

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 702**

21 Número de solicitud: 201431445

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070717

71 Solicitantes:

**SERVIZO GALEGO DE SAUDE (SERGAS) (85.0%)
Edificio Administrativo de San Lázaro
15703 Santiago de Compostela (A Coruña) ES;
UNIVERSIDADE DE VIGO (10.0%) y
FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS (5.0%)**

72 Inventor/es:

**BLANCO GARCÍA, Francisco J.;
RUIZ ROMERO, Cristina;
FERNÁNDEZ COSTA, Carolina;
CAPELO MARTÍNEZ, José Luis;
FERNÁNDEZ RIVEROLA, Florentino y
REBOIRO JATO, Miguel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ARTROSIS**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico de artrosis.

La presente invención se relaciona con un patrón peptídico característico de sujetos que padecen artrosis y el uso de dicho patrón peptídico en el diagnóstico de dicha enfermedad. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un método in vitro de diagnóstico y un kit para la puesta en práctica de dicho método.

ES 2 568 702 A1

Método para el diagnóstico de Artrosis

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se relaciona con un patrón de péptidos característico de sujetos que padecen artrosis y el uso de dicho patrón en el diagnóstico de dicha enfermedad. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un método *in vitro* de diagnóstico y un kit para la puesta en práctica de dicho método de diagnóstico. Por tanto, la invención pertenece al campo técnico del diagnóstico de enfermedades, en particular, el diagnóstico de enfermedades reumáticas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La artrosis es una patología reumática que lesiona el cartílago articular. Las articulaciones son los componentes del esqueleto que nos permiten el movimiento y, por tanto, nuestra autonomía funcional, y están formadas por la unión de dos huesos a través de la cápsula articular. En el interior de las mismas existe, generalmente, un fluido llamado líquido sinovial que es producido por la membrana sinovial. Los extremos óseos que se unen para formar la articulación están recubiertos por el cartílago articular.

20 Cuando este cartílago articular se lesiona, se produce dolor, rigidez e incapacidad funcional. Normalmente la artrosis se localiza en la columna cervical y lumbar, y en algunas articulaciones del hombro y de los dedos de las manos, la cadera, la rodilla y la articulación del comienzo del dedo gordo del pie.

25 Esta enfermedad reumática no es hereditaria en el sentido de que no hay un patrón de herencia fijo como puede ser el caso de la hemofilia, pero sí tiene un componente de riesgo genético que, junto con otros factores, puede hacer que aparezca con más facilidad en los sujetos que tienen una historia familiar. En España, la artrosis afecta al 30 10% de la población general, representando casi la cuarta parte del total de pacientes atendidos en las consultas de los reumatólogos.

35 Actualmente, el diagnóstico de la artrosis se basa en la evaluación de los síntomas y en la exploración física que realiza el médico al paciente. El médico valora qué síntomas tiene el enfermo, dónde se localizan, cómo es el dolor, en qué circunstancias mejora (con el reposo) o empeora (al subir o bajar escaleras, al abrir o cerrar grifos...). También

interroga sobre qué otras enfermedades padece el enfermo, qué tratamientos está recibiendo, y si él o algún familiar padecen o han padecido algún tipo de enfermedad reumática, traumatismo o lesión articular previos.

5 Las radiografías permiten confirmar el diagnóstico de artrosis, al poderse constatar en las articulaciones los cambios radiológicos típicos de los procesos artrósicos. Mediante los estudios radiológicos se puede determinar de una forma mucho más precisa la severidad de la artrosis.

10 Los análisis de sangre no tienen ninguna utilidad para diagnosticar la artrosis. Todos los resultados que se determinan son siempre normales, incluyendo las denominadas “pruebas reumáticas”, es decir, no llevan a pensar que dichos sujetos padecen la enfermedad. La única indicación para realizarlos es para confirmar con su normalidad el diagnóstico de artrosis, descartando otras enfermedades reumáticas que sí producen
15 algunas alteraciones en los análisis de laboratorio. Por ejemplo, en las artritis están alteradas la velocidad de sedimentación de la sangre, el factor reumatoide y otras pruebas reumáticas; en la gota, el ácido úrico está alto, etc. Hasta la actualidad, no se ha identificado ningún marcador diagnóstico en el suero o en el líquido sinovial de los pacientes que permita hacer un diagnóstico o un seguimiento de la enfermedad.

20 No obstante, se están realizando importante avances en el estudio de los denominados marcadores biológicos de la artrosis. Son productos que se liberan desde el cartílago articular al líquido sinovial, orina o sangre durante la síntesis y destrucción del cartílago. Algunos de ellos son productos del queratán-sulfato, del condroitín sulfato, del ácido
25 hialurónico o la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP). El aumento de los conocimientos sobre los marcadores bioquímicos de la artrosis permitiría un mejor diagnóstico y una intervención más temprana en el tratamiento de la enfermedad, además de facilitar el desarrollo de fármacos, iniciar las terapias mejoradas, permitir mejores opciones de medicamentos, ofrecer opciones de dosificación seguras y
30 finalmente disminuir los costos de atención de salud. Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de identificar marcadores de artrosis que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad de una forma más sencilla, fiable y segura.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que los sujetos que padecen artrosis presentan un patrón peptídico no presente en sujetos sanos, ni en sujetos que padecen otro tipo de enfermedades reumáticas, como la artritis psoriásica (APS) y la artritis reumatoide (AR), lo que convierte a dicho patrón peptídico en una herramienta útil para el diagnóstico específico de la artrosis. Para obtener el mencionado patrón, los autores partieron de muestras de suero procedentes de pacientes diagnosticados con artrosis y sobre el mismo llevaron a cabo una depleción química con ditiotrietol (DTT) y acetonitrilo (ACN), para después digerir las proteínas con tripsina acelerada con ultrasonidos. A continuación, los péptidos resultantes fueron retenidos en una punta comercial C18 y eluidos con diferentes cantidades de ACN. Finalmente, cada fracción de elución se analizó por quintuplicado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Ejemplo 1), obteniendo las masas de los péptidos característicos del patrón peptídico presentes en sujetos que padecen artrosis. La posterior validación del patrón peptídico obtenido (Ejemplo 2), confirmó la utilidad de este patrón en el diagnóstico de la artrosis.

A continuación, se describen los diferentes aspectos inventivos desarrollados por los inventores.

Patrón peptídico de la invención y sus usos

Los autores de la presente invención han descubierto que pacientes con artrosis presentan un patrón peptídico característico el cuál no está presente ni en sujetos con enfermedades reumatoides distintas de la artrosis (como artritis psoriásica o artritis reumatoide) ni en sujetos sanos.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un patrón peptídico, de aquí en adelante, patrón peptídico de la invención, que comprende los siguientes péptidos: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

En la presente invención se entiende por “patrón peptídico”, al conjunto o grupo de péptidos que están presentes en una muestra biológica de un sujeto y que es

característico de su estado fisiológico. En el contexto de la presente invención, el patrón peptídico aquí descrito es característico de sujetos que padecen artrosis.

5 En la presente invención se entiende por “péptido” a la molécula formada por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos y que presentan, aproximadamente, entre 2 y 100 aminoácidos. Orientativamente, si el péptido comprende entre aproximadamente 2 y 15 aminoácidos se denomina oligopéptido, y si comprende entre aproximadamente 16 y 100 aminoácidos se denomina polipéptido.

10 Tal como se muestra en los ejemplos incluidos en la presente descripción, el patrón peptídico de la invención ha sido obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, por lo que los péptidos de la invención, además de estar caracterizados por su secuencia específica de aminoácidos, también están caracterizados por su valor masa/carga y su peso molecular [ver **Tabla 1**], los cuáles son parámetros estándar de este tipo de técnica.

