

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 999**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2009 PCT/EP2009/067532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09796375 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2380027**

54 Título: **Predicción diagnóstica de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico**

30 Prioridad:

**23.12.2008 EP 08172784**

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

**13.03.2019**

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
(50.0%)  
Hofgartenstrasse 8  
80539 München, DE y  
CHARITÉ UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KONTHUR, ZOLTÁN;  
LEHRACH, HANS y  
SKRINER, KARL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 703 999 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

Predicción diagnóstica de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de ensayos y procedimientos de diagnóstico *in vitro*. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos y ensayos para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, en particular artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

10

**Antecedentes**

La artritis reumatoide (RA) y el lupus eritematoso sistémico (SLE) son ambas enfermedades crónicas autoinmunitarias.

15

La RA se caracteriza por inflamación en múltiples articulaciones provocada por una reacción autoinmunitaria. Esta reacción autoinmunitaria provoca dolor en las articulaciones y la erosión y la destrucción de la superficie de la articulación, lo que afecta a la amplitud de su movimiento y desemboca en deformidad y pérdida de función. Las articulaciones pequeñas de las manos, los pies y la columna cervical son las más afectadas, pero también pueden verse afectadas articulaciones más grandes, tales como los hombros y las rodillas. Además, la RA está asociada en muchos casos también con la formación de nódulos reumatoides en la piel, vasculitis, fibrosis de los pulmones y/o amiloidosis renal, entre otros. La RA se puede diagnosticar, por ejemplo, utilizando imágenes de rayos X y mediante la determinación de la presencia de determinados autoanticuerpos en muestras de sangre de pacientes. En particular, la presencia de factor reumatoide (RF, un autoanticuerpo dirigido a la región Fc de la IgG humana) y anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA), por ejemplo, anti-péptido citrulinado cíclico (anti-CCP), es indicativa de RA. Otros marcadores y ensayos de diagnóstico se utilizan para el diagnóstico diferencial, incluyendo dichos marcadores y ensayos, por ejemplo, la determinación de la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR), proteína C reactiva, un hemograma completo, la función renal, enzimas hepáticas y otros ensayos inmunológicos (por ejemplo anticuerpo antinuclear/ANA).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En el SLE, el sistema inmunitario ataca las células y tejidos del cuerpo, lo que tiene como consecuencia inflamación y daño tisular. El SLE puede afectar cualquier parte del cuerpo, pero con mayor frecuencia daña el corazón, las articulaciones, la piel, los pulmones, los vasos sanguíneos, el hígado, los riñones y el sistema nervioso. Los ensayos de diagnóstico indicativos de SLE incluyen ensayos de anticuerpos antinucleares (ANA), ensayos de anticuerpos anti-fosfolípidos y ensayos anti-antígenos nucleares extraíbles (anti-ENA). Ensayos más específicos son los anticuerpos anti-Smith y anti-ADNbc. Otros ensayos que se realizan de forma rutinaria si se sospecha que hay presencia de SLE son los niveles del sistema del complemento (los niveles bajos sugieren un consumo por parte del sistema inmunitario), electrolitos y función renal, enzimas hepáticas y un hemograma completo.

La presencia de autoanticuerpos contra antígenos intracelulares tales como los componentes de estructuras de ribonucleoproteína (RNP) grandes (por ejemplo, ribosoma o espliceosoma) es característica de enfermedades autoinmunitarias reumáticas tales como la RA y el SLE.

Los complejos de ribonucleoproteínas heterogéneos están presentes en el núcleo celular durante la transcripción génica y la subsiguiente modificación post-transcripcional del ARN recién sintetizado (pre-ARNm). El complejo hnRNP está formado por pre-ARNm y ~30 proteínas, entre las mismas las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas hnRNP-A2 y -B1 como proteínas del núcleo. La hnRNP-A2 (también conocida como RA33) y la hnRNP-B1 son el resultado de dos variantes de corte y empalme diferentes del gen HNRNPA2B1. Los anticuerpos contra hnRNP-A2 o -B1 (es decir, los denominados autoanticuerpos anti-A2/-B1/-RA33), han demostrado ser más específicos para RA que otros marcadores, tales como RF. Esto mismo tiene validez para la hnRNP-A1 estrechamente relacionada. También se han encontrado autoanticuerpos anti-A2/-B1/-RA33 en muestras de una fracción significativa de pacientes con SLE.

Las proteínas hnRNP se han clasificado mediante análisis de homología de secuencia en dos subgrupos, el subgrupo A y el subgrupo D. El subgrupo A comprende hnRNP-A0, hnRNP-A1, hnRNP-A2, hnRNP-B1 y hnRNP-A3, mientras que el subgrupo D comprende hnRNP-A/B, hnRNP-D y hnRNP-DL (hnRNP-D).

Las proteínas hnRNP y los fragmentos peptídicos de las mismas son un estimulador importante de la autoinmunidad en ratas con artritis inducida por pristano y anticuerpos contra proteínas hnRNP y fragmentos peptídicos de las mismas son marcadores en ratones SKG que tienen una enfermedad de tipo RA y ratones MRLpr y NZW que tienen una enfermedad de tipo SLE (Hoffmann et al., J. Immunol., 2007, 179: 7568-7576).

El sistema más utilizado para clasificar la RA es el de los criterios revisados del Colegio Estadounidense de Reumatología (*American College of Rheumatology*) de 1987 para la clasificación de RA. (Arnett, F.C., et al., *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 315-324). Según estos criterios (conocidos como criterios ARA), se dice que un

65

5 paciente tiene RA si satisface por lo menos cuatro de los siete criterios siguientes, en los que los criterios 1-4 deben estar presentes durante por lo menos seis semanas: 1) rigidez matutina durante por lo menos una hora, 2) artritis de tres o más zonas articulares, 3) artritis de las articulaciones de la mano, 4) artritis simétrica, 5) nódulos reumatoides, 6) factor reumatoide ("RF") en suero y 7) cambios radiográficos. Estos criterios tienen una sensibilidad y especificidad de aproximadamente el 90%.

El marcador bioquímico más importante generalmente aceptado (véanse los criterios ARA anteriores) y que ayuda en el diagnóstico de RA es el factor reumatoide (FR) detectado en suero.

10 La detección de anticuerpos anti-CCP (péptido citrulinado cíclico) e interleucina 6 para diagnosticar la RA se ha descrito en el documento EP 1 700 129 B1.

15 El lupus eritematoso sistémico (SLE) y la artritis reumatoide son enfermedades inflamatorias crónicas de etiología multifactorial, caracterizadas por la inflamación y el daño en diversos tejidos y órganos. Los tratamientos actuales de la enfermedad se basan principalmente en fármacos inmunosupresores. Aunque estos tratamientos han reducido la morbimortalidad, causan una supresión inmunitaria no específica. Para evitar estos efectos secundarios, se han sugerido estrategias terapéuticas alternativas, que consisten, por ejemplo, en dirigirse a células T específicas utilizando péptidos derivados de autoantígenos identificados como secuencias que abarcan los epítopes principales (Monneaux y Muller (2007), Adv. Exp. Medicina. Biol. 601: 105-12; Monneaux y Muller (2004), Autoimmun. Rev. 3 (1): 16-24).

### Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico mejorado para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, en particular artritis reumatoide (RA) y lupus eritematoso sistémico (SLE). En particular, la invención se basa en la detección de autoanticuerpos contra hnRNP y otros autoantígenos en muestras biológicas. La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente por los inventores de que la nueva proteína de tipo hnRNP-D en combinación con otros marcadores tiene poder de diagnóstico y de pronóstico con respecto a enfermedades autoinmunitarias, en particular con respecto a artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

La presente invención se refiere a las formas de realización tal como se caracterizan en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los puntos siguientes.

35 1. Un procedimiento para determinar en una muestra de un sujeto la presencia de dos o más anticuerpos que comprende:

- poner en contacto dicha muestra con:

40 i. un polipéptido similar a hnRNP-D (hnRNP-DL) citrulinado que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5, y

45 ii. por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, y

50 - determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL citrulinado y determinar adicionalmente si por lo menos otro anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con respecto a dicho polipéptido hnRNP-DL, y/o dicho CCP y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente.

55 2. Un procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende:

- determinar en una muestra de dicho sujeto la presencia de:

60 i. un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP-DL que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5, y

65 ii. por lo menos otro anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG,

- 5 en el que la presencia de un anticuerpo que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL y por lo menos un anticuerpo adicional que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, o dicho péptido CCP, o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente, es indicativa de la presencia de la enfermedad autoinmunitaria en dicho sujeto.
- 10 3. Un procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria según el punto 2 caracterizado por que la muestra la proporciona un sujeto sospechoso de tener una enfermedad inmunitaria en etapa temprana; en el que el sujeto no ha mostrado ningún síntoma durante más de 3 meses o la enfermedad autoinmunitaria no se ha diagnosticado durante más de 3 meses en dicho sujeto.
- 15 4. Un procedimiento según el punto 3, caracterizado por que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad reumática mediada inmunológicamente, preferentemente RA temprana, y/o la muestra la proporciona un sujeto sospechoso de tener una enfermedad reumática mediada inmunológicamente, preferentemente RA temprana.
- 20 5. Un procedimiento según el punto 3, caracterizado por que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria sistémica, preferentemente lupus eritematoso sistémico, y/o la muestra la proporciona un sujeto sospechoso de tener una enfermedad autoinmunitaria sistémica, preferentemente lupus eritematoso sistémico.
- 25 6. Un conjunto de proteínas que comprende:
- i. un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, en el que dicho polipéptido hnRNP-DL comprende por lo menos la secuencia de la SEC ID NO: 5; y
  - 30 ii. por lo menos otro péptido seleccionado del grupo que comprende un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, seleccionándose dicho hnRNP del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, opcionalmente citrulinado, respectivamente, un péptido cíclico citrulinado (CCP), un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, MCV (vimentina citrulinada mutada), filagrina citrulinada, alfa-enolasa citrulinada y fibrinógeno citrulinado.
- 35 7. Un kit de diagnóstico que comprende un conjunto de proteínas según la reivindicación 6.
8. Un polipéptido hnRNP-DL citrulinado o una composición que comprende el polipéptido hnRNP-DL citrulinado, en la que el hnRNP-DL citrulinado comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5.
- 40 9. Utilización de un conjunto de proteínas según el punto 6, o un kit de diagnóstico según el punto 7, o un polipéptido hnRNP-DL, o una composición que comprende el polipéptido hnRNP-DL citrulinado según el punto 8 para predecir el desarrollo de RA en pacientes con artritis temprana, en la que el polipéptido hnRNP-DL comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5.
- 45 10. Un procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de
- determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de por lo menos
  - 50 i. un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, comprendiendo el polipéptido hnRNP-DL la secuencia de la SEC ID NO: 5;
  - comparar el nivel determinado de dicho anticuerpo con el nivel respectivo en una muestra de un paciente que se sabe que padece la enfermedad autoinmunitaria o comparar el nivel con el nivel respectivo en una muestra de un paciente que se sabe que no padece la enfermedad autoinmunitaria; y
  - correlacionar los niveles determinados con la ausencia o la presencia de la enfermedad autoinmunitaria.
- 55 11. Procedimiento para el diagnóstico diferencial de artritis reumatoide y una enfermedad autoinmunitaria sistémica que comprende las etapas de
- poner en contacto una muestra de un sujeto con:
  - 60 i. un primer polipéptido hnRNP que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5, y
  - ii. un segundo polipéptido hnRNP que es el mismo que el primero, pero que está citrulinado (cit-hnRNP)
  - 65 - determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dichos primer y segundo polipéptido hnRNP y determinar adicionalmente si la cantidad de anticuerpo unido a dicho primer polipéptido hnRNP es aproximadamente igual o inferior que la cantidad de anticuerpo unido a

dicho segundo polipéptido hnRNP, en el que si la relación entre el anticuerpo unido a cit-hnRNP y el anticuerpo unido a hnRNP es 1.2 o superior, se puede diagnosticar artritis reumatoide.

5 También se divulga un procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende:

- proporcionar una muestra de dicho sujeto,

- determinar la presencia de:

10

(i) un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo, y

15

(ii) por lo menos otro anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL o fragmentos del mismo o variantes de corte y empalme del mismo, respectivamente, o un péptido CCP o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG,

20

en el que la presencia de un anticuerpo que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo y por lo menos un anticuerpo adicional que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho péptido hnRNP-DL o fragmentos del mismo o variantes de corte y empalme del mismo, o dicho péptido CCP o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente, es indicativa de la presencia de la enfermedad autoinmunitaria en dicho sujeto.

25

Particularmente, también se divulga un procedimiento para determinar en una muestra de un sujeto la presencia de dos o más anticuerpos que comprende:

- proporcionar una muestra de dicho sujeto,

30

- poner en contacto dicha muestra con:

(i) un polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o variante de corte y empalme, y

35

(ii) por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL o fragmentos del mismo o variantes de corte y empalme del mismo, respectivamente, y/o un péptido CCP y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG y

40

- determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo y además determinar si por lo menos otro anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL o fragmentos del mismo o variantes de corte y empalme del mismo, y/o dicho péptido CCP y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente.

45

También se divulga un procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de

a. proporcionar una muestra de dicho paciente,

50

b. determinar en dicha muestra el nivel de por lo menos

- un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o variante de corte y empalme y

55

- por lo menos un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende RF, anti-CCP y un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL o contra fragmentos del mismo o variantes de empalme del mismo,

60

c. correlacionar los niveles determinados con la ausencia o la presencia de la enfermedad autoinmunitaria.

La invención también se refiere a polipéptidos, conjuntos de proteínas y anticuerpos que pueden utilizarse en estos procedimientos.

**Descripción detallada de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar en una muestra de un sujeto la presencia de dos o más anticuerpos que comprende:

- poner en contacto dicha muestra con:
  - i. un polipéptido de tipo hnRNP-D (hnRNP-DL) citrulinado que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5, y
  - ii. por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, y
- determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL citrulinado y además determinar si por lo menos un anticuerpo adicional está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, y/o dicho CCP y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente.

Los polipéptidos están citrulinados. La citrulinación o desiminación es el término utilizado para la modificación postraducciona del aminoácido arginina en una proteína para dar el aminoácido citrulina. Esta reacción se realiza mediante enzimas denominadas peptidilarginina desiminasa (PAD). en la presente memoria, la totalidad o fracciones de las argininas presentes en el polipéptido pueden ser citrulina.

La invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende:

- determinar en una muestra de dicho sujeto la presencia de:
  - i. un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP-DL que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5, y
  - ii. por lo menos otro anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG,

en el que la presencia de un anticuerpo que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL y por lo menos un anticuerpo adicional que reconoce específicamente dicho, por lo menos otro, polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, o dicho péptido CCP, o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente, es indicativa de la presencia de la enfermedad autoinmunitaria en dicho sujeto.

Tal como se divulga en la presente memoria, las proteínas, polipéptidos, péptidos, fragmentos y variantes de corte y empalme tienen preferentemente por lo menos 12 aminoácidos de longitud. Un polipéptido en la presente memoria es un péptido que tiene una longitud de por lo menos 12 aminoácidos, particularmente una proteína.

En una forma de realización preferida, el polipéptido hnRNP-DL comprende por lo menos la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 81-420 de la SEC ID NO: 1. Los residuos de aminoácidos 81-420 de la SEC ID NO: 1 corresponden a la SEC ID NO: 5.

Preferentemente en la presente memoria, el polipéptido hnRNP-DL se refiere a las isoformas 1 a 4 de hnRNP-DL tal como se representan en las SEC ID NO: 1 a 4 (figura 1 a figura 4) o fragmentos de las mismas.

Se prefiere que los anticuerpos distintos que reconocen específicamente un determinado polipéptido hnRNP no muestren reactividad cruzada hacia otros tipos de polipéptidos hnRNP. Preferentemente, dichos anticuerpos son inmunoglobulinas IgG.

El sujeto, en el contexto de la presente invención, puede ser un ser humano u otro animal, preferentemente un mamífero. Se prefiere que el sujeto sea un ser humano. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en un contexto médico y en un contexto veterinario.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende las etapas de los procedimientos descritos anteriormente, siendo la

presencia de dichos dos o más anticuerpos indicativa del riesgo de desarrollar dicha enfermedad autoinmunitaria y/o de la presencia de dicha enfermedad autoinmunitaria y/o la diferenciación entre formas de enfermedad específicas de la enfermedad autoinmunitaria.

5 En una forma de realización preferida, el procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria se caracteriza por que se diagnostica una enfermedad autoinmunitaria en una etapa temprana y/o la muestra la proporciona un sujeto que es sospechoso de padecer una enfermedad inmunitaria en una etapa temprana.

10 Una enfermedad autoinmunitaria en una etapa temprana se relaciona, a este respecto, con una enfermedad autoinmunitaria que no ha presentado ningún síntoma durante más de 3 meses o que no se ha diagnosticado durante más de 3 meses.

15 En el contexto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad reumática mediada inmunológicamente y/o la muestra la proporciona un sujeto que es sospechoso de padecer una enfermedad reumática mediada inmunológicamente.

En una forma de realización preferida de la invención, la enfermedad es RA, preferentemente RA temprana.

20 En una forma de realización preferida, el procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria se caracteriza por que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria sistémica y/o la muestra la proporciona un sujeto que es sospechoso de padecer una enfermedad autoinmunitaria sistémica. Preferentemente la enfermedad autoinmunitaria sistémica es SLE.

25 En una forma de realización particular del procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria, el procedimiento proporciona una sensibilidad de diagnóstico de por lo menos el 80%, preferentemente del 85%, preferentemente del 90%, preferentemente de por lo menos el 94%; preferentemente superior al 94%.

30 En el contexto de la presente divulgación, los polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos están preferentemente no relacionados con el factor reumatoide y el CCP. También se prefiere que los polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se reconozcan principalmente por la IgG.

35 No relacionado con el factor reumatoide y el CCP en la presente memoria significa que no existe una reactividad cruzada inmunológica basada en una secuencia primaria específica o relacionada estructuralmente entre dichos polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos y el factor reumatoide y la CCP.

40 Tal como se divulga en la presente memoria, los polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se seleccionan de un grupo que comprende hnRNP-D, -A1, -A2, -B1, -A/B y -A3. De forma incluso más preferida, dichos polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se seleccionan del grupo que comprende polipéptidos de las SEC ID NO: 6 a 17.

45 Un procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de

- a. proporcionar una muestra de dicho paciente,
- b. determinar en dicha muestra el nivel de por lo menos
  - 50 - un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP-DL o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme o una forma citrulinada del mismo y,
- c. correlacionar los niveles determinados con la ausencia o la presencia de la enfermedad autoinmunitaria.

55 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de

- determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de por lo menos
  - 60 i. un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, comprendiendo el polipéptido hnRNP-DL la secuencia de la SEC ID NO: 5;
- comparar el nivel determinado de dicho anticuerpo con el nivel respectivo en una muestra de un paciente que se sabe que padece la enfermedad autoinmunitaria o comparar el nivel con el nivel respectivo en una muestra de un paciente que se sabe que no padece la enfermedad autoinmunitaria; y

65

- correlacionar los niveles determinados con la ausencia o la presencia de la enfermedad autoinmunitaria.

Dicho polipéptido hnRNP-DL comprende preferentemente la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 81-420 de la SEC ID NO: 1, es decir, la SEC ID NO: 5. Preferentemente en el contexto del procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

Preferentemente, en el contexto de la presente invención, la muestra se selecciona de un grupo que comprende sangre, suero, saliva, lágrimas, líquido sinovial y cefalorraquídeo, plasma, orina y heces.

Los autoanticuerpos de la presente invención se detectan preferentemente en un ensayo, preferentemente un ensayo inmunológico, por ejemplo, un ensayo serológico. Los autoanticuerpos presentes en las muestras pueden detectarse, por ejemplo, inmovilizando los autoantígenos respectivos y detectando la unión de los anticuerpos después de poner en contacto los antígenos inmovilizados con la muestra.

Tal como se menciona en la presente memoria, un "ensayo" puede ser de cualquier tipo aplicado en el campo de los diagnósticos. Dicho ensayo puede basarse en la unión de un analito que se desea detectar a una o más sondas de captura con una determinada afinidad. Con respecto a la interacción entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés, la constante de afinidad es, en una forma de realización muy particular, preferentemente superior a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

En el contexto de la presente invención, las "moléculas de captura" son moléculas que pueden utilizarse para que se unan a moléculas diana o moléculas de interés, es decir, analitos, de una muestra. Por lo tanto, las moléculas de captura deben tener una forma adecuada, tanto espacial como en términos de características de superficie, tales como carga superficial, hidrofobicidad, hidrofiliidad, la presencia o la ausencia de donantes y/o aceptores de Lewis, para unirse específicamente a las moléculas diana o moléculas de interés. De esta forma, la unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones iónicas, de van-der-Waals, pi-pi, sigma-pi, hidrofóbicas o de enlaces de hidrógeno o una combinación de dos o más de las interacciones mencionadas anteriormente entre las moléculas de captura y las moléculas diana o moléculas de interés.

Los procedimientos de detección preferidos comprenden inmunoensayos en diversos formatos, tales como, por ejemplo, inmunotransferencia, inmunoensayos de línea, inmunotransferencia inmuno-*dot-blot*, ensayos de inmunotransferencia *dot-blot* rápidos, radioinmunoensayos, quimioluminiscencia e inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), matrices de perlas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas y formatos de ensayo rápidos tales como, por ejemplo, ensayos de tira inmunocromatográfica.

Los ensayos pueden ser ensayos homogéneos o heterogéneos, ensayos de tipo sándwich competitivos y no competitivos. La composición general y los procedimientos relacionados con los "ensayos de tipo sándwich" están bien establecidos y son conocidos por los expertos. (The Immunoassay Handbook, ed. David Wild, Elsevier LTD, Oxford; 3ª ed. (mayo de 2005), ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C et al., Curr Opin Chem Biol., febrero de 2006; 10 (1): 4-10. PMID: 16376134), incorporados al presente documento por referencia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un conjunto de proteínas que comprende:

- un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, en el que dicho polipéptido hnRNP-DL comprende por lo menos la secuencia de la SEC ID NO: 5 y
- por lo menos otro péptido seleccionado del grupo que comprende un polipéptido hnRNP que no tiene homología de secuencia con dicho polipéptido hnRNP-DL, seleccionándose dicho hnRNP del grupo que consiste en las SEC ID NO: 6 a 17, opcionalmente citrulinado, respectivamente, un péptido cíclico citrulinado (CCP), un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, MCV (vimentina citrulinada mutada), filagrina citrulinada, alfa-enolasa citrulinada y fibrinógeno citrulinado.

En el conjunto de proteínas tal como se describe en la presente memoria, dicho polipéptido hnRNP, o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo, no está relacionado con el factor reumatoide ni con el CCP. También se prefiere que dichos polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se reconozcan principalmente por la IgG. En una forma de realización particular, dichos polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se seleccionan del grupo que comprende hnRNP-D, -A1, -A2, -B1, -A/B y A3. Además, se prefiere que dichos polipéptidos hnRNP o fragmentos de los mismos o variantes de corte y empalme de los mismos se seleccionen del grupo que comprende polipéptidos de las SEC ID NO: 6 a 17. Determinados CCP se describen en el documento WO 98/22503. El documento WO 98/22503 muestra que la ciclación de los CCP conduce a una reactividad mejorada de los péptidos respectivos. En un ejemplo específico se muestra que si un péptido de fórmula general HQHQESTXGRSRGRSGS, en la que X representa citrulina, se cicla por medio de un enlace disulfuro entre los dos residuos de cisteína, la sensibilidad aumenta al 63% en comparación con el 36%



respecto al péptido lineal correspondiente. Como los autoanticuerpos presentes en los sueros de pacientes tienen una reactividad ligeramente diferente con respecto a diferentes péptidos cíclicos, se sugirió una combinación de péptidos en el documento WO 98/22503 para mejorar adicionalmente el ensayo. Los niveles de autoanticuerpos anti-CCP se pueden medir tal como se describe en el documento WO 03/050542. En resumen, se utiliza una combinación de péptidos que contienen sitios de epítopes con la fórmula general XG y X-noG en las que X representa citrulina, G representa glicina y noG representa cualquiera de los aminoácidos H, I, W, S, R, K, Y, M, F, V, P, Cit o un análogo de los mismos para evaluar el nivel de anticuerpos anti-CCP (anti-CCP) en una muestra. En el documento WO 03/050542 se divulgan péptidos específicos útiles en dicha evaluación. Como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, son posibles mejoras y refinamientos adicionales con respecto al antígeno peptídico citrulinado cíclico utilizado en un ensayo para medir anti-CCP que, por ejemplo, darán como resultado una secuencia alterada de la secuencia del péptido citrulinado cíclico. Sin embargo, dichas modificaciones no se apartarán del ámbito de la presente invención.

También se divulga un ensayo de diagnóstico que comprende un conjunto de proteínas tal como se ha descrito anteriormente.

Dicho ensayo de diagnóstico proporciona preferentemente una sensibilidad de diagnóstico de por lo menos el 80%, de forma más preferida del 85%, de forma incluso más preferida del 90%, de la forma más preferida de por lo menos el 94% cuando se utiliza en el contexto de los procedimientos de la presente invención.

También se divulga un polipéptido hnRNP-DL que comprende la secuencia que abarca los residuos de aminoácidos 81 a 420 de la SEC ID NO: 1 (es decir, la SEC ID NO: 5) o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo o un polipéptido que presenta por lo menos el 80% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 5 o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo caracterizado porque este polipéptido hnRNP-DL se reconoce específicamente por un anticuerpo presente en una muestra de un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria.

También se divulga un polipéptido hnRNP-DL o una composición que comprende el polipéptido hnRNP-DL con la secuencia de la SEC ID NO: 5 o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo o un polipéptido que muestra por lo menos el 70% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 5 o un fragmento del mismo o una variante de corte y empalme del mismo caracterizado porque este polipéptido hnRNP-DL se reconoce específicamente por un anticuerpo presente en una muestra de un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria.

El polipéptido hnRNP-DL está citrulinado. La composición puede comprender adicionalmente un polipéptido hnRNP adicional, que puede estar opcionalmente citrulinado, seleccionado del grupo de hnRNP-B1, hnRNP-D, hnRNP-A1, hnRNP-A2, hnRNP-B1, hnRNP-A/B y hnRNP-A3, preferentemente hnRNP-B1 y hnRNP-D.

El polipéptido de la invención se modifica preferentemente de forma que el polipéptido no sea un activador inmunitario.

También se divulga una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención o fragmentos del mismo. Dicha composición farmacéutica puede comprender disolventes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales que son conocidos por los expertos. La composición farmacéutica se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades reumatoides, particularmente para el tratamiento de RA y SLE.

También se divulga un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido tal como se ha descrito anteriormente, es decir, hnRNP-DL. En una forma de realización, este no muestra reactividad cruzada hacia otros tipos de polipéptidos hnRNP.

Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante. En una forma de realización, un "anticuerpo neutralizante" se refiere a cualquier anticuerpo que es capaz de unirse a su antígeno específico *in vivo* pero que no es capaz de activar el sistema inmunitario. Esto se puede lograr, por ejemplo, aislando anticuerpos contra el antígeno de interés a partir de una muestra de un sujeto, la subsiguiente desglucosilación de los anticuerpos aislados *ex vivo* y reinsertando los anticuerpos desglucosilados en el sujeto.

El anticuerpo puede modificarse *in vitro* (por ejemplo, desglucosilarse, por ejemplo, mediante endoglicosidasa S (EndoS de *Streptococcus pyogenes*, y/o carboxilarse y/o transglutaminarse) y después devolverse al paciente para bloquear la activación inmunitaria. La eliminación del dominio de azúcar conduce a la pérdida de actividad proinflamatoria, es decir, la modulación *in vivo* de la glicosilación de anticuerpos es una estrategia para interferir con procesos autoinmunitarios.

Además, los anticuerpos se pueden modificar (por ejemplo, carboxilar) y después del aislamiento y la modificación se pueden devolver al paciente para inhibir la activación inmunitaria.

En el presente documento se describe también la utilización del conjunto de proteínas o el polipéptido, el

polipéptido modificado o el anticuerpo tal como se describen en la presente memoria como inmunomoduladores para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad reumática mediada inmunológicamente. De forma incluso más preferida, la enfermedad es RA. La enfermedad autoinmunitaria puede ser una enfermedad autoinmunitaria sistémica. Preferentemente la enfermedad autoinmunitaria sistémica es SLE.

