

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 393**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2015 PCT/EP2015/058738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2015 E 15720008 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 3140323**

54 Título: **Método para el diagnóstico serológico de la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

05.05.2014 EP 14166985

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

29.06.2018

73 Titular/es:

**NOVIO TH B.V. (100.0%)
Weezenhof 8049
6536 CL Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

SALDEN, MARTINUS HUBERTUS LEONARDUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 674 393 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

Método para el diagnóstico serológico de la artritis reumatoide

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dentro del campo de los métodos diagnósticos. Proporciona un nuevo anticuerpo marcador para la artritis reumatoide así como un nuevo método para detectar la artritis reumatoide. También proporciona medios y métodos para predecir si un sujeto desarrollará artritis reumatoide. La invención se basa en el descubrimiento de que los pacientes con artritis reumatoide tienen anticuerpos en su circulación que reaccionan específicamente con anticuerpos citrulinados.

15 **Antecedentes de la invención**

La prueba diagnóstica serológica es de importancia creciente en la detección y la diferenciación tempranas de la artritis reumatoide (RA). Aparte de la detección tradicional del factor reumatoide, nuevos autoanticuerpos específicos para antígenos citrulinados han realizado una contribución crucial al diagnóstico de la RA [26].

15 El factor reumatoide es un autoanticuerpo, que puede ser IgM, IgG o IgA, y que se mencionó en primer lugar en 1922 [1]. Reconoce los dominios CH2 y CH3 del segmento Fc de IgG humana y es un componente de los criterios de clasificación para la RA publicados por the American College of Rheumatology [2].

20 El factor reumatoide (RF) se puede determinar mediante diversos métodos de prueba; el ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas) y la nefelometría son métodos estandarizados. La especificidad media de la detección de RF es aproximadamente 79%, con una sensibilidad de aproximadamente 60% [3]. En los últimos años, se han detectado y caracterizado nuevos autoanticuerpos en los sueros de pacientes con RA. Estos exhiben una especificidad superior y por lo tanto pueden ayudar a mejorar la prueba diagnóstica serológica.

25 Uno de los descubrimientos serológicos más importantes en la reumatología en los últimos años ha sido la caracterización de autoanticuerpos dirigidos contra filagrina citrulinada [4]. El punto de partida para este descubrimiento era la identificación del antígeno diana para anticuerpos antiqueratínicos (AKA). Estos se describieron en primer lugar en 1979 y son muy específicos para RA [4].

30 El antígeno diana filagrina solo se expresa en células epiteliales y no en las articulaciones u otros órganos, por lo tanto, la significación patológica de este hallazgo inicialmente no estaba clara. Schellekens y cols. [6] mostraron que solamente las formas citrulinadas de filagrina eran reconocidas por AKA

35 La filagrina se puede citrulinar mediante la desaminación enzimática de residuos de arginina, para dar residuos de citrulina. La citrulinación es una modificación postraduccional, que altera la carga de una proteína, conduciendo a cambios en su estructura tridimensional, que a su vez dan como resultado cambios en las propiedades antigénicas [7]. La citrulinación tiene un papel fisiológico y bioquímico esencial en la diferenciación celular y en la muerte celular programada (apoptosis).

40 Los ELISAs de primera generación para la detección de anti-filagrina citrulinada mostraban una especificidad para RA de aproximadamente 85%, con una sensibilidad de 65% a 70%. Los ELISAs de segunda generación usaban péptidos sintéticos como antígeno, con una estructura anular debida a la formación de puentes de disulfuro intramoleculares. El uso de estos péptidos citrulinados cíclicos (CCP) ha mejorado la especificidad hasta entre 96% y 98%, sin cambiar la sensibilidad [8].

Varios estudios han mostrado que los anticuerpos anti-CCP no solo son altamente específicos, sino que también de alto valor predictivo para un curso erosivo de la enfermedad y así son de valor como pronóstico [9].

50 Estudios con derivados peptídicos citrulinados de fibrina y fibrinógeno han mostrado una reacción cruzada entre filagrina y fibrina citrulinada [12]. Algunas publicaciones han encontrado alta especificidad y sensibilidad diagnósticas para la detección de anticuerpos anti-fibrinógeno citrulinado en pacientes con RA [13]. Con ELISA, la sensibilidad para RA era aproximadamente 75%, con una especificidad de 98%.

55 Otro autoantígeno citrulinado interesante es la forma citrulinada de alfa-enolasa, una enzima que representa un papel en la glucólisis [15]. La alfa-enolasa citrulinada se ha detectado - junto con otros antígenos citrulinados - en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [16].

60 La vimentina citrulinada se ha descrito como un importante autoantígeno expresado en tejido sinovial. Posteriormente, se aclaró que la vimentina citrulinada es idéntica al antígeno previamente conocido Sa, que

representa Savoie, el nombre del paciente en el que se identificó en primer lugar la respuesta de anticuerpo respectiva. Los anticuerpos anti-Sa proporcionan una alta especificidad de >98%, pero una sensibilidad limitada de 22% a 40% para pacientes con artritis reumatoide [17].

5 Un ELISA basado en vimentina citrulinada mutada (MCV) ha estado disponible comercialmente para el diagnóstico de la artritis reumatoide durante algún tiempo y tiene aproximadamente la misma sensibilidad y especificidad diagnóstica que anticuerpos anti-CCP [18, 19, 20].