15 **Tabla 1.** Valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido comprendido dentro del patrón peptídico de la invención. En la Tabla 1 se muestra también la secuencia peptídica de los péptidos que comprenden el patrón de la invención.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Péptido 01 | 1392,7526 | 1391,7526 | 1 | QLTPYAQRMER |
| Péptido 02 | 1532,8060 | 1531,806 | 2 | QKWEAEPVYVQR |
| Péptido 03 | 1758,9790 | 1757,979 | 3 | ELQQRLEPYADQLR |
| Péptido 04 | 1910,0176 | 1909,0176 | 4 | LHELQEKLSPLGEEMR |
| Péptido 05 | 2165,1272 | 2164,1272 | 5 | QKLHELQEKLSPLGEEMR |
| Péptido 06 | 2180,1445 | 2179,1445 | 6 | LHELQEKLSPLGEEMRDR |
| Péptido 07 | 2280,1501 | 2279,1501 | 7 | DSFHLDEQFTVPVEMMQAR |
| Péptido 08 | 2291,2260 | 2290,226 | 8 | ARAHVDALRTHLAPYSDELRL |
| Péptido 09 | 2407,2880 | 2406,288 | 9 | LHELQEKLSPLGEEMRDRAR |
| Péptido 10 | 2436,2922 | 2435,2922 | 10 | QKLHELQEKLSPLGEEMRDR |
| Péptido 11 | 2663,4314 | 2662,4314 | 11 | QKLHELQEKLSPLGEEMRDRAR |

En una realización particular, el patrón peptídico de la invención comprende, además, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que se muestran en la **Tabla 2**, que están caracterizados tanto por su secuencia específica de aminoácidos, como por su valor masa/carga y su peso molecular.

5

Tabla 2. Secuencias y valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido adicional que puede usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Péptido 12 | 871,502 | 870,502 | 12 | VLNQELR |
| Péptido 13 | 896,490 | 895,490 | 13 | YLTWASR |
| Péptido 14 | 961,627 | 960,627 | 14 | GVTFLLR |
| Péptido 15 | 980,529 | 979,529 | 15 | VGYVSGWGR |
| Péptido 16 | 1019,604 | 1018,604 | 16 | AFKAWAVAR |
| Péptido 17 | 1108,588 | 1107,588 | 17 | LQTDLSEFR |
| Péptido 18 | 1117,669 | 1116,669 | 18 | GFSPKDLVLR |
| Péptido 19 | 1148,634 | 1147,634 | 19 | DAVSAAFKGLK |
| Péptido 20 | 1213,667 | 1212,667 | 20 | WLQGSQELPR |
| Péptido 21 | 1237,674 | 1236,674 | 21 | LETPDFQLFK |
| Péptido 22 | 1247,652 | 1246,652 | 22 | LGMFNIQHCK |
| Péptido 23 | 1249,655 | 1248,655 | 23 | LICQATGFSPR |
| Péptido 24 | 1255,716 | 1254,716 | 24 | LRCLAPLEGAR |
| Péptido 25 | 1263,683 | 1262,683 | 25 | LGMFNIQHCK |
| Péptido 26 | 1299,609 | 1298,609 | 26 | WQEEMELYR |
| Péptido 27 | 1380,780 | 1379,780 | 27 | VQPYLDDFQKK |
| Péptido 28 | 1403,749 | 1402,749 | 28 | RLGMFNIQHCK |
| Péptido 29 | 1449,800 | 1448,800 | 29 | VVAGVANALAHKYH |
| Péptido 30 | 1465,689 | 1464,689 | 30 | DSGEGDFLAEGGGVR |
| Péptido 31 | 1467,852 | 1466,852 | 31 | VEPLRAELQEGAR |
| Péptido 32 | 1470,813 | 1469,813 | 32 | WLQGSQELPREK |
| Péptido 33 | 1502,810 | 1501,810 | 33 | VCPFAGILENGAVR |
| Péptido 34 | 1518,710 | 1517,710 | 34 | ADSGEGDFLAEGGGVR |
| Péptido 35 | 1519,750 | 1518,750 | 35 | ALYLQYTDETFR |
| Péptido 36 | 1568,914 | 1567,914 | 36 | LAARLEALKENGGAR |
| Péptido 37 | 1569,907 | 1568,907 | 37 | LAARLEALKENGGAR |
| Péptido 38 | 1585,846 | 1584,846 | 38 | THLAPYSDELQR |
| Péptido 39 | 1612,849 | 1611,849 | 39 | LLDNWDSVTSTFSK |
| Péptido 40 | 1641,892 | 1640,892 | 40 | ITPNLAFAFSLYR |
| Péptido 41 | 1641,892 | 1640,892 | 41 | AGDFLEANYMNLQR |
| Péptido 42 | 1669,862 | 1668,862 | 42 | VLGAFSDGLAHLNLIK |
| Péptido 43 | 1706,931 | 1705,931 | 43 | QKVEPLRAELQEGAR |

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Péptido 44 | 1707,875 | 1706,875 | 44 | YVMLPVADQDQCIR |
| Péptido 45 | 1736,970 | 1735,970 | 45 | LSQRFPKAEFAEVSK |
| Péptido 46 | 1743,882 | 1742,882 | 46 | YAASSYLSLTPEQWK |
| Péptido 47 | 1745,901 | 1744,901 | 47 | YVGGQEHFHLLILR |
| Péptido 48 | 1771,885 | 1770,885 | 48 | SLAELGGHLDQQVEEF |
| Péptido 49 | 1786,909 | 1785,909 | 49 | GLPGPPDVPDHAAYHPF |
| Péptido 50 | 1810,992 | 1809,992 | 50 | SYFEKSKEQLTPLIK |
| Péptido 51 | 1815,922 | 1814,922 | 51 | DSGRDYVSQFEGSALGK |
| Péptido 52 | 1825,005 | 1824,005 | 52 | ILGGHLDAGSFPWQAK |
| Péptido 53 | 1834,946 | 1833,946 | 53 | VMPICLPSKDYAEVGR |
| Péptido 54 | 1864,027 | 1863,027 | 54 | EVQLVESGGGLVQPGGSLR |
| Péptido 55 | 1875,997 | 1874,997 | 55 | VYACEVTHQGLSSPVTK |
| Péptido 56 | 1876,017 | 1875,017 | 56 | VTLTCVAPLSGVDFQLR |
| Péptido 57 | 1884,000 | 1883,000 | 57 | EIVLTQSPGTLSPGER |
| Péptido 58 | 1899,060 | 1898,060 | 58 | FNKPFVFLMIEQNTK |
| Péptido 59 | 1906,873 | 1905,873 | 59 | SEAEDASLLSFMQGYMK |
| Péptido 60 | 1922,877 | 1921,877 | 60 | SEAEDASLLSFMQGYMK |
| Péptido 61 | 1932,038 | 1931,038 | 61 | SLHTLFGDKLCTVATLR |
| Péptido 62 | 2012,011 | 2011,011 | 62 | TFGSGEADCGLRPLFEKK |
| Péptido 63 | 2020,138 | 2019,138 | 63 | VLDVAVRGSPAINVAVHVFR |
| Péptido 64 | 2153,112 | 2152,112 | 64 | SLEDKTERELLESYIDGR |
| Péptido 65 | 2186,092 | 2185,092 | 65 | LYHSEAFVNFVGDTEEAKK |
| Péptido 66 | 2190,132 | 2189,132 | 66 | CEGPIPDVTFELLREGETK |
| Péptido 67 | 2296,219 | 2295,219 | 67 | TPGAAANLELIFVGPQHAGNYR |
| Péptido 68 | 2315,195 | 2314,195 | 68 | QSNNKYAASSYLSLTPEQWK |
| Péptido 69 | 2344,169 | 2343,169 | 69 | SEAEDASLLSFMQGYMKHATK |
| Péptido 70 | 2348,245 | 2347,245 | 70 | AHVDALRTHLAPYSDELQR |
| Péptido 71 | 2394,298 | 2393,298 | 71 | LTPYADEFKVKIDQTVEELR |
| Péptido 72 | 2409,281 | 2408,281 | 72 | GAHGPRPDTVGQRGGSRPSPGPI R |
| Péptido 73 | 2565,322 | 2564,322 | 73 | GPPGLPGLKGDVPGVPLPGAKGE VGADGV |
| Péptido 74 | 2602,358 | 2601,358 | 74 | AVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVV PR |
| Péptido 75 | 2652,448 | 2651,448 | 75 | TVRTPGAAANLELIFVGPQHAGNY R |
| Péptido 76 | 2670,387 | 2669,387 | 76 | DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLK |
| Péptido 77 | 2695,362 | 2694,362 | 77 | QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR |
| Péptido 78 | 2790,425 | 2789,425 | 78 | YRSWVPHTFESELSDPVELLVAES |
| Péptido 79 | 2940,755 | 2939,755 | 79 | SASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLG ITK |