Los procedimientos, los ensayos, los polipéptidos, el conjunto de proteínas y el anticuerpo de la presente invención también se pueden utilizar para realizar un seguimiento del tratamiento en pacientes con RA o SLE. En dicha forma de realización, la presencia o la ausencia o el nivel de uno o más de los autoanticuerpos según la presente invención en una muestra de un paciente que padece RA o SLE son indicativos del éxito de un tratamiento contra SLE o RA en comparación con los valores correspondientes en muestras de referencia o muestras anteriores.

El conjunto de proteínas según el ensayo de diagnóstico o el polipéptido tal como se describe en la presente memoria también se pueden utilizar para predecir el desarrollo de RA en pacientes con artritis temprana.

Los polipéptidos hnRNP pueden ser también, particularmente en este contexto, derivados modificados sintéticamente o versiones modificadas postraduccionales de polipéptidos hnRNP, por ejemplo, polipéptidos hnRNP citrulinados y/o N,N-dimetilados. En particular, los polipéptidos del grupo que comprende polipéptidos de las SEC ID NO: 1 a 17 pueden modificarse sintéticamente o modificarse postraduccionales, por ejemplo citrulinarse o N,N-dimetilarse. Además, los hnRNP DL, D, A2, B1, A3, A1 o AB pueden modificarse sintéticamente o modificarse postraduccionales, por ejemplo citrulinarse o N,N-dimetilarse. Se prefiere una versión modificada *in vitro* de hnRNP (particularmente modificada mediante peptidilarginina desiminasa (PAD) de conejo o PAD humana (particularmente de tipo II o IV)) y tiene una sensibilidad de entre el 60% y el 70%. En particular, los péptidos lineales modificados fuera de la región M9 de los hnRNP pueden utilizarse para la detección específica de sueros de pacientes con RA.

Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos hnRNP según la presente invención se proporcionan en las SEC ID NO: 1 a 17 (Fig. 1 a 17). en la presente memoria también se describen proteínas o péptidos que tienen por lo menos el 70%, preferentemente por lo menos el 80%, de forma más preferida el 90%, de la forma más preferida el 95% de homología de secuencia o identidad de secuencia con las proteínas o péptidos respectivos según las SEC ID NO: 1 a 17. En particular, las secuencias homólogas respectivas de otros animales, preferentemente mamíferos, también se encuentran dentro del ámbito de la presente invención cuando el sujeto es un animal no humano.

Tal como se usa en la presente memoria, el grado de "homología" e "identidad" de secuencia se puede determinar utilizando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la homología se puede determinar utilizando el programa de algoritmos de homología en línea "BLAST", disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Los procedimientos, los ensayos, los anticuerpos y los conjuntos de proteínas de la presente invención también pueden utilizarse para el diagnóstico diferencial de RA y SLE. Por ejemplo, cuando se detectan anticuerpos contra hnRNP citrulinados o fragmentos citrulinados de hnRNP o contra CCP y los niveles de anticuerpos de RF son superiores a 50 [unidades] en la muestra, el paciente probablemente padece RA y no SLE. En caso de que no se detecten anticuerpos anti-CCP y se detecten anti-DNA o histona, Sm o CRP en una muestra de suero de un paciente, es probable que el paciente padezca SLE y no RA.

Los niveles de los marcadores obtenidos mediante los procedimientos o el uso de los procedimientos según la presente invención pueden analizarse de una serie de maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, cada resultado de ensayo obtenido puede compararse con un valor "normal", o un valor que indica una enfermedad o un resultado particular. Un diagnóstico/pronóstico particular puede depender de la comparación de cada resultado del ensayo con dicho valor, que puede denominarse "umbral" de diagnóstico o pronóstico. En determinadas formas de realización, los ensayos para determinar uno o más indicadores de diagnóstico o pronóstico se correlacionan con una afección o enfermedad simplemente por la presencia o la ausencia del indicador o los indicadores en el ensayo. Por ejemplo, un ensayo puede diseñarse de forma que solo se produzca una señal positiva por encima de una concentración umbral de interés particular, y que por debajo de dicha concentración el ensayo no proporcione ninguna señal superior al fondo.

La sensibilidad y la especificidad de un ensayo de diagnóstico y/o pronóstico dependen de algo más que solamente la "calidad" analítica del ensayo, también dependen de la definición de qué constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas de características operativas del receptor (curvas ROC), se calculan normalmente mediante la representación del valor de una variable en función de su frecuencia relativa en poblaciones "normales" (es decir, aparentemente sanas) y en "enfermas". Para cualquier marcador particular, una distribución de niveles de marcador para sujetos con y sin una enfermedad probablemente se superpondrá. En dichas condiciones, un ensayo no distingue en absoluto lo normal de la enfermedad con una precisión del 100%, y el área de superposición indica dónde el ensayo no puede distinguir lo normal de la enfermedad. Se

selecciona un umbral por encima del cual (o por debajo del cual, en función de cómo cambie un marcador con la enfermedad), el ensayo se considera que es anormal y por debajo del cual el ensayo se considera normal. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permita la identificación correcta de una afección. Las curvas ROC se pueden utilizar incluso cuando los resultados de los ensayo no proporcionan necesariamente un número exacto. Siempre que se puedan clasificar los resultados, se puede crear una curva ROC. Por ejemplo, los resultados de un ensayo en muestras de "enfermedad" podrían clasificarse según el grado (por ejemplo, 1 = bajo, 2 = normal y 3 = alto). Esta clasificación puede correlacionarse con los resultados en la población "normal", y crear así una curva ROC. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hanley et al. 1982. Radiology 143: 29-36. Preferentemente, se selecciona un umbral para proporcionar un área de curva ROC superior a aproximadamente 0,5, de forma más preferida superior a aproximadamente 0,7, de forma aún más preferida superior a aproximadamente 0,8, de forma incluso más preferida superior a aproximadamente 0,85, y de la forma más preferida superior a aproximadamente 0,9. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

El eje horizontal de la curva ROC representa (especificidad 1), que aumenta con la tasa de falsos positivos. El eje vertical de la curva representa la sensibilidad, que aumenta con la tasa de verdaderos positivos. Por lo tanto, para un corte particular seleccionado, se puede determinar el valor de (especificidad 1), y se puede obtener una sensibilidad correspondiente. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que el nivel del marcador medido permitirá la identificación correcta de una enfermedad o afección. Por lo tanto, el área bajo la curva ROC se puede utilizar para determinar la eficacia del ensayo.

También se divulga que no se confía en umbrales particulares para uno o más marcadores en un panel para determinar si un perfil de niveles de marcadores obtenidos de un sujeto es indicativo de un diagnóstico/pronóstico particular. Más bien, la presente invención puede utilizar una evaluación de un "perfil" de panel de marcadores como un todo unitario. Un patrón particular de "huella dactilar" de cambios en dicho panel de marcadores puede, en efecto, actuar como un indicador de diagnóstico o de pronóstico específico. Como se analiza en la presente memoria, ese patrón de cambios se puede obtener a partir de una única muestra o de cambios temporales en uno o más miembros del panel (o un valor de respuesta del panel). Un panel en la presente memoria se refiere a un conjunto de marcadores.

Tal como se describe en la presente memoria más adelante, un valor de respuesta del panel se determina preferentemente representando curvas ROC para la sensibilidad (es decir, verdaderos positivos) de un panel particular de marcadores frente a 1-(especificidad) (es decir, falsos positivos) para el panel en diversos puntos de corte. En estos procedimientos, un perfil de mediciones de marcadores de un sujeto se considera en conjunto para proporcionar una probabilidad general (expresada como una puntuación numérica o como un porcentaje de riesgo) de un diagnóstico o pronóstico. En dichas formas de realización, un aumento en un determinado subconjunto de marcadores puede ser suficiente para indicar un diagnóstico/pronóstico particular en un paciente, mientras que un aumento en un subconjunto diferente de marcadores puede ser suficiente para indicar el mismo o diferente diagnóstico/pronóstico en otro paciente. También se pueden aplicar factores de ponderación a uno o más marcadores de un panel, por ejemplo, cuando un marcador es de una utilidad particularmente alta en la identificación de un diagnóstico/pronóstico particular, puede ponderarse de forma que a un nivel dado él solo sea suficiente para señalar un resultado positivo. Del mismo modo, un factor de ponderación puede proporcionar que ningún nivel dado de un marcador particular sea suficiente para indicar un resultado positivo, sino que solo indique un resultado cuando otro marcador también contribuye al análisis.

Los marcadores y/o paneles de marcadores pueden seleccionarse de forma que muestren por lo menos aproximadamente el 70% de sensibilidad, de forma más preferida por lo menos aproximadamente el 80% de sensibilidad, de forma incluso más preferida por lo menos aproximadamente el 85% de sensibilidad, de forma aún más preferida por lo menos aproximadamente el 90% de sensibilidad y de la forma más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de sensibilidad, combinada con por lo menos aproximadamente el 70% de especificidad, de forma más preferida por lo menos aproximadamente el 80% de especificidad, de forma incluso más preferida por lo menos aproximadamente el 85% de especificidad, de forma aún más preferida por lo menos aproximadamente el 90% de especificidad y de la forma más preferida por lo menos aproximadamente el 95% de especificidad. En formas de realización particularmente preferidas, tanto la sensibilidad como la especificidad son por lo menos de aproximadamente el 75%, de forma más preferida de por lo menos aproximadamente el 80%, de forma incluso más preferida de por lo menos aproximadamente el 85%, de forma aún más preferida de por lo menos aproximadamente el 90% y de la forma más preferida de por lo menos aproximadamente el 95% %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

Se puede utilizar una relación de probabilidad positiva, una relación de probabilidad negativa, una razón de momios o una relación de riesgo como medida de la capacidad de un ensayo para predecir el riesgo o diagnosticar una enfermedad. En el caso de una relación de probabilidad positiva, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre sujetos tanto en el grupo "enfermo" como en el grupo "control"; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. En el caso de una relación de probabilidad negativa, un valor de 1 indica que un resultado negativo es igualmente probable entre sujetos tanto

5 en el grupo "enfermo" como en el grupo "control"; un valor superior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de ensayo y un valor inferior a 1 indica que un resultado negativo es más probable en el grupo de control. Los marcadores y/o paneles de marcadores pueden seleccionarse preferentemente de forma que muestren una relación de probabilidad positiva o negativa de por lo menos aproximadamente 1.5 o más o aproximadamente 0.67 o menos, de forma más preferida de por lo menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0.5 o menos, de forma aún más preferida de por lo menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0.2 o menos, de forma incluso más preferida de por lo menos aproximadamente 10 o más o de aproximadamente 0,1 o menos, y de la forma más preferida de por lo menos aproximadamente 20 o más o aproximadamente 0.05 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

15 En el caso de una razón de momios, un valor de 1 indica que un resultado positivo es igualmente probable entre los sujetos de los grupos "enfermo" y "control"; un valor superior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo enfermo y un valor inferior a 1 indica que un resultado positivo es más probable en el grupo de control. Los marcadores y/o paneles de marcadores pueden seleccionarse preferentemente de forma que muestren una razón de momios de por lo menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0.5 o menos, de forma más preferida de por lo menos aproximadamente 3 o más o aproximadamente 0.33 o menos, de forma aún más preferida de por lo menos aproximadamente 4 o más o aproximadamente 0.25 o menos, de forma incluso más preferida de por lo menos aproximadamente 5 o más o aproximadamente 0.2 o menos y de la forma más preferida de por lo menos aproximadamente 10 o más o aproximadamente 0.1 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

25 En el caso de una relación de riesgo, un valor de 1 indica que el riesgo relativo de un punto final (por ejemplo, la muerte) es igual en los grupos "enfermo" y "control"; un valor superior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo enfermo y un valor inferior a 1 indica que el riesgo es mayor en el grupo de control. Los marcadores y/o paneles de marcadores pueden seleccionarse preferentemente de forma que muestren una relación de riesgo de por lo menos aproximadamente 1.1 o más o aproximadamente 0.91 o menos, de forma más preferida de por lo menos aproximadamente 1.25 o más o aproximadamente 0.8 o menos, de forma aún más preferida de por lo menos aproximadamente 1.5 o más o aproximadamente 0.67 o menos, de forma incluso más preferida de por lo menos aproximadamente 2 o más o aproximadamente 0.5 o menos y de la forma más preferida de por lo menos aproximadamente 2.5 o más o aproximadamente 0.4 o menos. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a +/- 5% de una medición dada.

35 El experto entenderá que la asociación de un indicador de diagnóstico o de pronóstico con un diagnóstico o con un riesgo de pronóstico de un resultado clínico futuro es un análisis estadístico. Por ejemplo, un nivel de marcador superior a X puede indicar que un paciente tiene más probabilidades de sufrir un resultado adverso que los pacientes con un nivel inferior o igual a X, determinado mediante un nivel de significancia estadística. Además, un cambio en la concentración del marcador con respecto a los niveles de referencia puede reflejar el pronóstico del paciente, y el grado de cambio en el nivel del marcador puede relacionarse con la gravedad de los eventos adversos. La significancia estadística a menudo se determina comparando dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza y/o un valor de p. Véase, por ejemplo, Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos de la invención son 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% y 99.99%, mientras que los valores de p preferidos son 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, y 0.0001.

45 Se pueden realizar múltiples determinaciones de marcadores de diagnóstico o de pronóstico, y se puede utilizar un cambio temporal en el marcador para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, la concentración de un marcador en una muestra de sujeto puede determinarse en un momento inicial, y de nuevo en un segundo momento a partir de una segunda muestra del sujeto. Un aumento en el marcador desde el momento inicial hasta el segundo momento puede ser indicativo de un diagnóstico particular, o un pronóstico particular. Del mismo modo, una disminución en el marcador desde el momento inicial hasta el segundo momento puede ser indicativo de un diagnóstico particular, o un pronóstico particular.

55 El término "muestra", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con un propósito de diagnóstico, pronóstico o evaluación de un sujeto de interés, tal como un paciente. Las muestras de ensayo preferidas incluyen sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo y derrames pleurales. Además, un experto se dará cuenta de que algunas muestras de ensayo se analizarán más fácilmente después de un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, la separación de sangre completa en componentes de suero o plasma.

60 El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un organismo vivo humano o no humano que recibe atención médica o que debería recibir atención médica debido a una enfermedad. Esto incluye a personas sin enfermedad definida que están siendo investigadas para determinar signos de patología. Por lo tanto, los procedimientos y ensayos descritos en la presente memoria son aplicables tanto a enfermedades humanas como veterinarias.

65

Los resultados de los procedimientos y ensayos de la presente invención, es decir, la presencia o la ausencia de los autoanticuerpos contra los péptidos marcadores de la invención o el nivel de los autoanticuerpos pueden correlacionarse con un pronóstico o diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, particularmente RA o S, tal como se ha descrito anteriormente.