10 También se ha descrito que anticuerpos contra proteínas carbamiladas (proteínas que comprenden un residuo de homocitrulina) se presentan en el suero de pacientes con RA (28, 29). Se encontró que la homocitrulina estaba presente en el nódulo reumatoide junto con citrulina (28) y se encontró que los anticuerpos contra proteínas carbamiladas predecían daño a las articulaciones (29).

15 Se han desarrollado muy recientemente dos pruebas serológicas de cabecera (POCT) para la detección temprana de RA. La prueba Rheuma-Chec (Orgentec, Mainz, Alemania) combina dos biomarcadores para el diagnóstico de RA-factor reumatoide y anticuerpos para MCV. Los anticuerpos para CCP se detectan con el ensayo CCPpoint (Euro-Diagnostica, Malmö, Suecia) [25]. Las pruebas solamente requieren una única gota de sangre entera y cualquier médico general puede realizarlas en minutos.

20 A pesar de las ventajas anteriores, todavía queda espacio de mejora de las pruebas serológicas existentes para la artritis reumatoide, en particular con respecto a la sensibilidad, la especificidad y la facilidad de manejo.

Sumario de la invención

25 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que los pacientes con artritis reumatoide (RA) producen anticuerpos contra anticuerpos citrulinados. Esto permite la fabricación de nuevas pruebas diagnósticas en una variedad de formatos.

30 Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende un residuo de citrulina. La invención también se refiere al uso diagnóstico de este anticuerpo, por ejemplo como un antígeno para determinar la presencia de anti-anticuerpos citrulinados (ACA) en la circulación de pacientes con RA o sujetos que están predispuestos a desarrollar RA. Por lo tanto, la invención también se dirige a un método para predecir si un sujeto tiene o desarrollará RA.

Leyendas para las figuras

Figura 1: Resultados de ensayo ELISA. Se probaron sueros de sujetos de control normales (n=7) y de pacientes con RA que no tenían factor reumatoide (n=7) en una dilución 1:100 en un ensayo ELISA con anticuerpos para IgG de conejo citrulinados inmovilizados como antígeno.

35 Descripción detallada de la invención

Se encontró que los pacientes con artritis reumatoide (RA) producen anticuerpos dirigidos específicamente contra anticuerpos que comprenden residuos de citrulina u homocitrulina. Estos anticuerpos se denominarán en la presente anticuerpos citrulinados.

40 Se prepararon anticuerpos citrulinados de dos modos. En primer lugar, se prepararon anticuerpos citrulinados al someter una preparación purificada de IgG de conejo a tratamiento con peptidilarginina desiminasa (PAD, EC 3.5.3.15). Esta enzima cataliza la conversión de arginina unida a proteína en citrulina [27]. También se prepararon anticuerpos citrulinados mediante carbamilación química. En este procedimiento, residuos de lisina presentes en un anticuerpo se convierten en un residuo de homocitrulina. Se obtuvieron de ese modo anticuerpos de IgG de conejo citrulinados (ejemplos 1 y 2).

50 Según se define en la presente, el término "anticuerpos" se usa para referirse a una molécula de unión específica tal como una proteína, o partes de la misma, que son capaces de unirse específicamente a un compuesto diana, habitualmente denominado un antígeno.

55 Ejemplos preferidos de estas moléculas de unión específica son polipéptidos o proteínas o partes de los mismos, tales como fragmentos variables monocatenarios (scFvs), regiones de fragmentos que se unen a antígeno (Fabs), anticuerpos de un solo dominio (sdabs), también conocidos como anticuerpos VHH, nanocuerpos (anticuerpos de un solo dominio derivados de camélido) o fragmentos de anticuerpo de un solo dominio derivados de IgNAR de tiburón llamados VNAR, u otros componentes activos de los mismos tales como aptámeros proteínicos. En una realización alternativa, una molécula de unión específica es una proteína de fusión que comprende el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo.

En lenguaje funcional, el término "anticuerpos" o "anticuerpo" se refiere a una proteína o un polipéptido capaz de unión específica a una molécula diana a menudo denominada "antígeno". Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas) son preferiblemente proteínas de gammaglobulina que se encuentran en la sangre u otros fluidos de vertebrados, y son usadas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar objetos extraños, tales como bacterias y virus.

Los anticuerpos humanos presentes en la naturaleza están formados típicamente por unidades estructurales básicas - cada una con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas - para formar, por ejemplo, monómeros con una unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades.

Los anticuerpos son producidos por un tipo de glóbulo blanco llamado célula B. Existen varios tipos diferentes de cadena pesada de anticuerpo y varios tipos diferentes de anticuerpos, que se agrupan en diferentes isotipos basados en qué cadena pesada poseen. Se conocen cinco isotipos de anticuerpos diferentes en mamíferos, que desempeñan diferentes papeles, y ayudan directamente a la respuesta inmunitaria apropiada para cada tipo diferente de objeto extraño que encuentran. Algunas especies de animales tales como los camélidos (p. ej. las llamas) y los tiburones pueden tener estructuras de anticuerpo aberrantes.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, una pequeña región en el extremo de la proteína es extremadamente variable, permitiendo que existan millones de anticuerpos con estructuras extremas ligeramente diferentes. Esta región se conoce como la región hipervariable. Cada una de estas variantes se puede unir a una diana diferente, conocida como antígeno. Esta enorme diversidad de anticuerpos permite al sistema inmunitario reconocer una diversidad de antígenos igualmente amplia. La parte única del antígeno reconocida por un anticuerpo se denomina epítipo. Estos epítipos se unen con su anticuerpo en una interacción muy específica que permite a los anticuerpos identificar y unirse solamente a su antígeno único entre los millones de diferentes moléculas que constituyen un organismo. El reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo le marca para el ataque por otras partes del sistema inmunitario. Los anticuerpos también pueden neutralizar la diana directamente, por ejemplo, al unirse a una parte de un patógeno que necesita para provocar una infección.