En otra realización más particular, el patrón peptídico de la invención comprende, además, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que se muestran en la **Tabla 3**, que están caracterizados tanto por su secuencia específica de aminoácidos, como por su valor masa/carga y su peso molecular. Los péptidos mostrados en la Tabla 3 pueden usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales. En otra realización más preferida, los sujetos artrósicos muestran una presencia incrementada de los péptidos mostrados en la Tabla 3 respecto a los sujetos control sanos.

10 **Tabla 3.** Secuencias y valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido adicional que puede usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Péptido 13 | 896,490 | 895,490 | 13 | YLTWASR |
| Péptido 14 | 961,627 | 960,627 | 14 | GVTFLRR |
| Péptido 15 | 980,529 | 979,529 | 15 | VGYVSGWGR |
| Péptido 16 | 1019,604 | 1018,604 | 16 | AFKAWAVAR |
| Péptido 17 | 1108,588 | 1107,588 | 17 | LQTDLSEFR |
| Péptido 18 | 1117,669 | 1116,669 | 18 | GFSPKDVLR |
| Péptido 19 | 1148,634 | 1147,634 | 19 | DAVSAAFKGLK |
| Péptido 20 | 1213,667 | 1212,667 | 20 | WLQGSQELPR |
| Péptido 21 | 1237,674 | 1236,674 | 21 | LETPDFQLFK |
| Péptido 24 | 1255,716 | 1254,716 | 24 | LRCLAPLEGAR |
| Péptido 28 | 1403,749 | 1402,749 | 28 | RLGMFNIQHCK |
| Péptido 32 | 1470,813 | 1469,813 | 32 | WLQGSQELPREK |
| Péptido 33 | 1502,810 | 1501,810 | 33 | VCPFAGILENGAVR |
| Péptido 36 | 1568,914 | 1567,914 | 36 | LAARLEALKENGGAR |
| Péptido 38 | 1585,846 | 1584,846 | 38 | THLAPYSDELQR |
| Péptido 40 | 1641,892 | 1640,892 | 40 | ITPNLAEFASLYR |
| Péptido 41 | 1641,892 | 1640,892 | 41 | AGDFLEANYMNLQR |
| Péptido 42 | 1669,862 | 1668,862 | 42 | VLGAFSDGLAHLNLK |
| Péptido 43 | 1706,931 | 1705,931 | 43 | QKVEPLRAELQEGAR |
| Péptido 51 | 1815,922 | 1814,922 | 51 | DSGRDYVSQFEGSALGK |
| Péptido 52 | 1825,005 | 1824,005 | 52 | ILGGHLDKGSFPWQAK |
| Péptido 53 | 1834,946 | 1833,946 | 53 | VMPICLPSKDYAEVGR |
| Péptido 54 | 1864,027 | 1863,027 | 54 | EVQLVESGGGLVQPGGSLR |

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|---------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| Péptido 55 | 1875,997 | 1874,997 | 55 | VYACEVTHQGLSSPVTK |
| Péptido 56 | 1876,017 | 1875,017 | 56 | VTLTCVAPLSGVDFQLR |
| Péptido 57 | 1884,000 | 1883,000 | 57 | EIVLTQSPGTLISLSPGER |
| Péptido 65 | 2186,092 | 2185,092 | 65 | LYHSEAFTVNFQDTEEA |
| Péptido 67 | 2296,219 | 2295,219 | 67 | TPGAAANLELIFVGPQHAGNYR |
| Péptido 68 | 2315,195 | 2314,195 | 68 | QSNNKYAASSYLSLTPEQWK |
| Péptido 70 | 2348,245 | 2347,245 | 70 | AHVDALRTHLAPYSDELRR |
| Péptido 75 | 2652,448 | 2651,448 | 75 | TVRTPGAAANLELIFVGPQHAGNYR |
| Péptido 76 | 2670,387 | 2669,387 | 76 | DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLK |
| Péptido 77 | 2695,362 | 2694,362 | 77 | QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR |
| Péptido 78 | 2790,425 | 2789,425 | 78 | YRSWVPHTFESESDPVELLVAES |

En otra realización más preferida, el patrón peptídico de la invención comprende, además, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que se muestran en la **Tabla 4**, que están caracterizados tanto por su secuencia específica de aminoácidos, como por su valor masa/carga y su peso molecular. Los péptidos mostrados en la Tabla 4 pueden usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales. En otra realización preferida, los sujetos artrósicos muestran una presencia disminuida de los péptidos mostrados en la Tabla 4 respecto a los sujetos control sanos.

Tabla 4. Secuencias y valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido adicional que puede usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|---------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| Péptido 12 | 871,502 | 870,502 | 12 | VLNQELR |
| Péptido 34 | 1518,71 | 1517,71 | 34 | ADSGEGDFLAEGGGVR |
| Péptido 50 | 1810,992 | 1809,992 | 50 | SYFEKSKEQLTPLIK |
| Péptido 60 | 1922,877 | 1921,877 | 60 | SEAEDASLLSFMQGYMK |
| Péptido 62 | 2012,011 | 2011,011 | 62 | TFGSGEADCGLRPLFEKK |
| Péptido 64 | 2153,112 | 2152,112 | 64 | SLEDKTERELLESYIDGR |
| Péptido 74 | 2602,358 | 2601,358 | 74 | AVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVVPR |

En otra realización particular, el patrón peptídico de la invención comprende, además, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que se muestran en la **Tabla 5**, que están caracterizados tanto por su secuencia específica de aminoácidos, como por su valor masa/carga y su peso molecular. Los péptidos mostrados en la Tabla 5 pueden usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis reumatoide.

Tabla 5. Secuencias y valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido adicional que puede usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis reumatoide.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|------------------|---------------------|------------|----------------------------------|
| Péptido 22 | 1247,652 | 1246,652 | 22 | LGMFNIQHCK |
| Péptido 23 | 1249,655 | 1248,655 | 23 | LICQATGFSPR |
| Péptido 26 | 1299,609 | 1298,609 | 26 | WQEEMELYSR |
| Péptido 30 | 1465,689 | 1464,689 | 30 | DSGEGDFLAEGGGVR |
| Péptido 31 | 1467,852 | 1466,852 | 31 | VEPLRAELQEGAR |
| Péptido 35 | 1519,75 | 1518,75 | 35 | ALYLQYTDQTR |
| Péptido 39 | 1612,849 | 1611,849 | 39 | LLDNWDSVTSTFSK |
| Péptido 45 | 1736,97 | 1735,97 | 45 | LSQRFPKAEFAEVSK |
| Péptido 46 | 1743,882 | 1742,882 | 46 | YAASSYLSLTPEQWK |
| Péptido 47 | 1745,901 | 1744,901 | 47 | YVGGQEHFAHLLILR |
| Péptido 48 | 1771,885 | 1770,885 | 48 | SLAELGGHLDQQVEEF |
| Péptido 58 | 1899,060 | 1898,060 | 58 | FNKPFVFLMIEQNTK |
| Péptido 59 | 1906,873 | 1905,873 | 59 | SEAEDASLLSFMQGYMK |
| Péptido 61 | 1932,038 | 1931,038 | 61 | SLHTLFGDKLCTVATLR |
| Péptido 63 | 2020,138 | 2019,138 | 63 | VLDVAVRGSPAINVAVHVFR |
| Péptido 66 | 2190,132 | 2189,132 | 66 | CEGPIPDVTFELLREGETK |
| Péptido 69 | 2344,169 | 2343,169 | 69 | SEAEDASLLSFMQGYMKHATK |
| Péptido 71 | 2394,298 | 2393,298 | 71 | LTPYADEFKVKIDQTVLEELR |
| Péptido 72 | 2409,281 | 2408,281 | 72 | GAHGPRPDTVGQRGGSRPSPG PIR |
| Péptido 73 | 2565,322 | 2564,322 | 73 | GPPGLPGLKGDGVPGLPGAAG EVGADGV |