5

Las expresiones "correlacionado" o "correlacionarse", tal como se utilizan en la presente memoria con referencia al uso de marcadores de diagnóstico y de pronóstico, se refieren a la comparación de la presencia o la cantidad del marcador o los marcadores en un paciente con su presencia o su cantidad en personas que se sabe que padecen, o se sabe que están en riesgo de padecer, una afección dada; o en personas que se sabe que no padecen una afección dada. Tal como se ha discutido anteriormente, un nivel de un marcador en una muestra de un paciente puede compararse con un nivel conocido asociado con un diagnóstico específico. Se dice que el nivel de un marcador en la muestra se ha correlacionado con un diagnóstico; es decir, el experto puede utilizar el nivel de marcador para determinar si el paciente padece un tipo específico de diagnóstico y responder en consecuencia. Alternativamente, el nivel de un marcador en la muestra se puede comparar con un nivel del marcador que se sabe que está asociado con un buen resultado (por ejemplo, la ausencia de enfermedad, etc.). En formas de realización preferidas, un panel de niveles de marcadores se correlaciona con una probabilidad global o un resultado particular.

10

15

En una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico diferencial de artritis reumatoide y una enfermedad autoinmunitaria sistémica que comprende las etapas de

20

- poner en contacto una muestra de un sujeto con:
  - i. un primer polipéptido hnRNP que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 5 y
  - 25 ii. un segundo polipéptido hnRNP que es el mismo que el primero, pero que está citrulinado (cit-hnRNP)
- determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho primer y segundo polipéptido hnRNP y además determinar si la cantidad de anticuerpo unido a dicho primer polipéptido hnRNP es aproximadamente igual o inferior a la cantidad de anticuerpo unido a dicho segundo polipéptido hnRNP, pudiendo diagnosticarse artritis reumatoide si la relación entre el anticuerpo unido a cit-hnRNP y el anticuerpo unido a hnRNP es 1.2 o superior.

25

30

La enfermedad autoinmunitaria sistémica se puede seleccionar del grupo de lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, artritis psoriásica, espondiloartropatías, artritis reactiva u osteoartritis, una enfermedad de las articulaciones principalmente degenerativa.

35

Preferentemente, la relación es de 1.5, 1.8, 2, 2.5, 3, 3.5 o superior.

40

Preferentemente, el primer y el segundo hnRNP se seleccionan del grupo de hnRNP-D, -A1, -A2, -B1, -A/B y hnRNP-DL. Más preferentemente se analizan otros hnRNP, uno de los cuales es hnRNP-DL.

Es importante tener en cuenta que los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden no estar presentes simplemente como una composición, en la que, por ejemplo, están presentes dos o más hnRNP, pero también pueden estar presentes como moléculas químicas en las que, por ejemplo, un primer y un segundo hnRNP se fusionan conjuntamente en una forma de cabeza a cola, o de cabeza a cabeza, o de cola a cola. Se fusionarían preferentemente solo la región inmunodominante, es decir, los dominios de unión a ARN. También pueden fusionarse polipéptidos de longitud completa.

45

## 50 Descripción de los dibujos

Las secuencias de aminoácidos de determinados hnRNP y sus variantes de corte y empalme (isoformas) se proporcionan en las figuras 1 a 17.

55

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de hnRNP-DL humano (SEC ID NO. 1)

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 de hnRNP-DL humano (SEC ID NO: 2)

Figura 3: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 3 de hnRNP-DL humano (SEC ID NO: 3)

60

Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 4 de hnRNP-DL humano (SEC ID NO: 4)

Figura 5: Secuencia de los residuos de aminoácidos 81-420 de la isoforma 1 de hnRNP-DL humano (SEC ID NO: 5, es decir, residuos de aminoácidos 81-420 de la SEC ID NO: 1)

65

Figura 6: Secuencia de aminoácidos de hnRNP-A2 humano (SEC ID NO: 6)

Figura 7: Secuencia de aminoácidos de hnRNP-B1 humano (SEC ID NO: 7)

Figura 8: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de hnRNP-D humano (SEC ID NO: 8)

Figura 9: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 de hnRNP-D humano (SEC ID NO: 9)

Figura 10: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 3 de hnRNP-D humano (SEC ID NO: 10)

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 4 de hnRNP-D humano (SEC ID NO: 11)

Figura 12: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de hnRNP-A3 humano (SEC ID NO: 12)

Figura 13: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 de hnRNP-A3 humano (SEC ID NO: 13)

Figura 14: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de hnRNP-A1 humano (SEC ID NO: 14)

Figura 15: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 de hnRNP-A1 humano (SEC ID NO: 15)

Figura 16: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de hnRNP-A/B humano (SEC ID NO: 16)

Figura 17: Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 de hnRNP-A/B humano (SEC ID NO: 17)

Figura 18: Inmunotransferencia con hnRNP citrulinados. El hnRNP citrulinado (cit-hnRNP) se puede utilizar en un inmunoensayo de línea (LIA) e inmunotransferencia para detectar sueros con RA. Reconocimiento adicional de sueros pero sin pérdida de reactividad de hnRNP nativos. Se analizaron 24 sueros mediante inmunotransferencia. El hnRNP citrulinado y el hnRNP sin modificar se transfirieron y se analizaron mediante inmunotransferencia con 24 sueros de RA e IgG antihumana conjugada con AP. La reactividad se incrementa en los 6 (6 de 24; 25%) sueros de pacientes positivos a hnRNP con cit-hnRNP y 5 sueros dan positivo adicionalmente por medio de sueros de RA cuando se citrulinan y se analizan mediante inmunotransferencia, siendo ahora en total 11 (11 de 24; 46%) positivos. Conclusión: utilizando cit-hnRNP en un inmunoensayo, la sensibilidad general del ensayo aumenta en un 21% y la intensidad de la señal positiva aumenta en el 100% de los sueros de pacientes analizados.

Figura 19: los inmunoensayos basados en hnRNP citrulinados o sin modificar pueden distinguir entre artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios sistémicos que pueden mostrar una manifestación reumática. Solo RA proporcionará señales positivas adicionales e intensidades de señal mejoradas ( $\geq$  factor 1.2) en hnRNP citrulinados.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Determinación del nivel de anticuerpos anti-hnRNP en muestras de pacientes que padecen RA o SLE

256 muestras de pacientes que padecen RA (n = 169), SLE (n = 63) y un grupo de control (n = 24). Las muestras de suero se derivan de pacientes bien caracterizados clínicamente y serológicamente de un estudio clínico del departamento de pacientes ambulatorios de la Charité Universitätsmedizin, Berlín, Alemania.

Para la detección de anticuerpos específicos para las diversas proteínas hnRNP, se realizaron inmunoensayos ELISA de sitio único no competitivos, en los que las placas de microvaloración se recubrieron con el antígeno hnRNP distinto respectivo. Los valores de corte (= valor medio + 2 \* desviación estándar) se determinaron para los niveles de anticuerpos con respecto a los niveles en el grupo de control. Los valores de corte para hnRNP-D y hnRNP-DL se determinaron como 0.09 y 0.1 OD, respectivamente. Estos valores de corte se utilizaron para determinar la presencia o la ausencia de la enfermedad en el paciente (positivo/negativo).

Las tablas 1 y 2 resumen los resultados de la determinación de la presencia de anticuerpos contra hnRNP-D y hnRNP-DL en muestras de suero de los pacientes del estudio. La tabla 3 resume los resultados de una combinación de ambos ensayos.

Tabla 1: Aparición y distribución relativa de la presencia de anticuerpos contra hnRNP-D en muestras de suero de pacientes

	Artritis Reumatoide	Lupus eritematoso sistémico	Grupo de control
Número de muestras de suero analizadas	169	63	24
Número de muestras de suero positivas	35 (21%)	19 (30%)	1 (4%)

La especificidad de RA o SLE frente al control fue del 96%, la especificidad de RA frente a SLE fue del 70%.

5 **Tabla 2:** Aparición y distribución relativa de la presencia de anticuerpos contra hnRNP-DL en muestras de suero de pacientes

	Artritis Reumatoide	Lupus eritematoso sistémico	Grupo de control
Número de muestras de suero analizadas	67	46	24
	Número de muestras positivas (porcentaje) absoluto		
hnRNP-DL (81 - 420) (correspondiente a la SEC ID NO: 5)	14 (21 %)	21 (46%)	1 (4%)
hnRNP-DL (120-420) (correspondiente a la SEC ID NO: 2)	6 (4%)	7 (15%)	1 (4%)

La especificidad de RA o SLE frente al control fue del 96%, la especificidad de RA frente a SLE fue del 54%.

10 **Tabla 3:** Aparición y distribución relativa de la presencia de anticuerpos contra hnRNP-D y hnRNP-DL en muestras de suero de pacientes

	Artritis Reumatoide	Lupus eritematoso sistémico	Grupo de control
Número de muestras de suero analizadas	46	46	24
número de muestras de suero positivas	20 (43%)	22 (48%)	2 (8%)

15 La especificidad de RA o SLE frente al control fue del 92%, la especificidad de RA frente a SLE fue del 52%. No se observó reactividad cruzada de los anticuerpos para hnRNP-D y hnRNP-DL.

La tabla 4 resume los resultados para un análisis ROC de los datos. Las tablas 5 y 6 indican la exactitud de los ensayos.

20 **Tabla 4:** Área bajo la curva (AUC) más errores estándar (e.e.) para el diagnóstico de RA y SLE mediante la determinación de anticuerpos contra hnRNP-D y hnRNP-DL ya sea individualmente o en combinación en muestras de suero de pacientes

Análisis de ROC AUC (e.e.)	hnRNP-D	hnRNP-DL	combinación
RA	0.6908 (0.0365)	0.6323 (0.0399)	0.7057 (0.0344)
SLE	0.7916 (0.0331)	0.7166 (0.0333)	0.7448 (0.0314)

25 **Tabla 5:** Precisión, especificidad y sensibilidad para los ensayos de detección con respecto a la RA.

	hnRNP-D	hnRNP-DL (81-420; SEC ID NO: 5)	hnRNP-DL (120-420; SEC ID NO: 2)	combinación hnRNP-D/hnRNP-DL (81-420; SEC ID NO: 5)
Sensibilidad	21	21	4	43
Especificidad	96	96	96	92
Exactitud	30	41	36	60

**Tabla 6:** Precisión, especificidad y sensibilidad para los ensayos de detección con respecto al SLE.

	hnRNP-D	hnRNP-DL (81-420; SEC ID NO: 5)	hnRNP-DL (120-420; SEC ID NO: 2)	combinación hnRNP-D/hnRNP-DL (81-420; SEC ID NO: 5)
Sensibilidad	30	46	15	48
Especificidad	96	96	96	92
Exactitud	48	63	43	63

30 **Ejemplo 2: Relevancia de hnRNP-DL en el diagnóstico temprano**

35 Un diagnóstico temprano de la artritis reumatoide (RA) puede evitar la pérdida del movimiento y el daño a las articulaciones. El diagnóstico común en suero de la RA (factores reumatoides y PCR) no es suficiente por sí solo porque los factores reumáticos son demasiado inespecíficos (también se pueden encontrar pruebas de otras enfermedades e infecciones autoinmunitarias). A su vez, los anticuerpos contra los péptidos citrulinados cíclicos (CCP) aparecen casi exclusivamente en pacientes con artritis reumática (especificidad de hasta el 98%). Sin embargo, hasta el 30% de los pacientes con RA temprana presentan sueros negativos a RF y/o CCP. La

detección de anticuerpos hnRNP-DL conduce a un diagnóstico para la mayor parte de estos pacientes.

Las ventajas de la presente invención son un diagnóstico fiable y la diferenciación de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias que muestran manifestaciones reumáticas, tales como pacientes con artritis psoriásica, esclerodermia, espondiloartropatías, síndrome de Sjögren y diagnosticados erróneamente con SLE cuando padecían RA, o pacientes con artritis no diferenciada y otras formas de artritis inflamatoria, o artritis reactiva u osteoartritis, una enfermedad de las articulaciones principalmente degenerativa. También posibilita diagnosticar artritis reumatoide en pacientes con artritis temprana potencialmente en una etapa temprana de la enfermedad antes de la destrucción excesiva de tejido.

Tabla 7: Análisis de diversos hnRNP en forma citrulinada y sin modificar en artritis reumatoide temprana

RA temprana (<12 meses)	sensibilidad (%)	especificidad (%)
RF (anticuerpo anti-IgG de tipo IgM) (> 20 IU/ml)	76	89
Anti-CCP	69	98
Anti-hnRNP-DL	37	96
Anti-hnRNP-B1	28	90
Anti-hnRNP-D	21	96
Anti-cit-hnRNP-DL	74	96
Anti-cit-hnRNP-B 1	58	90
Anti-cit-hnRNP-D	52	96

Se encontró que los anticuerpos anti-hnRNP-DL se producen independientemente de anti-CCP y RF en la fase temprana de la artritis reumatoide. El diagnóstico y la detección pueden realizarse años antes de la aparición de los síntomas clínicos.

Se analizaron un total de 92 muestras de pacientes con el procedimiento según la invención. Más tarde, se determinó que todos estos pacientes tenían una RA verificada clínicamente y temprana. El 80% de los sueros fueron positivos para anticuerpos contra RF y CCP. El 80,5% de los sueros fueron positivos para anticuerpos contra hnRNP-DL y CCP. El 76% fueron positivos para anticuerpos contra hnRNP-DL, -D y hnRNP-B1. El 91% de los pacientes positivos a RA se detectan utilizando los marcadores RF, CCP y hnRNP-DL. El 93% de los pacientes positivos a RA se detectan utilizando los marcadores RF, CCP y cit-hnRNP-DL (citrulinado). El 97% de los pacientes positivos a RA se detectan utilizando los marcadores RF, CCP, hnRNP-DL, -D y hnRNP-B1. Sin embargo, el 98,9% de los pacientes positivos a RA se detectan mediante los marcadores hnRNP-DL citrulinado, hnRNP-D citrulinado y hnRNP-B1 citrulinado.