La población grande y diversa de anticuerpos se genera mediante combinaciones aleatorias de un conjunto de segmentos génicos que codifican diferentes sitios de unión antigénica (o parátipos), seguido por mutaciones aleatorias en esta zona del gen del anticuerpo, lo que crea una diversidad adicional. Los genes de anticuerpo también se reorganizan en un proceso llamado intercambio de clase que cambia la base de la cadena pesada por otra, creando un isotipo diferente del anticuerpo que retiene la región variable específica para el antígeno. Esto permite que un solo anticuerpo sea usado en varios isotipos por varias partes diferentes del sistema inmunitario.

Por lo tanto, el término "anticuerpo", según se usa en la presente, incluye explícitamente anticuerpos monocatenarios, regiones de fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos monoclonales, nanocuerpos, anticuerpos de un solo dominio, y similares.

Se entiende que el término "o parte del mismo" en el contexto de un anticuerpo u otra molécula de unión específica se refiere a la parte del anticuerpo o la molécula de unión específica que constituye el sitio de unión específica del anticuerpo o la molécula de unión específica y se puede interpretar como la parte de un anticuerpo o molécula de unión específica que todavía es capaz de reaccionar con el mismo epítipo que todo el anticuerpo o la molécula de unión específica de los que se derivaba el fragmento.

Se puede usar en la invención todo tipo de moléculas de unión específica, y derivados de las mismas tales como anticuerpos, proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión específica de un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de un solo dominio, otros dominios de unión proteínicos tales como anticatalinas, y moléculas pequeñas que se unen específicamente a epítipos citrulinados.

El término "anticuerpos específicamente reactivos con un epítipo citrulinado" o similares se han de interpretar como un anticuerpo que reacciona específicamente con un residuo de citrulina o un residuo de homocitrulina en el contexto de una estructura mayor tal como un polipéptido o un péptido o un ácido nucleico peptídico o un aptámero proteínico o una estructura que imita a un péptido pero que no reacciona con una estructura similar en la que el residuo de citrulina se reemplaza por un residuo de arginina.

La citrulina es un aminoácido que no se incorpora en proteínas durante la traducción, sin embargo, se puede generar mediante la modificación postraduccional de un residuo de arginina mediante peptidilarginina desiminasa (PAD).

La citrulinación es la conversión postraduccional de residuos de arginina en residuos de citrulina, que es catalizada por peptidilarginina desiminasa (PAD). Las enzimas peptidilarginina desiminasa (PAD; EC 3.5.3.15) catalizan la conversión de residuos de arginina en residuos de citrulina en proteínas. No existe ARNt para la citrulina, la presencia de residuos de citrulina en proteínas es exclusivamente el resultado de la modificación postraduccional. En mamíferos (seres humanos, ratones y ratas), se han identificado cinco isotipos de PAD (PAD1 - PAD6; 'PAD4' y 'PAD5' se usan para el mismo isotipo), cada uno codificado por un gen distinto (Vossenaar y cols, Bioessays 25,

1106-1118, 2003). Todas estas enzimas se basan fuertemente en la presencia de Ca^{2+} para la actividad y son incapaces de convertir L-arginina libre en L-citrulina libre. La L-arginina libre puede ser convertida en L-citrulina por óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) en eucariotas o por arginina desiminasa (EC 3.5.3.6) en bacterias. Estas enzimas no dependen de Ca^{2+} . Se prefieren enzimas PAD microbianas. Se prefieren particularmente enzimas PAD de *Porphyromonas gingivalis* en *Fusarium graminearum*. Se ha descrito que estas enzimas se expresan en sistemas de expresión heterólogos, tales como *Aspergillus niger* (EP 2032697 A1).

