa Asp Gly Asn Phe Gly Gly Xaa Gly Gly Tyr Gly
 1 5 10 15

25 Cys

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223>péptido artificial

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7).. (7)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

40 <400>10

Gly Gly Phe Asn Gly Gly Xaa Gly Phe Asn Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

45

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223>péptido artificial

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

60 <400>11

Gly Gly Tyr Ser Gly Xaa Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly
 1 5 10 15

65 <210> 12

ES 2 647 353 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223>péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (12).. (12)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>12

20

	Gly	Tyr	Gly	Gly	Xaa	Gly	Gly	Phe	Asn	Gly	Asp	Xaa	Gly	Phe	Asn
	1				5					10					15

25 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223>péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (13).. (13)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>13

45

	Cys	Gly	Tyr	Gly	Gly	Xaa	Gly	Gly	Phe	Asn	Gly	Asp	Xaa	Gly	Phe	Asn
	1				5					10					15	

50 Cys

<210> 14
 <211> 15
 55 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223>péptido artificial

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

65 <400>14

ES 2 647 353 T3

Gly Asn Phe Met Gly Xaa Gly Gly Asn Phe Gly Gly Gly Gly Gly
 5
 1 5 10 15
 <210> 15
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223>péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6).. (6)
 20 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <400>15
 25 Gly Asn Phe Gly Gly Xaa Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 16
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223>péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10).. (10)
 40 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 <400>16
 45 Gly Gly Gly Gly Gly Phe Asn Gly Gly Xaa Gly Met Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 <210> 17
 50 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223>péptido artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10).. (10)
 60 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <400>17
 65 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Xaa Gly Gly Phe Asn Gly
 1 5 10 15

ES 2 647 353 T3

<210> 18
 <211> dieciséis
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223>péptido artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <400>18
 20
 Cys Asp Ser Gly Xaa Arg Arg Xaa His Trp Gly Glu Glu Gly His Cys
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223>péptido artificial
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (8).. (8)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <400>19
 50
 Ser Ala Gly Ser Xaa Xaa Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Asn Phe
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223>péptido artificial
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (4).. (4)

ES 2 647 353 T3

<223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (14).. (14)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>20

10 Gly Tyr Asn Xaa Phe Gly Gly Asp Gly Gly Asn Tyr Gly Xaa Ser
 1 5 10 15

15 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223>péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (12).. (12)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>21

35 Gly Gly Tyr Asn Xaa Phe Gly Gly Asp Gly Gly Xaa Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

40 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223>péptido artificial

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (9).. (9)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (14).. (14)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina

<400>22

65 Ser Xaa Gly Ser Tyr Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Tyr Asn Xaa Phe
 1 5 10 15

ES 2 647 353 T3

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223>péptido artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 20 <221>características_misc
 <222>(12).. (12)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 <400>23
 25
 Ala Met Xaa Ala Xaa Pro Phe Lys Val Asp Gly Xaa Val Val Glu
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> dieciséis
 <212>PRT
 <213>Artificial
 35 <220>
 <223>Péptido artificial
 <220>
 <221>características_misc
 40 <222>(9).. (9)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 <220>
 <221>características_misc
 45 <222>(12).. (12)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 <400>24
 50
 Cys His Gly Glu Glu Gly Trp His Xaa Arg Arg Xaa Gly Ser Asp Cys
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212>PRT
 <213>Artificial
 60 <220>
 <223>Péptido artificial
 <220>
 <221>características_misc
 65 <222>(8).. (8)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

ES 2 647 353 T3

<220>
 <221>características_misc
 <222>(10).. (10)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 5
 <220>
 <221>características_misc
 <222>(11).. (11)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 10
 <400>25

 Phe Asn Gly Ser Gly Gly Gly Xaa Gly Xaa Xaa Ser Gly Ala Ser
 15 1 5 10 15

 <210> 26
 <211> 15
 <212>PRT
 <213>Artificial
 20
 <220>
 <223>Péptido artificial
 25
 <220>
 <221>características_misc
 <222>(2).. (2)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 30
 <220>
 <221>características_misc
 <222>(12).. (12)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 35
 <400>26

 Ser Xaa Gly Tyr Asn Gly Gly Asp Gly Gly Phe Xaa Asn Tyr Gly
 40 1 5 10 15

 <210> 27
 <211> 15
 <212>PRT
 <213>Artificial
 45
 <220>
 <223>Péptido artificial
 50
 <220>
 <221>características_misc
 <222>(4).. (4)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 55
 <220>
 <221>características_misc
 <222>(11).. (11)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina
 60
 <400>27

 Ser Gly Tyr Xaa Gly Gly Asp Gly Gly Phe Xaa Asn Tyr Gly Gly
 65 1 5 10 15

 <210> 28

ES 2 647 353 T3

<211> 15
 <212>PRT
 <213>Artificial

5 <220>
 <223>Péptido artificial

<220>
 <221>características_misc
 10 <222>(2).. (2)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221>características_misc
 15 <222>(7).. (7)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221>características_misc
 20 <222>(14).. (14)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<400>28