**Listado de secuencias**

- <110> Max-Planck-Gesellschaft
- <120> Predicción diagnóstica de artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico
- <130> P2762 PCT BLN
- <150> EP08172784.4
- <151> 2008-12-23
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 420
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1



# ES 2 703 999 T3

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

ES 2 703 999 T3

	165					170					175				
Cys	Thr	Ile	Lys	Thr	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly
			180					185					190		
Phe	Val	Leu	Phe	Lys	Asp	Ala	Ala	Ser	Val	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	Leu
		195					200					205			
Lys	Glu	His	Lys	Leu	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	Asp	Pro	Lys	Arg	Ala	Lys
	210					215					220				
Ala	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	Pro	Lys	Lys	Val	Phe	Val	Gly	Gly	Leu
225					230					235					240
Ser	Pro	Asp	Thr	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Lys	Glu	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe
				245					250						255
Gly	Glu	Ile	Glu	Asn	Ile	Glu	Leu	Pro	Met	Asp	Thr	Lys	Thr	Asn	Glu
			260					265						270	
Arg	Arg	Gly	Phe	Cys	Phe	Ile	Thr	Tyr	Thr	Asp	Glu	Glu	Pro	Val	Lys
		275					280							285	
Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Arg	Tyr	His	Gln	Ile	Gly	Ser	Gly	Lys	Cys	Glu
	290					295					300				
Ile	Lys	Val	Ala	Gln	Pro	Lys	Glu	Val	Tyr	Arg	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
305					310					315					320
Gln	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Thr	Arg
				325					330						335
Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gln	Gly	Gln	Asn	Tyr	Asn	Gln	Gly	Phe	Asn	Asn
			340					345					350		
Tyr	Tyr	Asp	Gln	Gly	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Tyr	Gly	Gly	Asp
		355					360						365		
Gln	Asn	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Asn	Tyr
	370					375					380				
Gly	Asn	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Gln	Gly	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Ser	Gly	Gln	Gln
385					390					395					400
Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Gln	Asn	Asn
				405					410					415	
Tyr	Gln	Pro	Tyr												

420

ES 2 703 999 T3

<211> 301  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

Met Glu Asp Met Asn Glu Tyr Ser Asn Ile Glu Glu Phe Ala Glu Gly  
 1 5 10 15

Ser Lys Ile Asn Ala Ser Lys Asn Gln Gln Asp Asp Gly Lys Met Phe  
 20 25 30

Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Ser Lys Lys Asp Leu Thr Glu Tyr  
 35 40 45

Leu Ser Arg Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Ile Lys Thr Asp Pro  
 50 55 60

Val Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu Phe Lys Asp Ala  
 65 70 75 80

Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Glu Leu Lys Glu His Lys Leu Asp Gly  
 85 90 95

Lys Leu Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Leu Lys Gly Lys Glu Pro  
 100 105 110

Pro Lys Lys Val Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp Thr Ser Glu Glu  
 115 120 125

Gln Ile Lys Glu Tyr Phe Gly Ala Phe Gly Glu Ile Glu Asn Ile Glu  
 130 135 140

Leu Pro Met Asp Thr Lys Thr Asn Glu Arg Arg Gly Phe Cys Phe Ile  
 145 150 155 160

Thr Tyr Thr Asp Glu Glu Pro Val Lys Lys Leu Leu Glu Ser Arg Tyr  
 165 170 175

His Gln Ile Gly Ser Gly Lys Cys Glu Ile Lys Val Ala Gln Pro Lys  
 180 185 190

Glu Val Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln Lys Gly Gly Arg Gly Ala  
 195 200 205

Ala Ala Gly Gly Arg Gly Gly Thr Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gln Gly  
 210 215 220

ES 2 703 999 T3

Gln Asn Trp Asn Gln Gly Phe Asn Asn Tyr Tyr Asp Gln Gly Tyr Gly  
225 230 235 240

Asn Tyr Asn Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr Gly  
245 250 255

Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Tyr Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Tyr Gly Gln  
260 265 270

Gly Tyr Ala Asp Tyr Ser Gly Gln Gln Ser Thr Tyr Gly Lys Ala Ser  
275 280 285

Arg Gly Gly Gly Asn His Gln Asn Asn Tyr Gln Pro Tyr  
290 295 300

<210> 3  
<211> 244  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Asp Met Asn Glu Tyr Ser Asn Ile Glu Glu Phe Ala Glu Gly  
1 5 10 15

Ser Lys Ile Asn Ala Ser Lys Asn Gln Gln Asp Asp Gly Lys Met Phe  
20 25 30

Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Ser Lys Lys Asp Leu Thr Glu Tyr  
35 40 45

Leu Ser Arg Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Ile Lys Thr Asp Pro  
50 55 60

Val Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu Phe Lys Asp Ala  
65 70 75 80

Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Glu Leu Lys Glu His Lys Leu Asp Gly  
85 90 95

Lys Leu Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Leu Lys Gly Lys Glu Pro  
100 105 110

Pro Lys Lys Val Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp Thr Ser Glu Glu  
115 120 125

Gln Ile Lys Glu Tyr Phe Gly Ala Phe Gly Glu Ile Glu Asn Ile Glu  
130 135 140

10 Leu Pro Met Asp Thr Lys Thr Asn Glu Arg Arg Gly Phe Cys Phe Ile

ES 2 703 999 T3

145 150 155 160

Thr Tyr Thr Asp Glu Glu Pro Val Lys Lys Leu Leu Glu Ser Arg Tyr  
165 170 175

His Gln Ile Gly Ser Gly Lys Cys Glu Ile Lys Val Ala Gln Pro Lys  
180 185 190

Glu Val Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln Lys Gly Gly Arg Gly Ala  
195 200 205

Ala Ala Gly Gly Arg Gly Gly Thr Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gln Gln  
210 215 220

Ser Thr Tyr Gly Lys Ala Ser Arg Gly Gly Gly Asn His Gln Asn Asn  
225 230 235 240

Tyr Gln Pro Tyr

<210> 4

<211> 298

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Glu Tyr Ser Asn Ile Glu Glu Phe Ala Glu Gly Ser Lys Ile  
1 5 10 15

Asn Ala Ser Lys Asn Gln Gln Asp Asp Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly  
20 25 30

Leu Ser Trp Asp Thr Ser Lys Lys Asp Leu Thr Glu Tyr Leu Ser Arg  
35 40 45

Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Ile Lys Thr Asp Pro Val Thr Gly  
50 55 60

Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu Phe Lys Asp Ala Ala Ser Val  
65 70 75 80

Asp Lys Val Leu Glu Leu Lys Glu His Lys Leu Asp Gly Lys Leu Ile  
85 90 95

Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Leu Lys Gly Lys Glu Pro Pro Lys Lys  
100 105 110

Val Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys  
115 120 125

10

ES 2 703 999 T3

Glu Tyr Phe Gly Ala Phe Gly Glu Ile Glu Asn Ile Glu Leu Pro Met  
 130 135 140

Asp Thr Lys Thr Asn Glu Arg Arg Gly Phe Cys Phe Ile Thr Tyr Thr  
 145 150 155 160

Asp Glu Glu Pro Val Lys Lys Leu Leu Glu Ser Arg Tyr His Gln Ile  
 165 170 175

Gly Ser Gly Lys Cys Glu Ile Lys Val Ala Gln Pro Lys Glu Val Tyr  
 180 185 190

Arg Gln Gln Gln Gln Gln Lys Gly Gly Arg Gly Ala Ala Ala Gly  
 195 200 205

Gly Arg Gly Gly Thr Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gln Gly Gln Asn Trp  
 210 215 220

Asn Gln Gly Phe Asn Asn Tyr Tyr Asp Gln Gly Tyr Gly Asn Tyr Asn  
 225 230 235 240

Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr Gly Gly Tyr Asp  
 245 250 255

Tyr Thr Gly Tyr Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Ala  
 260 265 270

Asp Tyr Ser Gly Gln Gln Ser Thr Tyr Gly Lys Ala Ser Arg Gly Gly  
 275 280 285

Gly Asn His Gln Asn Asn Tyr Gln Pro Tyr  
 290 295

<210> 5  
 <211> 340  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Arg Pro Asp Leu Phe Arg Arg His Phe Lys Ser Ser Ser Ile Gln  
 1 5 10 15

Arg Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Arg Thr Ala Arg Gln His Pro  
 20 25 30

Pro Ala Asp Ser Ser Val Thr Met Glu Asp Met Asn Glu Tyr Ser Asn  
 35 40 45

10 Ile Glu Glu Phe Ala Glu Gly Ser Lys Ile Asn Ala Ser Lys Asn Gln

ES 2 703 999 T3

50 55 60

Gln Asp Asp Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Ser  
65 70 75 80

Lys Lys Asp Leu Thr Glu Tyr Leu Ser Arg Phe Gly Glu Val Val Asp  
85 90 95

Cys Thr Ile Lys Thr Asp Pro Val Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly  
100 105 110

Phe Val Leu Phe Lys Asp Ala Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Glu Leu  
115 120 125

Lys Glu His Lys Leu Asp Gly Lys Leu Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys  
130 135 140

Ala Leu Lys Gly Lys Glu Pro Pro Lys Lys Val Phe Val Gly Gly Leu  
145 150 155 160

Ser Pro Asp Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Tyr Phe Gly Ala Phe  
165 170 175

Gly Glu Ile Glu Asn Ile Glu Leu Pro Met Asp Thr Lys Thr Asn Glu  
180 185 190

Arg Arg Gly Phe Cys Phe Ile Thr Tyr Thr Asp Glu Glu Pro Val Lys  
195 200 205

Lys Leu Leu Glu Ser Arg Tyr His Gln Ile Gly Ser Gly Lys Cys Glu  
210 215 220

Ile Lys Val Ala Gln Pro Lys Glu Val Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln  
225 230 235 240

Gln Lys Gly Gly Arg Gly Ala Ala Ala Gly Gly Arg Gly Gly Thr Arg  
245 250 255

Gly Arg Gly Arg Gly Gln Gly Gln Asn Trp Asn Gln Gly Phe Asn Asn  
260 265 270

Tyr Tyr Asp Gln Gly Tyr Gly Asn Tyr Asn Ser Ala Tyr Gly Gly Asp  
275 280 285

Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr Gly Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Tyr Asn Tyr  
290 295 300

Gly Asn Tyr Gly Tyr Gly Gln Gly Tyr Ala Asp Tyr Ser Gly Gln Gln

ES 2 703 999 T3

305 310 315 320

Ser Thr Tyr Gly Lys Ala Ser Arg Gly Gly Gly Asn His Gln Asn Asn  
 325 330 335

Tyr Gln Pro Tyr  
 340

<210> 6

<211> 341

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Arg Glu Lys Glu Gln Phe Arg Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu  
 1 5 10 15

Ser Phe Glu Thr Thr Glu Glu Ser Leu Arg Asn Tyr Tyr Glu Gln Trp  
 20 25 30

Gly Lys Leu Thr Asp Cys Val Val Met Arg Asp Pro Ala Ser Lys Arg  
 35 40 45

Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Ala Glu Val Asp  
 50 55 60

Ala Ala Met Ala Ala Arg Pro His Ser Ile Asp Gly Arg Val Val Glu  
 65 70 75 80

Pro Lys Arg Ala Val Ala Arg Glu Glu Ser Gly Lys Pro Gly Ala His  
 85 90 95

Val Thr Val Lys Lys Leu Phe Val Gly Gly Ile Lys Glu Asp Thr Glu  
 100 105 110

Glu His His Leu Arg Asp Tyr Phe Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Asp Thr  
 115 120 125

Ile Glu Ile Ile Thr Asp Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Gly Phe Gly  
 130 135 140

Phe Val Thr Phe Asp Asp His Asp Pro Val Asp Lys Ile Val Leu Gln  
 145 150 155 160

Lys Tyr His Thr Ile Asn Gly His Asn Ala Glu Val Arg Lys Ala Leu  
 165 170 175

Ser Arg Gln Glu Met Gln Glu Val Gln Ser Ser Arg Ser Gly Arg Gly  
 180 185 190

10



ES 2 703 999 T3

Gly Asn Phe Gly Phe Gly Asp Ser Arg Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly  
 195 200 205

Pro Gly Pro Gly Ser Asn Phe Arg Gly Gly Ser Asp Gly Tyr Gly Ser  
 210 215 220

Gly Arg Gly Phe Gly Asp Gly Tyr Asn Gly Tyr Gly Gly Gly Pro Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Asn Phe Gly Gly Ser Pro Gly Tyr Gly Gly Gly Arg Gly Gly  
 245 250 255

Tyr Gly Gly Gly Gly Pro Gly Tyr Gly Asn Gln Gly Gly Gly Tyr Gly  
 260 265 270

Gly Gly Tyr Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr  
 275 280 285

Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Gln Gln Pro Ser Asn Tyr Gly Pro Met  
 290 295 300

Lys Ser Gly Asn Phe Gly Gly Ser Arg Asn Met Gly Gly Pro Tyr Gly  
 305 310 315 320

Gly Gly Asn Tyr Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly  
 325 330 335

Gly Arg Ser Arg Tyr  
 340

<210> 7  
 <211> 353  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Lys Thr Leu Glu Thr Val Pro Leu Glu Arg Lys Lys Arg Glu  
 1 5 10 15

Lys Glu Gln Phe Arg Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr  
 20 25 30

Thr Glu Glu Ser Leu Arg Asn Tyr Tyr Glu Gln Trp Gly Lys Leu Thr  
 35 40 45

Asp Cys Val Val Met Arg Asp Pro Ala Ser Lys Arg Ser Arg Gly Phe  
 50 55 60

10 Gly Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Ala Glu Val Asp Ala Ala Met Ala

# ES 2 703 999 T3

65	70	75	80
Ala Arg Pro His Ser Ile Asp Gly Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala	85	90	95
Val Ala Arg Glu Glu Ser Gly Lys Pro Gly Ala His Val Thr Val Lys	100	105	110
Lys Leu Phe Val Gly Gly Ile Lys Glu Asp Thr Glu Glu His His Leu	115	120	125
Arg Asp Tyr Phe Glu Glu Tyr Gly Lys Ile Asp Thr Ile Glu Ile Ile	130	135	140
Thr Asp Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe	145	150	155
Asp Asp His Asp Pro Val Asp Lys Ile Val Leu Gln Lys Tyr His Thr	165	170	175
Ile Asn Gly His Asn Ala Glu Val Arg Lys Ala Leu Ser Arg Gln Glu	180	185	190
Met Gln Glu Val Gln Ser Ser Arg Ser Gly Arg Gly Gly Asn Phe Gly	195	200	205
Phe Gly Asp Ser Arg Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Pro Gly Pro Gly	210	215	220
Ser Asn Phe Arg Gly Gly Ser Asp Gly Tyr Gly Ser Gly Arg Gly Phe	225	230	235
Gly Asp Gly Tyr Asn Gly Tyr Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Asn Phe	245	250	255
Gly Gly Ser Pro Gly Tyr Gly Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Gly	260	265	270
Gly Pro Gly Tyr Gly Asn Gln Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Asp	275	280	285
Asn Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Asn Asp Phe Gly	290	295	300
Asn Tyr Asn Gln Gln Pro Ser Asn Tyr Gly Pro Met Lys Ser Gly Asn	305	310	315
Phe Gly Gly Ser Arg Asn Met Gly Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr			