En otra realización particular, el patrón peptídico de la invención comprende, además, al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en los péptidos que se muestran en la **Tabla 6**, que están caracterizados tanto por su secuencia específica de aminoácidos, como por su valor masa/carga y su peso molecular. Los péptidos mostrados en la Tabla 6 pueden usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis psoriásica.

Tabla 6. Secuencias y valores masa/carga y peso molecular obtenidos por espectrometría de masas para cada péptido adicional que puede usarse en combinación con el patrón peptídico de la invención para diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis psoriásica.

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: | Secuencia peptídica |
|------------|------------------|---------------------|------------|------------------------------|
| Péptido 22 | 1247,652 | 1246,652 | 22 | LGMFNIQHCK |
| Péptido 25 | 1263,683 | 1262,683 | 25 | LGMFNIQHCK |
| Péptido 26 | 1299,609 | 1298,609 | 26 | WQEEMELYR |
| Péptido 27 | 1380,78 | 1379,78 | 27 | VQPYLDDFQKK |
| Péptido 29 | 1449,8 | 1448,8 | 29 | VVAGVANALAHKYH |
| Péptido 30 | 1465,689 | 1464,689 | 30 | DSGEGDFLAEGGGVR |
| Péptido 31 | 1467,852 | 1466,852 | 31 | VEPLRAELQEGAR |
| Péptido 37 | 1569,907 | 1568,907 | 37 | LAARLEALKENGGAR |
| Péptido 39 | 1612,849 | 1611,849 | 39 | LLDNWDSVTSTFSK |
| Péptido 46 | 1743,882 | 1742,882 | 46 | YAASSYLSLTPEQWK |
| Péptido 47 | 1745,901 | 1744,901 | 47 | YVGGQEHFHALLILR |
| Péptido 48 | 1771,885 | 1770,885 | 48 | SLAELGGHLDQQVEEF |
| Péptido 49 | 1786,909 | 1785,909 | 49 | GLPGPPDVPDHAAYHPF |
| Péptido 58 | 1899,060 | 1898,060 | 58 | FNKPFVFLMIEQNTK |
| Péptido 59 | 1906,873 | 1905,873 | 59 | SEAEDASLLSFMQGYMK |
| Péptido 66 | 2190,132 | 2189,132 | 66 | CEGPIP DVTFELLREGETK |
| Péptido 69 | 2344,169 | 2343,169 | 69 | SEAEDASLLSFMQGYMKHATK |
| Péptido 79 | 2940,755 | 2939,755 | 79 | SASLHLPKLSITGTDLKSVLGG LGITK |

Los métodos y técnicas para obtener patrones peptídicos a partir de una muestra son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y serán explicados en detalle en la descripción del método de diagnóstico de la invención.

En otro aspecto, la invención también se relaciona con el uso del patrón peptídico de la invención como marcador de diagnóstico de artrosis en un sujeto.

Método de diagnóstico de la invención

5

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar artrosis en un sujeto, o para monitorizar la eficacia de la terapia administrada a un sujeto que padece artrosis, de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende:

- 10 a) aislar la fracción proteica de una muestra biológica procedente del sujeto,
- b) digerir la fracción proteica obtenida en la etapa a) con tripsina, y
- c) detectar la presencia o ausencia del patrón peptídico de la invención,

en donde si dicho patrón peptídico es detectado, entonces el sujeto padece artrosis o la terapia administrada al sujeto no está siendo eficaz.

15

En la presente invención se entiende por “diagnóstico” al procedimiento por el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad, entidad nosológica o síndrome a detectar es la artrosis, y los parámetros clínicos es el patrón peptídico de la invención.

20

En la presente invención, se entiende por “artrosis” o “osteoartritis” a la enfermedad articular crónica ocasionada por el deterioro del cartílago hialino e hiperreactividad osteoblástica del hueso subcondral. En la presente invención los términos “artrosis” y “osteoartritis” son equivalentes y pueden emplearse indistintamente a lo largo de la misma. Como sabe el experto en la materia, la artrosis puede clasificarse en artrosis idiopática y en artrosis secundaria (Modificada de Altman RC, *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20:40-47).

30

La artrosis idiopática (se desconoce el origen de la enfermedad) puede ser, localizada, por ejemplo, en manos, pies, caderas, columna, etc., o generalizada, en la que están afectadas tres o más áreas articulares, tales como las articulaciones pequeñas y la columna, las articulaciones grandes y columna, o mixta, que es una combinación de las anteriores.

35

La artrosis secundaria se clasifica en enfermedades congénitas o del desarrollo (entre las que se incluyen, sin limitar a, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Legg-Calve, displasias óseas, etc.), enfermedades por depósito de calcio (entre las que se incluyen sin limitar artropatía por hidroxapatita, artropatía destructiva y depósito de pirofosfato cálcico), en enfermedades postraumáticas, en enfermedades del hueso y articulares (entre las que se incluyen, sin limitar a necrosis avascular, artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis séptica, enfermedad de Paget, osteopetrosis, osteocondritis), y enfermedades varias que tienen su origen en la artritis (entre las que se incluyen, sin limitar a, articulación de Charcot, diabetes mellitus, acromegalia, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo, enfermedad de Kashin-Beck, enfermedad de Caisson, etc.).

Por otro lado, la artrosis también puede clasificarse utilizando la escala KELLGREN Y LAWRENCE (K/L) radiológica, que clasifica a la artrosis en 5 grados radiológicos: Grado 0, I, II, III, y IV.

Cualquiera de las enfermedades incluidas dentro de la clasificación de artrosis puede ser diagnosticada mediante el empleo del patrón peptídico de la invención.

En la presente invención se entiende por “sujeto” o “individuo” a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, en particular, un ser humano, de cualquier raza, sexo o edad. No obstante, en una realización particular, el sujeto es una mujer, más en particular, es una mujer con una edad superior a 50 años.

La puesta en práctica de la invención comprende determinar la presencia o ausencia de los péptidos que comprenden el patrón peptídico de la invención en una muestra biológica procedente de dicho sujeto. En la presente invención se entiende por “muestra biológica” a cualquier material de origen animal, en particular, humano, que incluye excretas (heces y orina), secreciones (genitales, respiratorias,...), sangre o sus componentes, tejidos y fluidos orgánicos (biopsias, líquidos: cefalorraquídeo, sinovial, articular, ascítico,...), etc. En una realización particular, la muestra procedente del sujeto es un fluido biológico que, en otra realización todavía más particular, se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, líquido sinovial y orina.

Una vez que se ha obtenido la muestra biológica del sujeto, ésta debe ser procesada para obtener los péptidos objeto del análisis. Para ello, primero se lleva a cabo el

aislamiento de la fracción proteica de la muestra biológica [etapa a) del método de la invención].