La diferencia más pronunciada entre las enzimas PAD altamente homólogas es su expresión específica tisularmente. En la epidermis, la PAD1 (sinónimos: PAD I, PAD tipo I) está implicada en la citrulinación de filamentos de queratina durante las fases finales de la diferenciación de queratinocitos, que es importante para la reorganización de la envuelta cornificada. Otro sitio de citrulinación en la epidermis es el folículo piloso, que contiene PAD3 (sinónimos PAD III, PAD tipo III) y su sustrato natural tricohialina (THH). La THH es una proteína estructural principal de las células de la vaina radicular interna y la capa medular del folículo piloso y, en un menor grado, de otros epitelios especializados. El isotipo de PAD más recientemente identificado, PAD6 (sinónimo: ePAD), se encontró en láminas citoplásmicas de ovocitos de ratón, que representan un papel importante en la embriogénesis temprana. Se encontró que la expresión de su ortólogo humano estaba restringida al ovario, los testículos y los leucocitos de sangre periférica (Chavanas y cols., *Gene* vol 330; 19-27, 2004). Originalmente, este isotipo de PAD se denominó ePAD, pero, basándose en la numeración sistemática de otros PADs, este isotipo se renombró PAD6 (Vossenaar y cols., *Bioessays* vol 25 1106-1118, 2003). El isotipo más ampliamente expresado, PAD2 (sinónimos PAD II, PAD tipo II, PAD-H19), está presente en muchos tejidos diferentes, como el músculo esquelético, el cerebro, el bazo, las glándulas secretoras y los macrófagos. A pesar de este amplio patrón de expresión, solo se han identificado la proteína básica de mielina (MBP) y la vimentina como sustratos naturales. En la esclerosis múltiple (MS), los pacientes desarrollan una respuesta inmunitaria contra MBP. La MBP es una proteína abundante de la envuelta de mielina, y su citrulinación se produce durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se observó citrulinación de vimentina durante la apoptosis inducida por ionóforo de calcio de macrófagos de ser humano y ratón y, según se describe anteriormente, se observó que la vimentina citrulinada era la diana de los autoanticuerpos anti-SA específicos de la RA. En contraste con las PADs analizadas anteriormente, que están todas localizadas principalmente en el citoplasma de las células, el isotipo PAD4 (sinónimos: PAD IV, PAD tipo IV, HL-60 PAD, PAD V, PAD tipo V, PADI4) está localizado en el núcleo. La señal de localización nuclear de PAD4 se encontró en la región N-terminal de la proteína. La PAD4 se expresa principalmente en granulocitos y monocitos de sangre periférica. Sustratos de PAD4 en el núcleo son proteínas del núcleo de histona (H2A, H3 y H4) y nucleofosmina/B23, una proteína nucleolar que funciona en el ensamblaje ribosómico, el transporte nucleocitoplásmico y la duplicación del centrosoma.

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos citrulinados también se pueden obtener químicamente, al convertir un residuo de lisina en un residuo de homocitrulina. Este procedimiento se denomina a menudo carbamilación (ejemplo 2).

Los anticuerpos citrulinados que se describen en el ejemplo 1 o 2 se inmovilizaron sobre un soporte sólido y se determinó en un ensayo ELISA que se preparaba en el ejemplo 3 si las muestras de sangre obtenidas de pacientes con RA contenían anticuerpos específicamente reactivos con epítomos citrulinados sobre anticuerpos citrulinados.

Los presentes inventores encontraron que el suero de pacientes con RA contenía anticuerpos que eran específicamente reactivos con anticuerpos, en particular IgG, citrulinados. Con ese propósito, se seleccionaron 7 pacientes con RA que no contenían factor reumatoide en su suero. Cuando el suero obtenido de estos pacientes se probaba en el ensayo ELISA del ejemplo 3, seis de 7 pacientes (86%) parecían tener anticuerpos circulatorios dirigidos contra IgG citrulinada (figura 1). Estos 6 pacientes no tenían anticuerpos contra IgG no citrulinada, y tampoco eran anti-anticuerpos citrulinados (ACA) encontrados en 7 sueros humanos normales aleatoriamente seleccionados.

Se concluyó que los anticuerpos citrulinados son un reactivo útil para la detección de autoanticuerpos específicos para la RA. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo que comprende un residuo de citrulina.

Estos anticuerpos se pueden obtener de cualquier especie según se describe anteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de vertebrado, tal como un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo de conejo, ratón o rata, aún más preferiblemente un anticuerpo de IgG, un fragmento Fab del mismo o un nanocuerpo. También se pueden usar anticuerpos de IgG humanos citrulinados, sin embargo, esto no se prefiere en ciertos formatos de ensayo. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG humanos citrulinados pueden provocar reacciones de fondo no específicas en un ensayo ELISA indirecto según se describe en la presente, mediante reacción cruzada con el anticuerpo anti-IgG humana marcado usado para la detección de anticuerpos ACA.

Por otra parte, la invención se dirige a un método para la detección de anticuerpos específicos para artritis reumatoide en una muestra procedente de un sujeto, en donde la muestra se pone en contacto con un anticuerpo citrulinado y en donde se determina si la muestra comprende anticuerpos específicamente reactivos con el anticuerpo citrulinado.

Según se usa en la presente, el término "específicamente reactivo con" se refiere a una reacción inmunitaria en la que un primer anticuerpo procedente de un individuo con RA reacciona con un epítipo citrulinado, presente sobre un segundo anticuerpo mientras que el primer anticuerpo no reacciona con el segundo anticuerpo cuando el residuo de citrulina del epítipo se reemplaza por un residuo de arginina.

5 La reactividad específica del ACA según se describe en la presente no se debe confundir con el factor reumatoide (RF). El factor reumatoide (RF) es un autoanticuerpo contra la porción Fc de IgG. RF e IgG se pueden ligar para formar complejos inmunitarios que contribuyen al proceso patológico. El factor reumatoide también puede ser una crioglobulina (anticuerpo que precipita al enfriar una muestra de sangre); puede ser una IgM bien monoclonal o bien policlonal. Raramente se encuentran otros isotipos, tales como IgA, IgG, IgE e IgD. Sin embargo, el factor reumatoide no reacciona específicamente con ACA ya que el RF no discrimina entre anticuerpos normales no citrulinados y anticuerpos citrulinados. Por otra parte, el RF se dirige contra IgG, mientras que los ACA se dirigen contra anticuerpos citrulinados de cualquier isotipo.