ES 2 703 999 T3

325

330

335

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Arg Ser Arg  
 340 345 350

Tyr

<210> 8

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Ser Glu Glu Gln Phe Gly Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr  
 1 5 10 15

Ala Ala Val Gly Gly Ser Ala Gly Glu Gln Glu Gly Ala Met Val Ala  
 20 25 30

Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Gly Thr Gly  
 35 40 45

Gly Gly Thr Ala Ser Gly Gly Thr Glu Gly Gly Ser Ala Glu Ser Glu  
 50 55 60

Gly Ala Lys Ile Asp Ala Ser Lys Asn Glu Glu Asp Glu Gly His Ser  
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Pro Arg His Ser Glu Ala Ala Thr Ala Gln Arg Glu Glu  
 85 90 95

Trp Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Thr Lys Lys Asp  
 100 105 110

Leu Lys Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Leu  
 115 120 125

Lys Leu Asp Pro Ile Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu  
 130 135 140

Phe Lys Glu Ser Glu Ser Val Asp Lys Val Met Asp Gln Lys Glu His  
 145 150 155 160

Lys Leu Asn Gly Lys Val Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Met Lys  
 165 170 175

Thr Lys Glu Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp  
 180 185 190

10

ES 2 703 999 T3

Thr Pro Glu Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Gly Phe Gly Glu Val  
 195 200 205

Glu Ser Ile Glu Leu Pro Met Asp Asn Lys Thr Asn Lys Arg Arg Gly  
 210 215 220

Phe Cys Phe Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val Lys Lys Ile Met  
 225 230 235 240

Glu Lys Lys Tyr His Asn Val Gly Leu Ser Lys Cys Glu Ile Lys Val  
 245 250 255

Ala Met Ser Lys Glu Gln Tyr Gln Gln Gln Gln Trp Gly Ser Arg  
 260 265 270

Gly Gly Phe Ala Gly Arg Ala Arg Gly Arg Gly Gly Gly Pro Ser Gln  
 275 280 285

Asn Trp Asn Gln Gly Tyr Ser Asn Tyr Trp Asn Gln Gly Tyr Gly Asn  
 290 295 300

Tyr Gly Tyr Asn Ser Gln Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Asp Tyr  
 305 310 315 320

Thr Gly Tyr Asn Asn Tyr Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Asn Gln Gln  
 325 330 335

Ser Gly Tyr Gly Lys Val Ser Arg Arg Gly Gly His Gln Asn Ser Tyr  
 340 345 350

Lys Pro Tyr  
 355

<210> 9  
 <211> 336  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Glu Glu Gln Phe Gly Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr  
 1 5 10 15

Ala Ala Val Gly Gly Ser Ala Gly Glu Gln Glu Gly Ala Met Val Ala  
 20 25 30

Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Gly Thr Gly  
 35 40 45

10 Gly Gly Thr Ala Ser Gly Gly Thr Glu Gly Gly Ser Ala Glu Ser Glu

# ES 2 703 999 T3

50	55	60
Gly Ala Lys Ile Asp 65	Ala Ser Lys Asn Glu 70	Glu Asp Glu Gly Lys Met 75 80
Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Asp 85		90 95
Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Leu Lys Leu Asp 100		105 110
Pro Ile Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu Phe Lys Glu 115		120 125
Ser Glu Ser Val Asp Lys Val Met Asp Gln Lys Glu His Lys Leu Asn 130		135 140
Gly Lys Val Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Met Lys Thr Lys Glu 145		150 155 160
Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp Thr Pro Glu 165		170 175
Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Gly Phe Gly Glu Val Glu Ser Ile 180		185 190
Glu Leu Pro Met Asp Asn Lys Thr Asn Lys Arg Arg Gly Phe Cys Phe 195		200 205
Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val Lys Lys Ile Met Glu Lys Lys 210		215 220
Tyr His Asn Val Gly Leu Ser Lys Cys Glu Ile Lys Val Ala Met Ser 225		230 235 240
Lys Glu Gln Tyr Glc Gln Gln Gln Gln Trp Gly Ser Arg Gly Gly Phe 245		250 255
Ala Gly Arg Ala Arg Gly Arg Gly Gly Gly Pro Ser Gln Asn Trp Asn 260		265 270
Gln Gly Tyr Ser Asn Tyr Trp Asn Gln Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Tyr 275		280 285
Asn Ser Gln Gly Tyr Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Tyr 290		295 300
Asn Asn Tyr Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Asn Gln Gln Ser Gly Tyr 305		310 315 320
Gly Lys Val Ser Arg Arg Gly Gly His Gln Asn Ser Tyr Lys Pro Tyr 325		330 335

ES 2 703 999 T3

<210> 10  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10

Met Ser Glu Glu Gln Phe Gly Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr  
 1 5 10 15

Ala Ala Val Gly Gly Ser Ala Gly Glu Gln Glu Gly Ala Met Val Ala  
 20 25 30

Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Gly Thr Gly  
 35 40 45

Gly Gly Thr Ala Ser Gly Gly Thr Glu Gly Gly Ser Ala Glu Ser Glu  
 50 55 60

Gly Ala Lys Ile Asp Ala Ser Lys Asn Glu Glu Asp Glu Gly His Ser  
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Pro Arg His Ser Glu Ala Ala Thr Ala Gln Arg Glu Glu  
 85 90 95

Trp Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Thr Lys Lys Asp  
 100 105 110

Leu Lys Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Leu  
 115 120 125

Lys Leu Asp Pro Ile Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu  
 130 135 140

Phe Lys Glu Ser Glu Ser Val Asp Lys Val Met Asp Gln Lys Glu His  
 145 150 155 160

Lys Leu Asn Gly Lys Val Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Met Lys  
 165 170 175

Thr Lys Glu Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp  
 180 185 190

Thr Pro Glu Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Gly Phe Gly Glu Val  
 195 200 205

ES 2 703 999 T3

Glu Ser Ile Glu Leu Pro Met Asp Asn Lys Thr Asn Lys Arg Arg Gly  
 210 215 220

Phe Cys Phe Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val Lys Lys Ile Met  
 225 230 235 240

Glu Lys Lys Tyr His Asn Val Gly Leu Ser Lys Cys Glu Ile Lys Val  
 245 250 255

Ala Met Ser Lys Glu Gln Tyr Gln Gln Gln Gln Trp Gly Ser Arg  
 260 265 270

Gly Gly Phe Ala Gly Arg Ala Arg Gly Arg Gly Gly Asp Gln Gln Ser  
 275 280 285

Gly Tyr Gly Lys Val Ser Arg Arg Gly Gly His Gln Asn Ser Tyr Lys  
 290 295 300

Pro Tyr  
 305

<210> 11  
 <211> 287  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Glu Glu Gln Phe Gly Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr  
 1 5 10 15

Ala Ala Val Gly Gly Ser Ala Gly Glu Gln Glu Gly Ala Met Val Ala  
 20 25 30

Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ala Gly Thr Gly  
 35 40 45

Gly Gly Thr Ala Ser Gly Gly Thr Glu Gly Gly Ser Ala Glu Ser Glu  
 50 55 60

Gly Ala Lys Ile Asp Ala Ser Lys Asn Glu Glu Asp Glu Gly Lys Met  
 65 70 75 80

Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Asp Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Asp  
 85 90 95

Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Val Val Asp Cys Thr Leu Lys Leu Asp  
 100 105 110

10 Pro Ile Thr Gly Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Leu Phe Lys Glu

ES 2 703 999 T3

115 120 125

Ser Glu Ser Val Asp Lys Val Met Asp Gln Lys Glu His Lys Leu Asn  
 130 135 140

Gly Lys Val Ile Asp Pro Lys Arg Ala Lys Ala Met Lys Thr Lys Glu  
 145 150 155 160

Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Leu Ser Pro Asp Thr Pro Glu  
 165 170 175

Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Gly Phe Gly Glu Val Glu Ser Ile  
 180 185 190

Glu Leu Pro Met Asp Asn Lys Thr Asn Lys Arg Arg Gly Phe Cys Phe  
 195 200 205

Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val Lys Lys Ile Met Glu Lys Lys  
 210 215 220

Tyr His Asn Val Gly Leu Ser Lys Cys Glu Ile Lys Val Ala Met Ser  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Tyr Gln Gln Gln Gln Gln Trp Gly Ser Arg Gly Gly Phe  
 245 250 255

Ala Gly Arg Ala Arg Gly Arg Gly Gly Asp Gln Gln Ser Gly Tyr Gly  
 260 265 270

Lys Val Ser Arg Arg Gly Gly His Gln Asn Ser Tyr Lys Pro Tyr  
 275 280 285

<210> 12  
 <211> 378  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

Gln Leu Arg Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr Thr Asp  
 35 40 45

Asp Ser Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Trp Gly Thr Leu Thr Asp Cys  
 50 55 60

5

10



ES 2 703 999 T3

Val Val Met Arg Asp Pro Gln Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe  
65 70 75 80

Val Thr Tyr Ser Cys Val Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Cys Ala Arg  
85 90 95

Pro His Lys Val Asp Gly Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala Val Ser  
100 105 110

Arg Glu Asp Ser Val Lys Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile  
115 120 125

Phe Val Gly Gly Ile Lys Glu Asp Thr Glu Glu Tyr Asn Leu Arg Asp  
130 135 140

Tyr Phe Glu Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Thr Ile Glu Val Met Glu Asp  
145 150 155 160

Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Gly Phe Ala Phe Val Thr Phe Asp Asp  
165 170 175

His Asp Thr Val Asp Lys Ile Val Val Gln Lys Tyr His Thr Ile Asn  
180 185 190

Gly His Asn Cys Glu Val Lys Lys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Met Gln  
195 200 205

Ser Ala Gly Ser Gln Arg Gly Arg Gly Gly Gly Ser Gly Asn Phe Met  
210 215 220

Gly Arg Gly Gly Asn Phe Gly Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Arg Gly  
225 230 235 240

Gly Asn Phe Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
245 250 255

Arg Gly Ser Tyr Gly Gly Gly Asp Gly Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Gly  
260 265 270

Asp Gly Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Pro Gly Tyr Ser Ser Arg Gly Gly  
275 280 285

Tyr Gly Gly Gly Gly Pro Gly Tyr Gly Asn Gln Gly Gly Gly Tyr Gly  
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Asn Gln Gly Gly Asn Phe Gly Gly  
305 310 315 320

ES 2 703 999 T3

Gly Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Ser  
 325 330 335

Gly Gln Gln Gln Ser Asn Tyr Gly Pro Met Lys Gly Gly Ser Phe Gly  
 340 345 350

Gly Arg Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Ser Arg Arg Phe  
 370 375

<210> 13

<211> 356

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr Thr Asp Asp Ser Leu Arg Glu His  
 20 25 30

Phe Glu Lys Trp Gly Thr Leu Thr Asp Cys Val Val Met Arg Asp Pro  
 35 40 45

Gln Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ser Cys Val  
 50 55 60

Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Cys Ala Arg Pro His Lys Val Asp Gly  
 65 70 75 80

Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala Val Ser Arg Glu Asp Ser Val Lys  
 85 90 95

Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Ile Lys  
 100 105 110

Glu Asp Thr Glu Glu Tyr Asn Leu Arg Asp Tyr Phe Glu Lys Tyr Gly  
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Ile Glu Val Met Glu Asp Arg Gln Ser Gly Lys Lys  
 130 135 140

Arg Gly Phe Ala Phe Val Thr Phe Asp Asp His Asp Thr Val Asp Lys  
 145 150 155 160

10 Ile Val Val Gln Lys Tyr His Thr Ile Asn Gly His Asn Cys Glu Val

ES 2 703 999 T3

165

170

175

Lys Lys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Met Gln Ser Ala Gly Ser Gln Arg  
180 185 190

Gly Arg Gly Gly Gly Ser Gly Asn Phe Met Gly Arg Gly Gly Asn Phe  
195 200 205

Gly Gly Gly Gly Gly Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn Phe Gly Gly Arg  
210 215 220

Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Asp Gly Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Gly Asp Gly Gly Asn Tyr Gly  
245 250 255

Gly Gly Pro Gly Tyr Ser Ser Arg Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Gly Pro  
260 265 270

Gly Tyr Gly Asn Gln Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp  
275 280 285

Gly Tyr Asn Glu Gly Gly Asn Phe Gly Gly Gly Asn Tyr Gly Gly Gly  
290 295 300

Gly Asn Tyr Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Ser Gly Gln Gln Gln Ser Asn  
305 310 315 320

Tyr Gly Pro Met Lys Gly Gly Ser Phe Gly Gly Arg Ser Ser Gly Ser  
325 330 335

Pro Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly  
340 345 350

Ser Arg Arg Phe  
355

- <210> 14
- <211> 320
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ser Lys Ser Glu Ser Pro Lys Glu Pro Glu Gln Leu Arg Lys Leu  
1 5 10 15

Phe Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr Thr Asp Glu Ser Leu Arg Ser  
20 25 30

5

10

# ES 2 703 999 T3

His Phe Glu Gln Trp Gly Thr Leu Thr Asp Cys Val Val Met Arg Asp  
 35 40 45

Pro Asn Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ala Thr  
 50 55 60

Val Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Asn Ala Arg Pro His Lys Val Asp  
 65 70 75 80

Gly Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala Val Ser Arg Glu Asp Ser Gln  
 85 90 95

Arg Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Ile  
 100 105 110

Lys Glu Asp Thr Glu Glu His His Leu Arg Asp Tyr Phe Glu Gln Tyr  
 115 120 125

Gly Lys Ile Glu Val Ile Glu Ile Met Thr Asp Arg Gly Ser Gly Lys  
 130 135 140

Lys Arg Gly Phe Ala Phe Val Thr Phe Asp Asp His Asp Ser Val Asp  
 145 150 155 160

Lys Ile Val Ile Gln Lys Tyr His Thr Val Asn Gly His Asn Cys Glu  
 165 170 175

Val Arg Lys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Met Ala Ser Ala Ser Ser Ser  
 180 185 190

Gln Arg Gly Arg Ser Gly Ser Gly Asn Phe Gly Gly Gly Arg Gly Gly  
 195 200 205

Gly Phe Gly Gly Asn Asp Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn Phe Ser Gly  
 210 215 220

Arg Gly Gly Phe Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Ser  
 225 230 235 240

Gly Asp Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Asn Asp Gly Ser Asn Phe Gly Gly  
 245 250 255

Gly Gly Ser Tyr Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Asn Gln Ser Ser Asn  
 260 265 270

Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly Arg Ser Ser Gly Pro  
 275 280 285

Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro Arg Asn Gln Gly Gly  
 290 295 300

Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Gly Arg Arg Phe  
 305 310 315 320

ES 2 703 999 T3

<210> 15  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

Met Ser Lys Ser Glu Ser Pro Lys Glu Pro Glu Gln Leu Arg Lys Leu  
 1 5 10 15

Phe Ile Gly Gly Leu Ser Phe Glu Thr Thr Asp Glu Ser Leu Arg Ser  
 20 25 30

His Phe Glu Gln Trp Gly Thr Leu Thr Asp Cys Val Val Met Arg Asp  
 35 40 45

Pro Asn Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Tyr Ala Thr  
 50 55 60

Val Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Asn Ala Arg Pro His Lys Val Asp  
 65 70 75 80

Gly Arg Val Val Glu Pro Lys Arg Ala Val Ser Arg Glu Asp Ser Gln  
 85 90 95

Arg Pro Gly Ala His Leu Thr Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly Ile  
 100 105 110

Lys Glu Asp Thr Glu Glu His His Leu Arg Asp Tyr Phe Glu Gln Tyr  
 115 120 125

Gly Lys Ile Glu Val Ile Glu Ile Met Thr Asp Arg Gly Ser Gly Lys  
 130 135 140

Lys Arg Gly Phe Ala Phe Val Thr Phe Asp Asp His Asp Ser Val Asp  
 145 150 155 160

Lys Ile Val Ile Gln Lys Tyr His Thr Val Asn Gly His Asn Cys Glu  
 165 170 175

Val Arg Lys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Met Ala Ser Ala Ser Ser Ser  
 180 185 190

Gln Arg Gly Arg Ser Gly Ser Gly Asn Phe Gly Gly Gly Arg Gly Gly

10

# ES 2 703 999 T3

```

      195              200              205
Gly Phe Gly Gly Asn Asp Asn Phe Gly Arg Gly Gly Asn Phe Ser Gly
 210              215              220

Arg Gly Gly Phe Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Ser
225              230              235              240

Gly Asp Gly Tyr Asn Gly Phe Gly Asn Asp Gly Gly Tyr Gly Gly Gly
 245              250              255

Gly Pro Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Arg Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gln
 260              265              270

Gly Tyr Gly Asn Gln Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Asp
 275              280              285

Ser Tyr Asn Asn Gly Gly Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 290              295              300

Asn Phe Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Asn Asp Phe Gly Asn Tyr Asn Asn
305              310              315              320

Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly Arg
 325              330              335

Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro Arg
 340              345              350

Asn Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Gly Ser
 355              360              365

Gly Arg Arg Phe
 370

```

```

<210> 16
<211> 332
5 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

```

```

<400> 16

```

```

Met Ser Glu Ala Gly Glu Glu Gln Pro Met Glu Thr Thr Gly Ala Thr
 1              5              10              15

Glu Asn Gly His Glu Ala Val Pro Glu Gly Glu Ser Pro Ala Gly Ala
 20              25              30

Gly Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Pro Pro
 35              40              45

```

10

ES 2 703 999 T3

Ser Gly Asn Gln Asn Gly Ala Glu Gly Asp Gln Ile Asn Ala Ser Lys  
50 55 60

Asn Glu Glu Asp Ala Gly Lys Met Phe Val Gly Gly Leu Ser Trp Asp  
65 70 75 80

Thr Ser Lys Lys Asp Leu Lys Asp Tyr Phe Thr Lys Phe Gly Glu Val  
85 90 95

Val Asp Cys Thr Ile Lys Met Asp Pro Asn Thr Gly Arg Ser Arg Gly  
100 105 110

Phe Gly Phe Ile Leu Phe Lys Asp Ala Ala Ser Val Glu Lys Val Leu  
115 120 125

Asp Gln Lys Glu His Arg Leu Asp Gly Arg Val Ile Asp Pro Lys Lys  
130 135 140

Ala Met Ala Met Lys Lys Asp Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly  
145 150 155 160

Leu Asn Pro Glu Ala Thr Glu Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Glu  
165 170 175

Phe Gly Glu Ile Glu Ala Ile Glu Leu Pro Met Asp Pro Lys Leu Asn  
180 185 190

Lys Arg Arg Gly Phe Val Phe Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val  
195 200 205

Lys Lys Val Leu Glu Lys Lys Phe His Thr Val Ser Gly Ser Lys Cys  
210 215 220

Glu Ile Lys Val Ala Gln Pro Lys Glu Val Tyr Gln Gln Gln Gln Tyr  
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Arg Gly Asn Arg Asn Arg Gly Asn Arg Gly Ser Gly  
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Ser Gln Ser Trp Asn Gln Gly Tyr  
260 265 270

Gly Asn Tyr Trp Asn Gln Gly Tyr Gly Tyr Gln Gln Gly Tyr Gly Pro  
275 280 285

Gly Tyr Gly Gly Tyr Asp Tyr Ser Pro Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Gly  
290 295 300

Pro Gly Tyr Asp Tyr Ser Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Gly Lys Ser Gln  
305 310 315 320

Arg Arg Gly Gly His Gln Asn Asn Tyr Lys Pro Tyr  
325 330

5

<210> 17  
<211> 285

ES 2 703 999 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

5

Met Ser Glu Ala Gly Glu Glu Gln Pro Met Glu Thr Thr Gly Ala Thr  
 1 5 10 15

Glu Asn Gly His Glu Ala Val Pro Glu Gly Glu Ser Pro Ala Gly Ala  
 20 25 30

Gly Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Pro Pro  
 35 40 45

Ser Gly Asn Gln Asn Gly Ala Glu Gly Asp Gln Ile Asn Ala Ser Lys  
 50 55 60

Asn Glu Glu Asp Ala Gly Lys Met Phe Val Gly Gly Leu Ser Trp Asp  
 65 70 75 80

Thr Ser Lys Lys Asp Leu Lys Asp Tyr Phe Thr Lys Phe Gly Glu Val  
 85 90 95

Val Asp Cys Thr Ile Lys Met Asp Pro Asn Thr Gly Arg Ser Arg Gly  
 100 105 110

Phe Gly Phe Ile Leu Phe Lys Asp Ala Ala Ser Val Glu Lys Val Leu  
 115 120 125

Asp Gln Lys Glu His Arg Leu Asp Gly Arg Val Ile Asp Pro Lys Lys  
 130 135 140

Ala Met Ala Met Lys Lys Asp Pro Val Lys Lys Ile Phe Val Gly Gly  
 145 150 155 160

Leu Asn Pro Glu Ala Thr Glu Glu Lys Ile Arg Glu Tyr Phe Gly Glu  
 165 170 175

Phe Gly Glu Ile Glu Ala Ile Glu Leu Pro Met Asp Pro Lys Leu Asn  
 180 185 190

Lys Arg Arg Gly Phe Val Phe Ile Thr Phe Lys Glu Glu Glu Pro Val



# ES 2 703 999 T3

	195							200										205
Lys	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Lys	Phe	His	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Lys	Cys			
	210						215					220						
Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Gln	Pro	Lys	Glu	Val	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gln	Tyr			
225					230					235					240			
Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Gly	Asn	Arg	Asn	Arg	Gly	Asn	Arg	Gly	Ser	Gly			
				245					250					255				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Gly	Lys	Ser			
			260					265						270				
Gln	Arg	Arg	Gly	Gly	His	Gln	Asn	Asn	Tyr	Lys	Pro	Tyr						
		275					280							285				

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de determinación en una muestra de un sujeto de la presencia de dos o más anticuerpos que comprende:

- poner en contacto dicha muestra con:
  - i. un polipéptido similar a hnRNP-D (hnRNP-DL) citrulinado que comprende la secuencia de SEC ID nº: 5, y
  - ii. por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, y
- determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL citrulinado y determinar además si por lo menos un anticuerpo adicional está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dicho por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, y/o dicho CCP y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente.

2. Procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende:

- determinar en una muestra de dicho sujeto la presencia de:
  - i. un anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP-DL que comprende la secuencia de SEC ID nº: 5, y
  - ii. por lo menos otro anticuerpo que reconoce específicamente un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, en el que dicho otro polipéptido hnRNP comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 6 a 17, y/o un péptido citrulinado cíclico (CCP) y/o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG,

en el que la presencia de un anticuerpo que reconoce específicamente dicho polipéptido hnRNP-DL y por lo menos un anticuerpo adicional que reconoce específicamente dicho por lo menos otro polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, o dicho péptido CCP, o un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, respectivamente es indicativa de la presencia de la enfermedad autoinmunitaria en dicho sujeto.

3. Procedimiento para diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria según la reivindicación 2 caracterizado por que la muestra es proporcionada por un sujeto que se sospecha que presenta una enfermedad inmunitaria de fase temprana; en el que el sujeto no ha mostrado ningún síntoma durante más de 3 meses o la enfermedad autoinmunitaria no se ha diagnosticado durante más de 3 meses en dicho sujeto.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad reumática mediada inmunológicamente, preferentemente RA temprana, y/o la muestra es proporcionada por un sujeto que se sospecha que presenta una enfermedad reumática mediada inmunológicamente, preferentemente RA temprana.

5. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria sistémica, preferentemente el lupus eritematoso sistémico, y/o la muestra es proporcionada por un sujeto que se sospecha que presenta una enfermedad autoinmunitaria sistémica, preferentemente el lupus eritematoso sistémico.

6. Conjunto de proteínas que comprende:

- i. un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, en el que dicho polipéptido hnRNP-DL comprende por lo menos la secuencia de SEC ID nº: 5; y
- ii. por lo menos otro péptido seleccionado de entre el grupo que comprende un polipéptido hnRNP que no es homólogo de secuencia a dicho polipéptido hnRNP-DL, siendo seleccionado dicho hnRNP de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 6 a 17, opcionalmente citrulinado, respectivamente, un péptido cíclico citrulinado (CCP), un polipéptido que comprende por lo menos la parte Fc de IgG, MCV (vimentina citrulinada mutada), filagrina citrulinada, alfa-enolasa citrulinada y fibrinógeno citrulinado.

7. Kit de diagnóstico que comprende un conjunto de proteínas según la reivindicación 6.

8. Polipéptido hnRNP-DL citrulinado o composición que comprende el polipéptido hnRNP-DL citrulinado, en el que el hnRNP-DL citrulinado comprende la secuencia de SEC ID nº: 5.
- 5 9. Utilización de un conjunto de proteínas según la reivindicación 6, o un kit de diagnóstico según la reivindicación 7, o un polipéptido hnRNP-DL, o una composición que comprende el polipéptido hnRNP-DL citrulinado según la reivindicación 8 para predecir el desarrollo de RA en pacientes con artritis temprana, en la que el polipéptido hnRNP-DL comprende la secuencia de SEC ID nº: 5.
- 10 10. Procedimiento para evaluar la ausencia o la presencia de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende las etapas de
- determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de por lo menos
- 15 i. un anticuerpo contra un polipéptido hnRNP-DL citrulinado, comprendiendo el polipéptido hnRNP-DL la secuencia de SEC ID nº: 5;
- comparar el nivel determinado de dicho anticuerpo con el nivel respectivo en una muestra de un paciente que se sabe que padece la enfermedad autoinmunitaria o comparar el nivel con el nivel respectivo en una
- 20 muestra de un paciente que se sabe que no padece la enfermedad autoinmunitaria; y
- correlacionar los niveles determinados con la ausencia o la presencia de la enfermedad autoinmunitaria.
- 25 11. Procedimiento para el diagnóstico diferencial de artritis reumatoide y una enfermedad autoinmunitaria sistémica que comprende las etapas de
- poner en contacto una muestra de un sujeto con:
- 30 i. un primer polipéptido hnRNP que comprende la secuencia de SEC ID nº: 5, y
- ii. un segundo polipéptido hnRNP que es el mismo que el primero pero que está citrulinado (cit-hnRNP)
- determinar si un anticuerpo está presente en dicha muestra que reconoce específicamente dichos primer y segundo polipéptidos hnRNP y determinar además si la cantidad de anticuerpo unido a dicho primer polipéptido hnRNP es aproximadamente la misma que o inferior a la cantidad de anticuerpo unido a dicho
- 35 segundo polipéptido hnRNP, en el que puede diagnosticarse artritis reumatoide si la relación entre el anticuerpo unido a cit-hnRNP y el anticuerpo unido a hnRNP es 1.2 o superior.