5 Así, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica. Una vez hecho esto, las proteínas son aisladas de la muestra. Cualquiera de las técnicas que existen en el estado de la técnica para aislar proteínas puede ser empleada en la presente invención como por ejemplo, centrifugación, depleción, etc. Una vez aisladas las proteínas, se procede a la digestión
10 de las mismas para obtener el perfil péptido de la invención.

Así, en una segunda etapa [etapa b) del método de la invención], éste comprende digerir la fracción proteica obtenida en la etapa a) con tripsina, llevando a cabo la digestión enzimática de las proteínas y obteniendo péptidos. La tripsina es una enzima
15 peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. La tripsina es producida en el páncreas y secretada en el duodeno (parte del intestino), donde es esencial para la digestión. El pH óptimo es 8 y la temperatura óptima es 37 °C.

20 Una vez obtenidos los péptidos, éstos pueden ser detectados mediante técnicas ampliamente conocidas en el estado de técnica. Ejemplos de dichas técnicas incluyen, sin limitar a, espectrometría de masas, citometría de flujo, Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich
25 con doble anticuerpo) y técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas. En una realización particular, la obtención del patrón peptídico de la invención se lleva a cabo mediante espectrometría de masas, ELISA o citometría de flujo.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite elucidar estructuras
30 químicas, basada en la medición de la relación masa/carga de especies moleculares. Las determinaciones requieren de la generación de especies cargadas eléctricamente, lo cual se logra por diferentes metodologías como pueden ser el impacto electrónico, el bombardeo de átomos rápidos (FAB), y la generación de iones enlazados. La medición de la relación masa/carga permite conocer el peso molecular exacto de la molécula.
35 Técnicas derivadas de la espectrometría de masas que también pueden emplearse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitarse a, la cromatografía de gases-

espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

5 La técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo.

10 En la presente invención, el término “anticuerpo” es interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos [F(ab')₂, Fab, scFv, etc.], siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es decir, que sean capaces de unirse a los péptidos comprendidos dentro del patrón peptídico de la invención. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitarse a, anticuerpos policlonales,
15 anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores
20 enzimáticos, partículas, colorantes, etc.

La citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, en la que las proteínas unidas a un anticuerpo marcado y suspendidas en un fluido, atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz
25 láser, la luz transmitida y dispersada por el paso de las proteínas a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo detectar y separar las proteínas unidas a los anticuerpos marcados.

Una vez obtenido el patrón peptídico del sujeto de estudio, si dicho patrón peptídico
30 comprende los péptidos que aparecen en el patrón peptídico de la invención, entonces se puede concluir que el sujeto padece artrosis.

Kit y *array* de la invención y sus usos

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante “kit de la invención”, que comprende anticuerpos específicos contra los péptidos que comprenden

el patrón peptídico de la invención. Los términos “patrón peptídico”, “péptidos” y “anticuerpo” ya han sido descritos y explicados en la sección anterior y son aplicables al presente aspecto inventivo.

5 Por “kit” se entiende, en el contexto de la presente invención, un producto que contiene los diferentes reactivos para poner en práctica el método de la invención, empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetamiento de los componentes del kit incluyen, sin limitar a, cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y
10 similares.

Adicionalmente, los kits pueden contener instrucciones para el empleo de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar
15 instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamientos electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de internet que proporcionen dichas instrucciones.

20 Como entiende el experto en la materia, la puesta en práctica del método de la invención puede hacerse mediante el empleo de un *array* que comprenda los anticuerpos que reconocen específicamente los péptidos comprendidos en el patrón peptídico de la invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un *array* que comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de
25 anticuerpos comprende anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con los péptidos comprendidos en patrón peptídico de la invención.

Alternativamente, la puesta en práctica del método de la invención también puede hacerse mediante el empleo de un *array* que comprenda los péptidos de la invención.
30 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un *array* que comprende los péptidos comprendidos en el patrón peptídico de la invención.

En la presente invención se entiende por “*array*” o “matriz” a la disposición ordenada (en un soporte generalmente en filas y columnas) de (i) los anticuerpos que reconocen de
35 forma específica los péptidos comprendidos en el patrón peptídico de la invención (*array*

de anticuerpos), o de (ii) los péptidos que comprenden el patrón peptídico de la invención (array de péptidos).

5 En el caso del array de anticuerpos, una vez que las proteínas han sido aisladas de la muestra biológica y digeridas tal como se ha descrito anteriormente en el método de la invención, la disolución resultante se añade al *array* y se incuba la mezcla. Si los péptidos del patrón peptídico de la invención están presentes en la muestra, éstos quedarán unidos al *array*, siendo posible su detección. Cualquier método de detección de los habitualmente empleados en *arrays* puede ser empleado en la puesta en práctica de la presente invención.

10 Por otro lado, como entiende el experto en la materia, dentro de la invención también están contemplados el uso del kit o el *array* de la invención en el diagnóstico *in vitro* de artrosis.

15 Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del kit o del array de la invención para el diagnóstico *in vitro* de artrosis. Alternativamente, el kit de la invención, también puede usarse para diferenciar entre pacientes que padecen artrosis de aquéllos que padecen otras patologías reumáticas diferentes a la artrosis, como por ejemplo, artritis o artritis psoriásica.

20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1:** Diagramas de los análisis de componentes principales (PCA) realizados con los péptidos de la invención obtenidos mediante la técnica de MALDI-TOF, para el grupo de pacientes artrósicos (gris) y para el grupo de pacientes control (negro), en cada porcentaje de elución. Los PCAs muestran que en todas las condiciones de extracción la clasificación de las muestras se consigue en al menos dos planos.

35

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

Ejemplo 1. MATERIAL Y MÉTODOS**1.1 Reactivos**

DL-ditioneitol (DTT $\geq 99\%$)

10 Iodoacetamida (IAA $\geq 99\%$)

Ácido trifluoroacético (TFA $\geq 99\%$, para LC-MS)

Acetonitrilo (ACN, LC-MS CHROMASOLV)

Agua (LC-MS CHROMASOLV)

Bicarbonato amónico ($\geq 99\%$)

15 Tripsina (grado de secuenciación, Roche)

NuTips large 10-200 μl , C-18 (Glygen, Columbia, EE.UU.)

α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid puriss., para MALDI-MS (Fluka, Alemania)

Mezcla de calibración 1, 4700 Proteomics Analyzer (ABSciex, Framingham, MA, EE.UU.)

20

1.2. Muestras de suero

Las muestras de suero humano se obtuvieron de donantes anónimos en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, España. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité de ética local en Galicia (España). Se escogieron 40 muestras de suero de donantes artrósicos (OA), 40 muestras de suero de donantes diagnosticados con artritis reumatoide (AR), 40 muestras de donantes diagnosticados con artritis psoriásica (APS) y 40 muestras de suero de donantes sin ninguna de las anteriores patologías, es decir, son sujetos que no presentan ningún tipo de patología reumática. Este último grupo es el grupo control (N). Se emplearon 20 sueros de cada grupo de pacientes para la búsqueda del patrón peptídico característico de cada patología. Posteriormente, se emplean los otros 20 sueros restantes de cada grupo de pacientes como muestras ciegas para comprobar la validez del patrón peptídico de la invención. Las muestras de suero se almacenaron a -

35 80 °C hasta su procesamiento.