15 En un método preferido según la presente invención, se debe tener cuidado en que el RF no interfiera con los resultados del análisis. Esto se puede realizar de un gran número de modos, conocidos por el experto.

La interferencia de RF en un método según la presente invención se puede evitar, por ejemplo, al realizar un control que detecte la unión de anticuerpos no dirigidos específicamente contra un epítipo citrulinado. A continuación, los valores de control se pueden sustraer de los valores obtenidos en un método como el descrito anteriormente.

20 En una realización alternativa, se puede evitar la unión de RF al anticuerpo citrulinado. Por ejemplo, el anticuerpo citrulinado usado en el método se puede seleccionar de tal modo que no reaccione con RF. Esto se puede conseguir, por ejemplo, al usar fragmentos Fab citrulinados que carecen de la porción Fc de la molécula de IgG. En una realización alternativa, el anticuerpo citrulinado puede ser del isotipo IgM, IgA, IgE o IgD.

En una disposición alternativa adicional, el anticuerpo citrulinado puede ser de un origen no humano, tal como un anticuerpo recombinante, tal como un anticuerpo de un solo dominio.

30 Según se usa en la presente, el término "anticuerpo de un solo dominio" se refiere a proteínas derivadas de anticuerpo que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada presentes en la naturaleza. La tecnología se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos totalmente funcionales que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un solo dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De forma importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que aloja toda la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original.

40 Un dominio de un solo anticuerpo (sdAb, también llamado Nanobody por Ablynx, el desarrollador) es un fragmento de anticuerpo que consiste en un solo dominio de anticuerpo variable monómero. Como un anticuerpo entero, es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico. Con un peso molecular de solo 12-15 kDa, los anticuerpos de un solo dominio son mucho más pequeños que los anticuerpos comunes (150-160 kDa) que están compuestos por dos cadenas de proteína pesadas y dos cadenas ligeras, e incluso más pequeños que fragmentos Fab (-50 kDa, una cadena ligera y la mitad de una cadena pesada) y fragmentos variables monocatenarios (-25 kDa, dos dominios variables, uno procedente de una cadena ligera y uno de una pesada).

45 Los peces cartilaginosos también tienen anticuerpos de cadena pesada (IgNAR, 'nuevo receptor antigénico inmunoglobulínico'), a partir de los cuales se pueden obtener anticuerpos de un solo dominio llamados fragmentos VNAR. Un enfoque alternativo es dividir los dominios variables dímeros procedentes de inmunoglobulina G (IgG) común procedente de mamíferos tales como conejos, ratones, ratas o seres humanos en monómeros. Aunque la mayoría de la investigación en anticuerpos de un solo dominio se basa actualmente en dominios variables de cadena pesada, también se ha mostrado que los nanocuerpos derivados de cadenas ligeras se unen específicamente a epítopos diana.

50 Un anticuerpo de un solo dominio es una cadena peptídica de aproximadamente 110 aminoácido de longitud, que comprende un dominio variable (VH) de un anticuerpo de cadena pesada, o de una IgG común. Estos péptidos tienen una afinidad para antígenos similar a los anticuerpos enteros, pero son más termorresistentes y estables a detergentes y altas concentraciones de urea. Los derivados de anticuerpos de camélido y pez son menos lipófilos y más solubles en agua, debido a su región determinante de la complementariedad 3 (CDR3), que forma un bucle extendido que cubre el sitio lipófilo que normalmente se une a una cadena ligera. En contraste con anticuerpos comunes, algunos anticuerpos de un solo dominio son termorresistentes hasta 90 grados Celsius.

55 En una realización alternativa adicional, la muestra procedente del sujeto que se va a probar puede estar agotada en RF, o el RF se puede inactivar antes de la prueba. Con ese propósito, están disponibles comercialmente bloqueadores de IgM específicos. El experto conoce bien la diversidad de métodos que se puede emplear para evitar la interferencia de RF con el método divulgado actualmente.

5 En una realización preferida de este método, el anticuerpo citrulinado se inmoviliza sobre un soporte sólido. Existen numerosos métodos para realizar este método, y el experto conoce bien los diversos soportes sólidos, que tienen todos sus ventajas y desventajas específicas. El soporte sólido se puede elegir ventajosamente del grupo que consiste en vidrio, nitrocelulosa, poliestireno, papel o cualquier otro tipo de soporte disponible comercialmente. En una realización particularmente preferida, el soporte sólido es poliestireno, tal como, por ejemplo, una placa de ELISA. En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un método realizado en un formato de ensayo de ELISA.

10 El descubrimiento de que los pacientes con RA producían anticuerpos contra anticuerpos citrulinados (ACA) permitió preparar a los presentes inventores formatos de ensayo que tienen ventajas específicas sobre los ensayos descritos en la técnica anterior.

15 En un método según una realización preferida de la invención, un anticuerpo citrulinado se liga a un glóbulo rojo. Eso se puede hacer al incubar glóbulos rojos con anticuerpos citrulinados con especificidad aleatoria, tales como anticuerpos de IgG o anticuerpos de cualquier otro isotipo. También se puede hacer de un modo específico, a saber al usar anticuerpos citrulinados que son específicamente reactivos con un componente de la superficie celular externa de un glóbulo rojo.