Fig. 1

```

1   MEVPPRLSHV PPPLFPSAPA TLASRSLSHW RPRPPRQLAP LLPSLAPSSA
51  RQGARRAQRH VTAQQPSRLA GGAAIKGRRR RRPDLFRRHF KSSSIQRSAA
101 AAAATRTRARQ HPPADSSVTM EDMNEYSNIE EFAEGSKINA SKNQDDGKM
151 FIGGLSWDTS KKDLTEYLSR FGEVVDCTIK TDPVTGRSRG FGFVLFKDA
201 SVDKVLELKE HKLDGKLIDP KRAKALKGKE PPKKVFVGG SPDTSEEQIK
251 EYFGAFGEIE NIELPMDTKT NERRGFCFIT YTDEEPVKKL LESRYHQIGS
301 GKCEIKVAQP KEVYRQQQQQ QKGGRGAAAG GRGGTRGRGR GQGQWNQGF
351 NNYDQGYGN YNSAYGGQN YSGYGGYDYT GYNYGNYGYG QGYADYSGQQ
401 STYGKASRGG GNHQNNYQPY

```

Fig 2

```

1   MEDMNEYSNI EEFAEGSKIN ASKNQDDGK MFIGGLSWDT SKKDLTEYLS
51  RFGEVVDCTI KTDPTVGRSR GFGFVLFKDA ASVDKVLELK EHKLDGKLID
101 PKRAKALKGK EPPKKVFVGG LSPDTSEEQI KEYFGAFGEI ENIELPMDTK
151 TNERRGFCFI TYTDEEPVKK LLESRYHQIG SGKCEIKVAQ PKEVYRQQQQ
201 QQKGGRGAAA GGRGGTRGRG RGQGQWNQGF FNNYDQGYG NYNSAYGGDQ
251 NYSYGGYDY TGYNYGNYGY GQGYADYSGQ QSTYGKASRG GGNHQNNYQP
301 Y

```

Fig. 3

```

1   MEDMNEYSNI EEFAEGSKIN ASKNQDDGK MFIGGLSWDT SKKDLTEYLS
51  RFGEVVDCTI KTDPTVGRSR GFGFVLFKDA ASVDKVLELK EHKLDGKLID
101 PKRAKALKGK EPPKKVFVGG LSPDTSEEQI KEYFGAFGEI ENIELPMDTK
151 TNERRGFCFI TYTDEEPVKK LLESRYHQIG SGKCEIKVAQ PKEVYRQQQQ
201 QQKGGRGAAA GGRGGTRGRG RGQQSTYGKA SRGGGNHQNN YQPY

```

Fig. 4

```

1   MNEYSNIEEF AEGSKINASK NQDDGKMF I GGLSWDTSKK DLTEYLSRFG
51  EVVDCTIKTD PVTGRSRGFG FVLFKDAASV DKVLELKEHK LDGKLIDPKR
101 AKALKGKEPP KKVVFVGG LSPDTSEEQIKEY FGAFGEIENI ELPMDTKTNE
151 RRGFCFITYT DEEPVKKLLE SRYHQIGSGK CEIKVAQPKE VYRQQQQQQK
201 GGRGAAAGGR GGTRGRGRGQ GQWNQGFNN YYDQGYGNYN SAYGGDQNS
251 GYGGYDYTG YNYGNYGYGQ YADYSGQQST YGKASRGGGN HQNNYQPY

```

Fig. 5

```

1   RRPDLFRRHF KSSSIQRSAA AAAATRTRARQ HPPADSSVMTM EDMNEYSNIE
51  EFAEGSKINA SKNQDDGKM FIGGLSWDTS KKDLTEYLSR FGEVVDCTIK
101 TDPVTGRSRG FGFVLFKDA A SVDKVLELKE HKLDGKLIDP KRAKALKGKE
151 PPKKV FVGGL SPDTSEEQIK EYFGAFGEIE NIELPMDTKT NERRGFCFIT
201 YTDEEPVKKL LESRYHQIGS GKCEIKVAQP KEVYRQQQQQ QKGGRGAAAG
251 GRGGTRGRGR GQGQNWQGF NNYDQGYGN YNSAYGGDQN YSGYGGYDYT
301 GYNYGNYGYG QGYADYSGQQ STYGKASRGG GNHQNNYQPY

```

Fig. 6

```

1   MEREKEQFRK LFIGGLSFET TEESLRNYE QWGKLTDCVV MRDPASKRSR
51  GFGFVTFSSM AEVDAAMAAR PHSIDGRVVE PKRAVAREES GKPGAHVTVK
101 KLVGGIKED TEEHHLRDYF EEYKIDTIE IITDRQSGKK RGFVTFDD
151 HDPVDKIVLQ KYHTINGHNA EVRKALSRQE MQEVQSSRSG RGGNFGFGDS
201 RGGGNFGPG PGSNFRGGSD GYGSGRFGD GYNGYGGPG GGNFGGSPGY
251 GGGGGYGGG GPGYGNQGGG YGGYDNYGG GNYGSGNYND FGNYNQPSN
301 YGPMKSGNFG GSRNMGGPYG GNYGPGGSG GSGGYGGRSR Y

```

Fig. 7

```

1   MEKTLETVPL ERKKREKEQF RKLFIGGLSF ETTEESLRNY YEQWGKLTDC
51  VVMRDPASKR SRGFGVTF S MAEVDAMA ARPHSIDGRV VEPKRAVARE
101 ESGKPGAHVT VKKLVGGIK EDTEEHLRD YFEEYKIDT IEIITDRQSG
151 KKRGFVTF DDHDPVDKIV LQKYHTINGH NAEVRKALSR QEMQEVQSSR
201 SGRGNFGPG DSRGGGNFG PPGSNFRGG SDGYGSGRFG GDGYNGYGGG
251 PGGNFGGSP GYGGGRGGY GGGPGYGNQG GYGGGYDNY GGGNYGSGNY
301 NDFGNYNQQP SNYGPMKSGN FGGSRNMGGP YGGNYGPGG SGGSGGYGGR
351 SRY

```

Fig. 8

```

1   MSEEQFGGDG AAAAATAAVG GSAGEQEGAM VAATQGAAAA AGSGAGTGGG
51  TASGGTEGGS AESEGA KIDA SKNEEDEGHS NSSPRHSEAA TAQREEWKM
101 IGGLSWDTTK KDLKDYFSKF GEVVDCTLKL DPITGRSRGF GFVLFKES
151 VDKVMDQKEH KLNKVIDPK RAKAMKTKEP VKKIFVGGLS PDTPEEKIR
201 YFGGFGEVES IELPMDNKTN KRRGFCFITF KEEEPVKKIM EKKYHNVL
251 KCEIKVAMSK EQYQQQQQWG SRGGFAGRAR GRGGGPSQNW NQYSNYWNQ
301 GYNYGYNSQ GYGGYGGYDY TGYNNYGYG DYSNQQSGYG KVSRRGGHQ
351 SYKPY

```

Fig. 9

```

1   MSEEQFGGDG AAAAATAAVG GSAGEQEGAM VAATQGAAAA AGSGAGTGGG
51  TASGGTEGGS AESEGAKIDA SKNEEDEGKM FIGGLSWDTT KKDLKDYFSK
101 FGEVVDCTLK LDPITGRSRG FGFVLFKESE SVDKVMQKE HKLNGKVIDP
151 KRAKAMKTKE PVKKIFVGGL SPDTPEEKIR EYFGGFGEVE SIELPMDNKT
201 NKRRGFCFIT FKEEEPVKKI MEKKYHNVGL SKCEIKVAMS KEQYQQQQQW
251 GSRGGFAGRA RGRGGGPSQN WNQGYSNYWN QGYGNYGYNS QGYGGYGGYD
301 YTGYNYYGY GDYSNQQSGY GKVSRRGGHQ NSYKPY

```

Fig. 10

```

1   MSEEQFGGDG AAAAATAAVG GSAGEQEGAM VAATQGAAAA AGSGAGTGGG
51  TASGGTEGGS AESEGAKIDA SKNEEDEGHS NSSPRHSEAA TAQREEWKMF
101 IGGLSWDTTK KDLKDYFSKF GEVVDCTLKL DPITGRSRGF GFVLFKESES
151 VDKVMDQKEH KLNGKVIDPK RAKAMKTKEP VKKIFVGGLS PDTPEEKIRE
201 YFGGFGEVES IELPMDNKTN KRRGFCFITF KEEEPVKKIM EKKYHNVGLS
251 KCEIKVAMSK EQYQQQQQWG SRGGFAGRAR GRGGDQQSGY GKVSRRGGHQ
301 NSYKPY

```

Fig. 11

```

1   MSEEQFGGDG AAAAATAAVG GSAGEQEGAM VAATQGAAAA AGSGAGTGGG
51  TASGGTEGGS AESEGAKIDA SKNEEDEGKM FIGGLSWDTT KKDLKDYFSK
101 FGEVVDCTLK LDPITGRSRG FGFVLFKESE SVDKVMQKE HKLNGKVIDP
151 KRAKAMKTKE PVKKIFVGGL SPDTPEEKIR EYFGGFGEVE SIELPMDNKT
201 NKRRGFCFIT FKEEEPVKKI MEKKYHNVGL SKCEIKVAMS KEQYQQQQQW
251 GSRGGFAGRA RGRGGDQQSG YGKVSRRGGH QNSYKPY

```

Fig. 12

```

1   MEVKPPPGRP QPDSGRRRRR RGEEGHDPKE PEQLRKLFIG GLSFETDDDS
51  LREHFKEWGT LTDCVVMRDP QTKRSRGFGF VTYSCVEEVD AAMCARPHKV
101 DGRVVEPKRA VSREDSVKPG AHLTVKKIFV GGIKEDTEEY NLRDYFEKYG
151 KIETIEVMED RQSGKKRGFA FVTFDDHDTV DKIVVQKYHT INGHNCEVKK
201 ALSKQEMQSA GSQRGRGGGS GNFMRGGNF GGGGNGFGRG GNFGGRGGYG
251 GGGGSRGSY GGDGGYNGF GGDGGNYGGG PGYSSRGGYG GGGPGYGNQG
301 GGYGGGGYD GYNEGGNFGG GNYGGGNYN DFGNYSGQQQ SNYGPMKGGG
351 FGGRSSGSPY GGGYGSGGGS GYGSRRF

```

Fig. 13

```

1   MEGHDPKEPE QLRKLFIGGL SFETDDSLR EHFKEWGTLT DCVVMRDPQT
51  KRSRGFGFVT YSCVEEVDA MCARPHKVDG RVVEPKRAVS REDSVKPGAH
101 LTVKKIFVGG IKEDTEEYNL RDYFEKYGKI ETIEVMEDRQ SGKKRGFAFV
151 TFDHDTVVK IVVQKYHTIN GHNCEVKKAL SKQEMQSAGS QRGRGGGSGN
201 FMGRGGNFGG GGGNFGRRGN FGGRGGYGGG GGSRRGSYGG GDGGYNGFGG
251 DGGNYGGGPG YSSRGGYGGG GPGYGNQGGG YGGGGYDGY NEGGNFGGGN
301 YGGGGNYNDF GNYSQQQSN YGPMKGSFG GRSSGSPYGG GYGSGGGSGG
351 YGSRRF

```

Fig. 14

```

1   MSKSESPKEP EQLRKLFIGG LSFETTDESL RSHFEQWGTL TDCVVMRDPN
51  TKRSRGGFV TYATVEEVDA AMNARPHKVD GRVVEPKRAV SREDSQRPGA
101 HLTVKKIFVG GIKEDTEHH LRDYFEQYK IEVIEIMTDR GSGKKRGFAF
151 VTFDDHDSVD KIVIQKYHTV NGHNCVRKA LSKQEMASAS SSQRGRSGSG
201 NFGGGRGGGF GGNDNFRGG NFSGRGGFGG SRGGGGYGG GDGYNGFGND
251 GSNFGGGGSY NDFGNYNQS SNFGPMKGGN FGGRSSGPYG GGGQYFAKPR
301 NQGGYGGSSS SSSYGSRRF

```

Fig. 15

```

1   MSKSESPKEP EQLRKLFIGG LSFETTDESL RSHFEQWGTL TDCVVMRDPN
51  TKRSRGGFV TYATVEEVDA AMNARPHKVD GRVVEPKRAV SREDSQRPGA
101 HLTVKKIFVG GIKEDTEHH LRDYFEQYK IEVIEIMTDR GSGKKRGFAF
151 VTFDDHDSVD KIVIQKYHTV NGHNCVRKA LSKQEMASAS SSQRGRSGSG
201 NFGGGRGGGF GGNDNFRGG NFSGRGGFGG SRGGGGYGG GDGYNGFGND
251 GYGSGGPGY SGGSRGYGSG GQYGNQGS YGSGSYDSY NNGGGGGFVG
301 GSGSNFGGG SYNDFGNYN QSNFPMKG GNFGRRSSGP YGGGGQYFAK
351 PRNQGGYGG SSSSYGSGR RF

```

Fig. 16

```

1   MSEAGEEQPM ETTGATENGH EAVPEGESPA GAGTGAAAGA GGATAAPPSG
51  NQNGAEGDQI NASKNEEDAG KMFVGGLSWD TSKKDLKDYF TKFGEVVDCT
101 IKMDPNTGRS RGFGLFKD AASVEKVLQD KEHRLDGRVI DPKKAMAMKK
151 DPVKKIFVGG LNPEATEEKI REYFGEFGEI EAIELPMDPK LNKRRGFVFI
201 TFKEEEPVKK VLEKKFHTVS GSKCEIKVAQ PKEVYQQQY GSGGRGNRNR
251 GNRSGGGGG GGGQSQSWNQ GYGNWNQGY GYQQGYGPGY GGYDYSYGY
301 YGYGPGYDYS QGSTNYGKSQ RRGHQNNYK PY

```

Fig. 17

```

1   MSEAGEEQPM ETTGATENGH EAVPEGESPA GAGTGAAAGA GGATAAPPSG
51  NQNGAEGDQI NASKNEEDAG KMFVGGLSWD TSKKDLKDYF TKFGEVVDCT
101 IKMDPNTGRS RGFGFILFKD AASVEKVLQD KEHRLDGRVI DPKKAMAMKK
151 DPVKKIFVGG LNPEATEEKI REYFGEFGEI EAIELPMDPK LNKRRGFVFI
201 TFKEEEPVKK VLEKKFHTVS GSKCEIKVAQ PKEVYQQQY  GSGGRGNRNR
251 GNRGSGGGGG GGGQGSTNYG KSQRRGGHQN NYKPY
    
```

Fig. 18

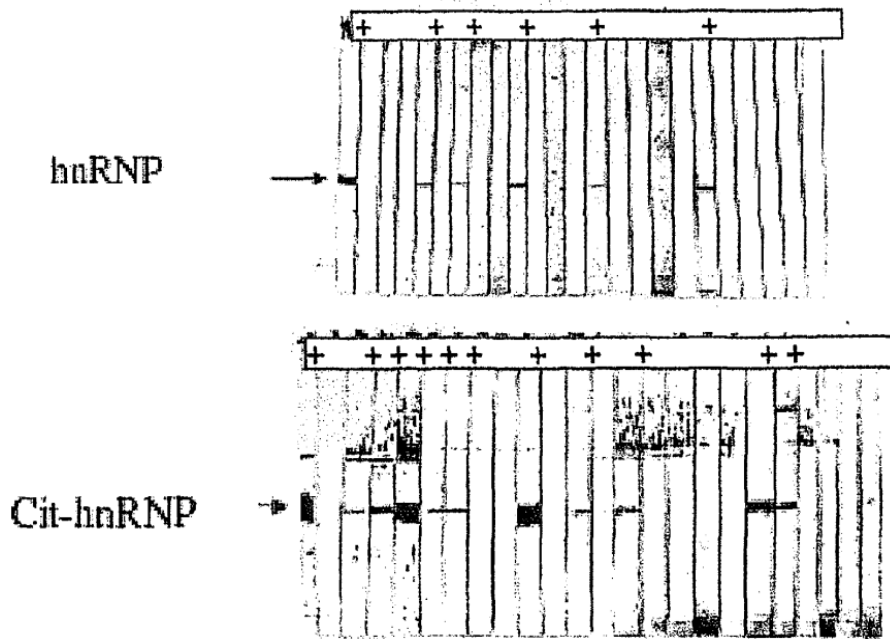




Fig. 19

<b>Trastorno autoinmunitario</b>	<b>hnRNP</b>	<b>Cit-hnRNP</b>
<b>SLE</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>RA</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>
<b>Síndrome de Sjögren</b>	<b>+</b>	<b>+</b>