1.3. Depleción secuencial de proteínas en suero

La depleción de proteínas se realizó de acuerdo con el protocolo desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Fernández-Costa et al., *Proteome Sci* 2012; 55).
5 Cada uno de los sueros fueron sometidos a un protocolo de depleción secuencial que implica dos etapas de precipitación: primero con DTT y a continuación con ACN, de acuerdo con el protocolo descrito por Kay et al. (*Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 3255-60), con pequeñas modificaciones. Brevemente, 2,2 μl de DTT 500 mM se añadieron a 20 μl de suero y se agitaron en vórtex. A continuación, la muestra se incubó
10 1 hora hasta la formación de un precipitado blanco viscoso persistente, que se sedimentó por centrifugación a 14,000 xg durante 2 x 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio (LoBind, Eppendorf) y se deplecionó de nuevo mediante la adición de 57 % (v/v) acetonitrilo, seguido de dos ciclos de vórtex breve y 10 minutos de ultrasonidos en un baño de ultrasonidos (SONOREX, Bandelin). El precipitado de
15 proteína formado se sedimentó por centrifugación a 14,000 xg durante 10 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio LoBind y se evaporó a sequedad empleando una centrífuga de vacío.

1.4. Digestión en solución

20 La digestión ultrasónica en solución se realizó de acuerdo con el protocolo de digestión proteolítica ultrarrápida desarrollado previamente (HM Santos et al. *J Proteome Res* 2007,6:3393-9). La muestra evaporada se resuspendió en 20 μl de bicarbonato amónico 25mM (AmBi), se añadieron 10 μl de acetonitrilo y se mezcló mediante vórtex y sonicación durante 1 minuto (50% de amplitud) en baño de ultrasonidos (SONOPULS
25 HD 2200 con accesorio BB6, Bandelin). Los residuos de cisteína de las proteínas se redujeron con 2 μl de DTT 110 mM seguido de vórtex y 1 minuto de sonicación, y a continuación se bloqueó con 2 μl de IAA 600 mM, vórtex y 1 minuto sonicación. Para inactivar la IAA se añadieron a la muestra 10 μl de DTT 110 mM. Después, la muestra
30 se diluyó hasta un volumen final de 200 μl con AmBi 12,5 mM, y se añadió tripsina de acuerdo con un ratio 1:20 (p/p) de tripsina:proteína. La digestión se llevó a cabo en el aparato de ultrasonidos durante 5 minutos a un 50% amplitud. Finalmente, se añadieron 2 μl de ácido fórmico al 50% (v/v) para parar la reacción enzimática. El suero digerido se evaporó a sequedad en una centrífuga de vacío.

35

1.5. Elución secuencial mediante NuTips (separación de péptidos)

Las muestras digeridas se reconstituyeron en 30 μ l de TFA al 0,1 % (v/v), y 20 μ g de digerido se cargaron en una punta de tipo NuTip C18 (large). La separación de los péptidos se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

Acondicionado: se aspiró y expulsó 5 veces 30 μ l de una solución de ACN al 60-80% (v/v) y TFA al 0,1% (v/v), y se lavó 3 veces con TFA al 0,1%.

Unión: se aspiró y expulsó la muestra 50 veces, para permitir que los péptidos se adsorbieran al material de fase reversa empaquetado en la punta.

Elución secuencial: se aspiró y expulsó (20 veces cada uno) 30 μ l de diferentes porcentajes de ACN, de baja a alta concentración de ACN. La elución secuencial se realizó con 4, 7, 10 y 14% (v/v) de ACN. Los eluidos se evaporaron a sequedad.

1.6. Análisis mediante espectrometría de masas

Las muestras evaporadas se resuspendieron en 6 μ l de TFA al 0,1 % (v/v), y 1 μ l de cada muestra se depositó por quintuplicado en una placa para MALDI (placa de 384 puntos recubierta de Teflón®), y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron a las muestras secas de péptidos 1 μ l de una solución de 3 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en TFA al 0,1% (v/v) y 50% (v/v) ACN, y se dejó secar de nuevo.

Las muestras se analizaron en modo de ion positivo usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer (ABSciex, Framingham, MA, EE.UU.), equipado con un láser Nd:YAG ($\lambda=355$ nm) y el programa 4000 Series Explorer™ (ABSciex). La calibración interna, adquisición de datos, procesamiento e interpretación se llevaron a cabo según lo recomendado por el fabricante. Todos los espectros de masas deben ser calibrados externamente empleando una mezcla de péptidos estándar (ABSciex). Los datos de masas se exportaron de acuerdo con las siguientes características: a) rango de masas: 500 – 4000 (Da); b) densidad de picos: máximo 50 picos por 200 Da; c) relación señal/ruido: mínimo 20; d) área mínima: 100; e) picos máximos/spot: 500.

El análisis del espectro de masas para cada muestra corresponde a un promedio de 1.500 disparos de láser. Los espectros de fragmentación se adquieren mediante la selección de los precursores de interés en cada mapa de masas MALDI-TOF, con un promedio de 2.000 disparos de láser por espectro. Para la fragmentación (MS/MS), todos los picos con un ratio señal/ruido (S/N)>10 se incluyeron en la búsqueda en bases de datos.

La secuenciación de péptidos se realizó mediante el software ProteinPilot™ (ABSciex), con los siguientes parámetros: (i) Versión UniProt: 2013_09, que contiene 540,958 entradas de secuencia, (ii) Taxonomía: Homo sapiens, (iii) Enzima: tripsina o sin enzima; (v) Modificaciones fijas: iodoacetamida. Sólo se informó de los péptidos identificados con al menos un 70 % de confianza.

1.7. Análisis bioinformático

Cada espectro se pre-procesó empleando los siguientes parámetros: rango de masas de 500 a 4000 Da, densidad de picos máxima: 10 picos por 200 Da, relación señal/ruido mínimo (S/N) de 10, área mínima de 100, número máximo de picos por espectro: 120. Los picos se alinearon con una tolerancia de la masa del péptido de 150 ppm y, finalmente, se creó un espectro representativo para cada muestra con aquellos picos presentes en al menos 4 de las 5 réplicas espectrales de la muestra. De cada pico sólo se tuvo en cuenta su presencia o ausencia en cada espectro, descartándose el uso de su intensidad más allá del pre-procesamiento.

Con el objetivo de identificar picos diferencialmente expresados en los distintos grupos se aplicó el test de independencia de Fisher para comparaciones entre dos grupos y el test de independencia X^2 para comparaciones entre los cuatro grupos analizados. Dado que estos tests se realizaron sobre todos los picos detectados, se aplicó posteriormente la corrección False Discovery Rate (FDR) de Benjamini-Hochberg con el fin de reducir el número de falsos positivos.

Mediante el uso de Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) se analizó gráficamente la separación entre las muestras de distintas condiciones.

35

Por último, con el objetivo de comprobar la utilidad de los péptidos que comprenden el patrón peptídico descrito en la presente invención para el diagnóstico de artritis, se evaluó el rendimiento de clasificadores automáticos entrenados únicamente con la información de estos péptidos sobre un conjunto de muestras ciegas.

5

Ejemplo 2. RESULTADOS

2.1. Obtención del patrón peptídico característico de la artrosis

10 Para la obtención del patrón peptídico descrito en la presente invención se utilizaron 20 muestras de suero de cada uno de los grupos de pacientes incluidos en el presente estudio (OA: artrosis, AR: artritis reumatoide, APS: artritis psoriásica y N; control) y mediante las técnicas descritas en el Ejemplo 1 se detectaron los péptidos característicos de cada uno de los grupos de estudio analizados. Brevemente, primero
15 se seleccionaron los péptidos que se detectan de forma significativa en una patología con respecto a las otras en base al valor $q < 0,05$ del test de Fisher corregido aplicado por parejas. Y después se seleccionaron los péptidos que se detectan de forma significativa en dos o más condiciones de acuerdo con un valor $q < 0,05$ del test de independencia X^2 corregido, como se ha indicado anteriormente.

20

Mediante dicha metodología se identificaron un total de 11 péptidos que se expresaban de forma significativa en el grupo de pacientes artrósicos respecto al resto de grupos incluidos en el estudio. Este patrón peptídico específico permite distinguir las muestras de los sujetos con artrosis (OA) de las muestras de sujetos control (N), e incluso de las
25 muestras de los sujetos que padecen otras enfermedades reumáticas, como la artritis psoriásica (APS) y la artritis reumatoide (AR).