20 Por ejemplo, se prepararon anticuerpos citrulinados que se dirigían contra glicoforina A, un componente de la superficie celular externa de un glóbulo rojo. El Ejemplo 1 muestra los detalles exactos de los anticuerpos y su citrulinación usando PAD.

25 El término "un componente de la superficie celular externa de un glóbulo rojo" se usa en la presente para indicar un determinante antigénico expresado en el exterior de un glóbulo rojo. Actualmente, existen más de 300 determinantes antigénicos de la superficie de glóbulos rojos reconocidos por the International society of Blood transfusion. La mayoría de estos pertenecen a 1 de 29 sistemas de grupos sanguíneos (Daniels, G., ISBT Science Series, 1: 3 - 8 (2006). El sistema antigénico MNS es un sistema de grupo sanguíneo humano basado en dos genes (glicoforina A y glicoforina B) en el cromosoma 4.

30 Componentes de la superficie celular externa alternativos y/o preferidos se listan en la tabla 1 de Daniels (anteriormente) e incluyen transportador de urea (UT)-B, acuaporina 1, acuaporina 3, CD233, CD241, CD240D, CD240CE, proteína Xk, CD234, CD329, CD242, ERMAP, CD147, CD47, CD55, CD59, CD35, CD44, CD99, CD108, CD151, acetilcolecsterinasa, CD238, CD297, CD236C, CD236D, CD235A y CD235B.

35 Las glicoforinas A (GYPA) y B (GYPB) se prefieren allí y son importantes sialoglicoproteínas de la membrana de eritrocitos humanos que soportan los determinantes antigénicos para los grupos sanguíneos M, N y Ss. Además de los antígenos M o N y S o s, que se presentan comúnmente en todas las poblaciones, se han identificado aproximadamente 40 fenotipos de variantes relacionadas. Estas variantes incluyen todas las variantes del complejo de Miltenberger y varias isoformas de Sta; además, Dantu, Sat, He, Mg y la variantes de eliminación Ena, S-s-U- y Mk. La mayoría de las variantes son el resultado de recombinaciones génicas entre GYPA y GYPB.[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=299> 3]

40 Están disponibles comercialmente anticuerpos con glicoforina A humana, por ejemplo de BioLegend (<http://www.biolegend.com/pacific-blue-anti-human-cd235a-glycophorin-a-antibody-7880.html>), de Abcam, Cambridge, Reino Unido, o de Antibodies Online, ABIN337240, un anticuerpo de IgG policlona de conejo, dirigido contra la parte N-terminal de GlycA. También se han descritos nanocuerpos específicos para glicoforina A (30).

45 Los anticuerpos de glicoforina A citrulinados obtenidos según el procedimiento esbozado en el ejemplo 1 permitieron a los presentes inventores determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos citrulinados (ACA) en muestras obtenidas de pacientes con RA usando un formato de ensayo de hemaglutinación (ejemplo 4).

50 En una de sus realizaciones, la invención se refiere por lo tanto a un método como el descrito anteriormente en el que la detección se produce en un ensayo de hemaglutinación.

55 Con más detalle, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente que comprende las etapas de: a) proporcionar un anticuerpo citrulinado, b) proporcionar una muestra que comprende anticuerpos procedentes de un sujeto, c) proporcionar glóbulos rojos, d) poner en contacto el anticuerpo citrulinado con la muestra y los glóbulos rojos y e) detectar si se produce la aglutinación de los glóbulos rojos, en donde la aglutinación indica la presencia de anti-anticuerpos citrulinados específicos para la artritis reumatoide en la muestra.

60 La etapa d) del método anterior no se debe considerar tan estrictamente que el contacto del anticuerpo citrulinado con la muestra y los glóbulos rojos se deba realizar necesariamente al mismo tiempo. El método funciona bien si el anticuerpo citrulinado se pone en contacto con los glóbulo rojos en primer lugar y solo posteriormente con la muestra que contiene los anticuerpos contra el anticuerpo citrulinado (ACA). Sin embargo, desde una perspectiva de eficacia de uso, se prefiere que el contacto tenga lugar simultáneamente o aproximadamente al mismo tiempo.

65

El término "aproximadamente al mismo tiempo" en este contexto significa con un intervalo de menos de 5 minutos, tal como menos de 4 minutos, o 3, 2 o incluso 1 minuto.

5 En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un ensayo de aglutinación en el que se usan glóbulos rojos autólogos. En otras palabras, la invención se refiere a un método como el descrito anteriormente en el que los anticuerpos procedentes de la etapa b) y los glóbulos rojos procedentes de la etapa c) están comprendidos en la misma muestra. En una realización preferida adicional, los glóbulos rojos proceden del sujeto.

10 Los presentes inventores desarrollaron este ensayo de aglutinación autólogo y probaron muestras procedentes de los 7 pacientes con RA descritos anteriormente. Los resultados del ensayo de aglutinación autólogo confirmaban los resultados obtenidos con el ensayo ELISA (Tabla 1).

Tabla 1: Ensayo de aglutinación autólogo con 7 sueros de RA.