25

	Phe	Xaa	Asn	Tyr	Gly	Gly	Xaa	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ser	Gly	Xaa	Ser
	1				5					10					15

30 <210> 29
 <211> 15
 <212>PRT
 <213>Artificial

35 <220>
 <223>Péptido artificial

<220>
 <221>características_misc
 40 <222>(4).. (4)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221>características_misc
 45 <222>(11).. (11)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<220>
 <221>características_misc
 50 <222>(13).. (13)
 <223>Xaa es un residuo de citrulina

<400>29

55

	Glu	Val	Val	Xaa	Gly	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Xaa	Ala	Xaa	Met	Ala
	1				5					10					15

60

65

Reivindicaciones

- 5
1. Péptido para uso en el diagnóstico de la artritis reumatoide in vitro con una longitud de 10 a 20 residuos de aminoácidos, **caracterizado porque** el péptido
- a) comprende al menos un residuo de citrulina, y
- b) presenta una identidad de secuencia sobre toda la secuencia del péptido de $\geq 80\%$ en comparación con la SEQ ID N° 2;
- 10 en el que al menos un residuo de citrulina se encuentra en una posición en la secuencia del péptido correspondiente a un residuo de arginina en la secuencia de la proteína humana hnRNP A3.
- 15 2. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido tiene la secuencia de SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, o SEQ ID N° 9 y los péptidos retro del mismo tienen la secuencia de SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 y SEQ ID N° 13, respectivamente.
3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido es cíclico.
- 20 4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una entidad efectora acoplada covalentemente al péptido a través de una estructura de enlazador.
5. Kit para el diagnóstico de una enfermedad que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Kit según la reivindicación 5, que comprende además un segundo o más péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 7. Método de detección in vitro de anticuerpos contra un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende las etapas:
- a) uso de un fluido corporal aislado y un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- b) poner en contacto fluido corporal aislado y el péptido de la etapa a), y
- c) determinar, si los anticuerpos de fluido corporal aislado están enlazados a péptido.
- 35 8. Método de la reivindicación 7, en el que el fluido corporal es sangre, plasma, suero, fluido sinovial, orina, heces, fluido intersticial, fluido linfático, saliva, sudor, fluido espinal, y/o fluido lacrimal.
- 40 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el fluido corporal aislado se pone en contacto con un segundo o más péptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en unión de los anticuerpos del fluido corporal aislado a péptido se determina por radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de inmunotransferencia, o un inmunoensayo de enzima.
- 50
- 55
- 60
- 65

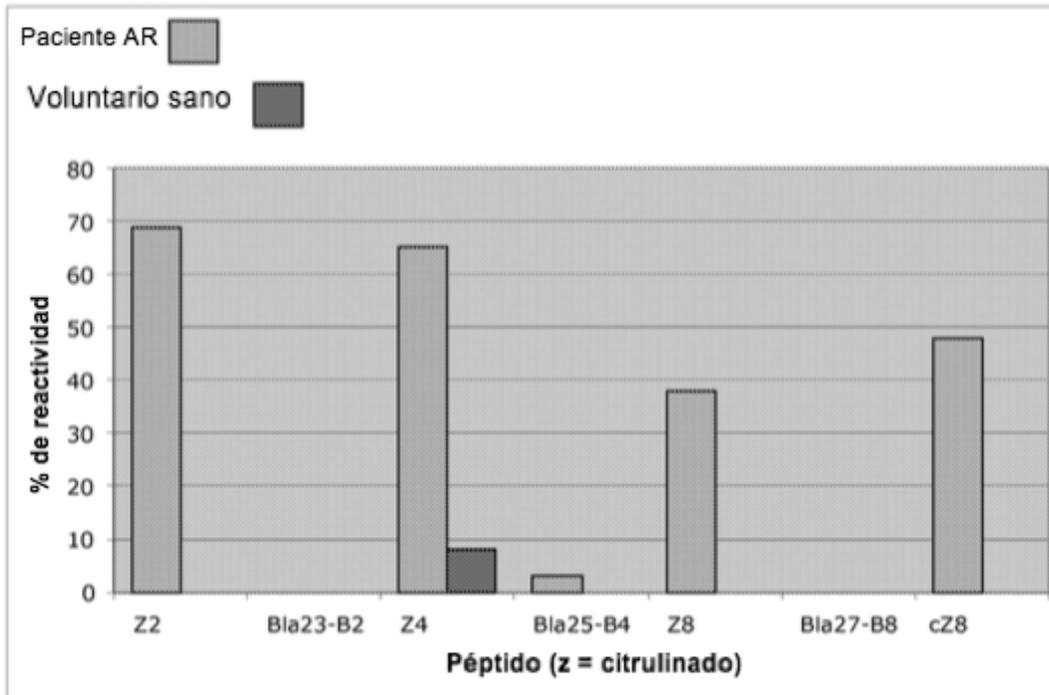


Fig. 1