Dicho conjunto de 11 péptidos que forman el patrón peptídico de la invención, se muestran en la **Tabla 7**.

30

Tabla 7: Masas de los péptidos característicos que comprenden el patrón peptídico para el diagnóstico de pacientes que padecen artrosis (OA). Los porcentajes indican la presencia de cada péptido en el total de las muestras analizadas para cada grupo de pacientes, APS: grupo de pacientes que padecen artritis psoriásica; AR: grupo de
35 pacientes que padecen artritis reumatoide; N: grupo de sujetos control.

| m/z | SEQ ID No. | APS (n=20) | AR (n= 20) | OA (n=20) | N (n=20) |
|-----------|------------|---------------|---------------|--------------|-------------|
| 1392,7517 | 1 | 0% | 5% | 50% | 10% |
| 1532,796 | 2 | 5% | 15% | 40% | 0% |
| 1758,979 | 3 | 5% | 5% | 40% | 0% |
| 1909,9498 | 4 | 0% | 5% | 40% | 0% |
| 2165,146 | 5 | 10% | 5% | 45% | 0% |
| 2180,1414 | 6 | 15% | 10% | 70% | 20% |
| 2280,1501 | 7 | 5% | 5% | 40% | 5% |
| 2291,227 | 8 | 5% | 10% | 60% | 20% |
| 2407,3042 | 9 | 5% | 0% | 45% | 0% |
| 2436,3015 | 10 | 35% | 25% | 90% | 40% |
| 2663,4382 | 11 | 5% | 5% | 60% | 15% |

Los péptidos escogidos como característicos de artrosis aparecen significativamente más en los sueros de donantes artrósicos que en los sueros de los pacientes control o de los pacientes que padecen APS o AR.

5

2.2. Péptidos adicionales específicos para el diagnóstico de otras patologías como AR y APS

Además de la detección del patrón peptídico descrito en la invención, mediante los métodos descritos previamente se seleccionaron un conjunto de péptidos adicionales a los 11 péptidos que comprenden el patrón peptídico de la invención para el diagnóstico de la artrosis, para mejorar la clasificación de las muestras, preferentemente muestras de suero, de donantes artrósicos. Dichos péptidos adicionales se seleccionaron de los datos procedentes del análisis de las 80 muestras de suero analizadas. En este caso, al tratarse de comparaciones entre parejas de condiciones, los péptidos seleccionados fueron aquellos para los que se obtuvo un valor $q < 0,05$ para el test de Fisher corregido.

En la **Tabla 8** se muestran los péptidos adicionales que pueden utilizarse junto con el patrón peptídico de la invención y que son capaces de diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales, que no padecen ninguna patología artrósica.

20

Tabla 8. Masas de los péptidos adicionales al patrón peptídico de la invención, útiles para clasificar y diagnosticar a pacientes que padecen artrosis (OA) de sujetos que no padecen ninguna patología artrósica. Los porcentajes indican la presencia de cada péptido en el total de las muestras analizadas para cada grupo de pacientes.

5

| m/z | SEQ ID No. | OA (n=20) | N (n=20) |
|----------|------------|-----------|----------|
| 896,490 | 13 | 65% | 5% |
| 961,627 | 14 | 70% | 15% |
| 980,529 | 15 | 70% | 20% |
| 1019,604 | 16 | 65% | 10% |
| 1108,588 | 17 | 50% | 0% |
| 1117,669 | 18 | 55% | 5% |
| 1148,634 | 19 | 75% | 15% |
| 1213,667 | 20 | 60% | 5% |
| 1237,674 | 21 | 50% | 0% |
| 1255,716 | 24 | 50% | 0% |
| 1403,749 | 28 | 45% | 0% |
| 1470,813 | 32 | 70% | 5% |
| 1502,810 | 33 | 65% | 5% |
| 1568,914 | 36 | 75% | 20% |
| 1585,846 | 38 | 50% | 10% |
| 1641,892 | 40 | 85% | 35% |
| 1641,892 | 41 | 85% | 35% |
| 1669,862 | 42 | 80% | 45% |
| 1706,931 | 43 | 70% | 5% |
| 1815,922 | 51 | 60% | 10% |
| 1825,005 | 52 | 80% | 30% |
| 1834,946 | 53 | 45% | 5% |
| 1864,027 | 54 | 75% | 25% |
| 1875,997 | 55 | 75% | 20% |
| 1876,017 | 56 | 75% | 20% |
| 1884,000 | 57 | 65% | 20% |
| 2186,092 | 65 | 60% | 10% |
| 2296,219 | 67 | 80% | 20% |
| 2315,195 | 68 | 75% | 30% |
| 2348,245 | 70 | 95% | 30% |
| 2652,448 | 75 | 70% | 5% |
| 2670,387 | 76 | 50% | 15% |
| 2695,362 | 77 | 95% | 40% |
| 2790,425 | 78 | 55% | 15% |

Alternativamente, en la **Tabla 9** se muestran los péptidos adicionales que pueden utilizarse junto con el patrón peptídico de la invención y que también, son capaces de diferenciar entre sujetos artrósicos y sujetos normales, que no padecen ninguna patología artrósica. La diferencia entre los datos mostrados en la Tabla 8 y la Tabla 9 radica en que en la Tabla 8 los sujetos artrósicos muestran una mayor presencia de dichos péptidos, mientras que los datos mostrados en la Tabla 9 ponen de manifiesto que los sujetos artrósicos muestran una menor presencia de dichos péptidos respecto a los sujetos control, sanos.

Tabla 9. Masas de los péptidos adicionales al patrón peptídico de la invención, útiles para clasificar y diagnosticar a pacientes que padecen artrosis (OA) de sujetos que no padecen ninguna patología artrósica. Los porcentajes indican la presencia de cada péptido en el total de las muestras analizadas para cada grupo de pacientes,

| m/z | SEQ ID No. | OA (n=20) | N (n=20) |
|----------|------------|-----------|----------|
| 871,502 | 12 | 0% | 30% |
| 1518,710 | 34 | 15% | 55% |
| 1810,992 | 50 | 5% | 40% |
| 1922,877 | 60 | 5% | 50% |
| 2012,011 | 62 | 40% | 80% |
| 2153,112 | 64 | 30% | 90% |
| 2602,358 | 74 | 35% | 65% |

En la **Tabla 10** se muestran los péptidos adicionales que pueden utilizarse junto con el patrón peptídico de la invención y que son capaces de diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis reumatoide. Es interesante destacar que, como se puede apreciar en dicha Tabla 10, los sujetos que padecen OA presentan una mayor presencia de los péptidos SEQ ID NO: 30, 59 y 69, respecto a los pacientes que padecen AR. En cambio, los sujetos artrósicos presentan una menor presencia de los péptidos SEQ ID NO: 22, 23, 26, 31, 35, 39, 45, 46, 47, 48, 58, 61, 63, 66, 71, 72 y 73, respecto a los sujetos que padecen AR.