	Positivo	Negativo
Artritis reumatoide	6	1
Control normal	0	7

15 Se encontró que más de 80% de los pacientes con artritis reumatoide tenía ACA circulando en la sangre. Ninguno de los pacientes de control probados tenía estos anticuerpos. Se concluyó que ACA es un marcador fiable y muy sensible y específico para la RA.

20 Sin querer limitarse por una teoría, se piensa que los anticuerpos de GlycA citrulinados cubren los glóbulos rojos con epítomos citrulinados, convirtiendo de ese modo a los glóbulos rojos en dianas para ACA presente en el suero y la sangre de pacientes con RA. Cuando están presentes anticuerpos ACA, los glóbulos rojos se aglutinarán. En el ensayo de aglutinación autólogo, los glóbulos rojos del paciente con RA se cubren mediante epítomos citrulinados y los propios anticuerpos del paciente harán que los glóbulos rojos se aglutinen si están presentes ACAs en la sangre.

25 En un estudio prospectivo, los presentes inventores encontraron que un gran número de sujetos que no tenían signos clínicos de artritis reumatoide pero que iban a desarrollar artritis reumatoide en un período de 10 años también tenían ACA en circulación. Se concluyó que ACA es un marcador para el pronóstico de RA.

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Preparación de IgG citrulinada.

IgG de conejo (25 ug) se citrulinó in vitro mediante PAD de músculo esquelético de conejo (75 mU; Sigma-Aldrich; EC 3.5.3.15) en tampón de desiminación (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, CaCl₂ 5 mM y DTT 1 mM) y se incubó a 37°C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de EGTA, pH 8,0, hasta una concentración de 50 mM. Se obtuvo IgG de conejo citrulinada después de la diálisis durante la noche contra Tris 10 mM pH 7,6 con EDTA 2 mM.

35 Anticuerpos de glicoforina A de cabra (25 ug) obtenidos de Abcam, Reino Unido, se citrulinaron in vitro mediante PAD de músculo esquelético de conejo (75 mU; Sigma-Aldrich; EC 3.5.3.15) en tampón de desiminación (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, CaCl₂ 5 mM y DTT 1 mM) y se incubaron a 37°C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de EGTA, pH 8,0, hasta una concentración de 50 mM. Se obtuvo IgG de cabra citrulinada después de la diálisis durante la noche contra Tris 10 mM pH 7,6 con EDTA 2 mM.

40 Otro anticuerpo de glicoforina A se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology. R10 sc-53905 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón dirigido contra el dominio extracelular de glicoforina A. Este anticuerpo se citrulinó in vitro mediante PAD de músculo esquelético de conejo (75 mU; Sigma-Aldrich; EC 3.5.3.15) en tampón de desiminación (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, CaCl₂ 5 mM y DTT 1 mM) y se incubó a 37°C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de EGTA, pH 8,0, hasta una concentración de 50 mM. Se obtuvo IgG de ratón citrulinada después de la diálisis durante la noche contra Tris 10 mM pH 7,6 con EDTA 2 mM.

45 Una incubación paralela de una preparación de IgG de la misma especie a la que no se añadía enzima PAD servía como un control negativo.

50

Ejemplo 2: Preparación de IgG carbamilada.

Se obtuvo IgG carbamilada al incubar 1,18 mg de IgG de conejo disuelta en 1 ml de PBS con 1 ml de un tampón de KCNO 0,2 M en Na₂HPO₄ 0,1 M durante tres horas a 37 grados Celsius. A continuación, la IgG carbamilada se dializó contra NaCl al 0,9% durante la noche a 4 grados Celsius y se almacenó hasta el uso a 4 grados Celsius. Esta IgG se usó como un antígeno en un ensayo de ELISA para la detección de anti-anticuerpos citrulinados en sueros procedentes de pacientes con RA. IgG no carbamilada se usó allí como un control.

Ejemplo 3: ELISA con anticuerpos citrulinados.

Un ensayo ELISA para la detección de anticuerpos contra anticuerpos citrulinados se desarrolló como sigue. IgG citrulinada preparada como se describe anteriormente se inmovilizó sobre placas de ELISA NUNC al incubar 50 microlitros por pocillo de 100 microgramos por mililitro de IgG citrulinada a 37 grados Celsius durante la noche. Los sitios de unión residuales se bloquearon al añadir 50 microlitros de 100 microgramos por mililitro de albúmina sérica bovina (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada pocillo de la placa de microvaloración e incubar durante 1 hora a 37 grados Celsius. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) y se almacenaron en seco a 4 grados Celsius si no se usaban inmediatamente.

Las placas de control se prepararon exactamente del mismo modo, excepto que las placas de control contenían anticuerpos no citrulinados procedentes de controles de la misma especie inmovilizados a la fase sólida.

Se usaron diluciones en serie (de 1/10 a 1/100.000) de suero humano procedente de pacientes con RA que se sabe que es negativo para el factor reumatoide para investigar la presencia de anticuerpos contra IgG citrulinada. Cincuenta microlitros de cada dilución en serie se cargaron a un pocillo de la placa de microvaloración y se incubaron a 37 grados Celsius durante 3 horas. Después de lavar 3 veces con PBS/Tween, se añadieron 50 microlitros de una dilución 1:1000 de anti-IgG humana marcada con peroxidasa de rábano picante de conejo en PBS y se incubaron durante 2 horas a 37 grados Celsius. Después de lavar 3 veces con PBS/Tween, se añadieron a cada pocillo 100 microlitros de TMB y las placas se incubaron en la oscuridad a 37 grados Celsius durante 30 minutos. La reacción se detuvo al añadir 50 microlitros de H₂SO₄ 2 M a cada pocillo y la absorbancia se leyó a 450 nm con un multiescáner TiterTek (Flow laboratories, Irvine Reino Unido).

Resultados representativos obtenidos con IgG de conejo citrulinada se muestran en la figura 1. Otras inmunoglobulinas citrulinadas que se describen anteriormente daban resultados comparables.

Ejemplo 4: Ensayo de hemaglutinación

Se realizaron pruebas de aglutinación autólogas en un cubreobjetos de vidrio al mezclar 50 microlitros bien de sangre de paciente o bien de sangre de control con 50 microlitros de PBS que contenía 0,1% de BSA con o sin 20 microgramos por mililitro de anticuerpos de glicoforina A citrulinado. La mezcla se extendió sobre la superficie de vidrio en un círculo con un diámetro de aproximadamente 1 centímetro y la aglutinación se evaluó visualmente después de 2 minutos.

REFERENCIAS

1. Dörner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:246-253.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, y cols. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31 :315-324.
- 5 3. Schur PH. Anti-cyclic citrullination peptide antibodies: diagnostic, predictive and monitoring value in RA. *Int J Adv Rheumatol*. 2005;3:77-83.
4. Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination; a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2:249-251.
- 10 5. Yoiinou P, Serre G. The anti-perinuclear factor and antikeratin antibody systems. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:508-518.
6. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101:273-281.
7. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, y cols. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000;43:155-163.
- 15 8. van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2006;6:37-41.
9. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med*. 2002;60:383-388.
- 20 10. Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, Bossuyt X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem*. 2007;53:498-504.
11. Bizzara N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem*. 2007;53:1527-1533.
- 25 12. Sebbag M, Moinard N, Auger I, y cols. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol*. 2006;36:2250-2263.
13. Vander Cruyssen B, Cantaert T, Nogueira L, y cols. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther*. 2006;8
- 30 14. Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, y cols. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1199-1204.
15. Kinloch A, Tatzer V, Wait R, y cols. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R1421-R1429.
16. Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, y cols. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1196-1201.
- 35 17. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, y cols. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:R142-R150.
18. Bang H, Egerer K, Gauliard A, y cols. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2503-2511.

19. Dejaco C, Klotz W, Larcher H, Duftner C, Schirmer M, Herold M. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8
20. Soós L, Szekanecz Z, Szabo Z, y cols. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2007;34:1658-1663.
- 5 21. Usum J, Nielen MM, van Schaardenburg D, y cols. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2008;10.
22. Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, y cols. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against citrullinated peptides. *J Rheumatol.* 2008;35:1002-1008.
- 10 23. Mathsson L, Mullazehl M, Wick MC, y cols. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:36-45.
24. Feist E, Egerer K, Burmester GR. Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol.* 2007;66:212-218.
- 15 25. Snijders GF, den Broeder AA, Bevers K, y cols. Measurement characteristics of a new rapid anti-CCP2 test compared to the anti-CCP2 ELISA. *Scand J Rheumatol.* 2008:151-154.
26. Egerer y cols., *Dtsch Arztebl* 2009; 106 (10); 159-163.
27. Vossenaar y cols., *Bioessays.* 2003; 25(11):1106-18.
28. Turunen y cols., *J. Translational Medicine* 2013; 11: 224-229.
29. Shi y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2011; 42: 17372-17377.
- 20 30. Habib y cols., *Anal. Biochem.* 2013; 438: 82-89.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que comprende un residuo de citrulina, en donde el anticuerpo se dirige contra un componente de la superficie celular externa de un glóbulo rojo.
- 5 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, reactivo con glicoforina.
3. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que la glicoforina es glicoforina A.
- 10 4. Método para la detección de anticuerpos específicos para la artritis reumatoide en una muestra procedente de un sujeto, en el que la muestra se pone en contacto con un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 y en el que se determina si la muestra comprende anticuerpos específicamente reactivos con el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3.
- 15 5. Método según la reivindicación 4, en donde el anticuerpo citrulinado se inmoviliza sobre un soporte sólido.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el soporte sólido es una membrana de nitrocelulosa
7. Método según la reivindicación 5, en el que el soporte sólido es un soporte de poliestireno, preferiblemente una placa de ELISA.
- 20 8. Método según la reivindicación 4, en el que la detección se produce en un ensayo de hemaglutinación.
9. Método según la reivindicación 8, que comprende las etapas de:
 - a. proporcionar un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3,
 - 25 b. proporcionar una muestra que comprende anticuerpos procedentes del sujeto,
 - c. proporcionar glóbulos rojos,
 - d. poner en contacto el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 con la muestra y los glóbulos rojos,
 - e. detectar si se produce la aglutinación de los glóbulos rojos,
- 30 en donde la aglutinación indica la presencia en la muestra de anticuerpos específicos para la artritis reumatoide.
10. Método según la reivindicación 9, en el que los anticuerpos procedentes de la etapa b y los glóbulos rojos procedentes de la etapa c están comprendidos en la misma muestra.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, en el que los glóbulos rojos proceden del sujeto.

Figura 1