Tabla 10. Masas de los péptidos adicionales al patrón peptídico de la invención, útiles para clasificar y diagnosticar a pacientes que padecen artrosis (OA) de sujetos que padecen artritis reumatoide (AR). Los porcentajes indican la presencia de cada péptido en el total de las muestras analizadas para cada grupo de pacientes.

| m/z | SEQ ID No. | AR (n=20) | OA (n=20) |
|----------|------------|-----------|-----------|
| 1247,652 | 22 | 50% | 25% |
| 1249,655 | 23 | 30% | 0% |
| 1299,609 | 26 | 90% | 20% |
| 1465,689 | 30 | 30% | 80% |
| 1467,852 | 31 | 90% | 45% |
| 1519,750 | 35 | 30% | 0% |
| 1612,849 | 39 | 55% | 20% |
| 1736,970 | 45 | 35% | 0% |
| 1743,882 | 46 | 45% | 10% |
| 1745,901 | 47 | 45% | 5% |
| 1771,885 | 48 | 90% | 25% |
| 1899,060 | 58 | 55% | 15% |
| 1906,873 | 59 | 5% | 80% |
| 1932,038 | 61 | 45% | 0% |
| 2020,138 | 63 | 60% | 15% |
| 2190,112 | 66 | 85% | 20% |
| 2344,169 | 69 | 5% | 80% |
| 2394,298 | 71 | 60% | 10% |
| 2409,281 | 72 | 50% | 0% |
| 2565,322 | 73 | 70% | 20% |

En la **Tabla 11** se muestran los péptidos adicionales que pueden utilizarse junto con el patrón peptídico de la invención y que son capaces de diferenciar entre sujetos artrósicos de sujetos que padecen artritis psoriásica. Es interesante destacar que, como se puede apreciar en dicha Tabla 11, los sujetos que padecen OA presentan una mayor presencia de los péptidos SEQ ID NO: 25, 29, 30, 59 y 69, respecto a los pacientes que padecen APS. En cambio, los sujetos artrósicos presentan una menor presencia de los péptidos SEQ ID NO: 22, 26, 27, 31, 37, 39, 46, 47, 48, 49, 58, 66 y 79 respecto a los sujetos que padecen APS.

Tabla 11. Masas de los péptidos adicionales al patrón peptídico de la invención útiles para clasificar y diagnosticar a pacientes que padecen artrosis (OA) de sujetos que padecen artritis psoriásica (APS). Los porcentajes indican la presencia de cada péptido en el total de las muestras analizadas para cada grupo de pacientes.

| m/z | SEQ ID No. | APS (n=20) | OA (n=20) |
|----------|------------|------------|-----------|
| 1247,652 | 22 | 55% | 25% |
| 1263,683 | 25 | 10% | 60% |
| 1299,609 | 26 | 90% | 20% |
| 1380,780 | 27 | 30% | 0% |
| 1449,800 | 29 | 25% | 75% |
| 1465,689 | 30 | 5% | 80% |
| 1467,852 | 31 | 95% | 45% |
| 1569,907 | 37 | 50% | 0% |
| 1612,849 | 39 | 75% | 20% |
| 1743,882 | 46 | 55% | 10% |
| 1745,901 | 47 | 25% | 5% |
| 1771,885 | 48 | 95% | 25% |
| 1786,909 | 49 | 65% | 20% |
| 1899,060 | 58 | 50% | 15% |
| 1906,873 | 59 | 0% | 80% |
| 2190,132 | 66 | 70% | 20% |
| 2344,169 | 69 | 0% | 80% |
| 2940,755 | 79 | 60% | 20% |

2.3. Análisis de componentes principales (PCA).

5 Con los péptidos seleccionados en el perfil peptídico descrito en la invención obtenidos de las muestras de sueros del grupo de pacientes artrósicos y de las muestras del grupo control se realizó un análisis de componentes principales (PCA), comprobando que las muestras se separan en al menos dos planos para todas las condiciones de elución, con lo que los péptidos son capaces de diferenciar entre muestras de donantes artrósicos y
10 sujetos control.

Antes de realizar el PCA, se creó un grupo de datos único para cada porcentaje de elución (4%, 7%, 10% y 14%), con el espectro representativo de cada muestra. Los espectros de cada grupo de datos se convirtieron en vectores 1s y 0s, donde 1 significa
15 presencia de pico y 0 significa ausencia de pico.

El análisis PCA y su visualización se realizaron usando el programa RapidMiner v5,3 (<http://rapid-i.com/content/view/181/190/>), que configura el algoritmo PCA para reducir la dimensionalidad de los grupos de datos hasta 3 componentes principales.

Estos resultados se muestran en la **Figura 1**.

2.4. Comprobación del clasificador con muestras ciegas

5 Se comprobó la utilidad de los péptidos que comprenden el patrón peptídico descrito en la presente invención para el diagnóstico de artrosis en un grupo de pacientes del que no se conocía la patología que padecían (muestras ciegas). Las muestras de dichos pacientes (n=79) se procesaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente en materiales y métodos.

10

Utilizando el conjunto de datos descrito en la sección 2.1 se evaluaron una serie de clasificadores automáticos mediante la herramienta de aprendizaje automático Weka 3.7 (<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>). Estos clasificadores fueron entrenados con las distintas combinaciones posibles de los datos de cada elución. Esta evaluación se hizo
 15 utilizando el esquema de validación cruzada conocido como Leave-One-Out sobre dos problemas distintos: *i*) clasificación de muestras de todas las condiciones y *ii*) clasificación de las muestras que presentan una condición relacionada con una patológica (grupos AR, APS y OA). Como resultado de esta evaluación se seleccionó como mejor clasificador para el problema de clasificar todas las condiciones a la
 20 implementación LibSVM del algoritmo Support Vector Machine (SVM) con *kernel* Radial Basis Function (RBF) entrenado con los datos de los porcentajes de elución 7% y 10% y combinado con un optimizador de parámetros basado en una búsqueda en rejilla (algoritmo GridSearch) configurado para buscar el valor óptimo del parámetro “cost” entre los valores 2^{-5} , 2^{-3} , 2^{-1} , 2^1 , 2^3 , 2^5 , 2^7 , 2^9 , 2^{11} , 2^{13} y 2^{15} , y del parámetro “gamma”
 25 entre los valores 2^{-15} , 2^{-13} , 2^{-11} , 2^{-9} , 2^{-7} , 2^{-5} , 2^{-3} , 2^{-1} , 2^1 y 2^3 . Por otro lado, se seleccionó como mejor clasificador para el problema de clasificar las condiciones patológicas al clasificador Artificial Neural Network (ANN) entrenado con los datos del porcentaje 10%.

20

25

30

Con estos clasificadores entrenados con el conjunto de datos descrito en la sección 2.1 se realizó la clasificación del conjunto de datos de muestras ciegas. En el caso del clasificador SVM-RBF para el problema de todas las condiciones, el poder de clasificación fue moderado, al presentar un porcentaje de aciertos ligeramente superior al 60% y un valor del estadístico Kappa de Cohen (kappa) aproximado de 0,48. Por otro lado, el clasificador ANN para el problema de las condiciones patológicas mostró unos
 35 resultados superiores, con un porcentaje de aciertos próximo al 75% y un valor de kappa de 0,619. Los resultados de la clasificación se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Clasificadores automáticos creados mediante el uso del patrón peptídico descrito en la presente invención obtenido a partir de muestras de suero analizadas de cada grupo de pacientes (n= 20 para cada grupo de pacientes). Conds.: condiciones, Clas.: clasificador, Elu.: porcentajes de elución, %Ac.: porcentaje de aciertos, K: kappa global, Cond.: condición, Sen.: sensibilidad por condición, Esp.: especificidad por condición, n: muestras por condición, N: total de muestras, DC: diagnóstico correcto, DCP: diagnóstico correcto por patología.

| Conds. | Clas. | Elu. | %Ac. | K | Cond. | Sen. | Esp. | n | N | DC | DCP |
|-------------------|---------------------|-----------|-------|-------|-------|------|------|----|----|----|-----|
| Todas | SVM- RBF- OPT | 7% 10% | 60,76 | 0,477 | APS | 0,80 | 0,93 | 20 | 79 | 48 | 16 |
| | | | | | AR | 1,00 | 0,92 | 19 | | | 19 |
| | | | | | OA | 0,45 | 0,75 | 20 | | | 9 |
| | | | | | N | 0,20 | 0,88 | 20 | | | 4 |
| Patologías | ANN | 10% | 74,58 | 0,619 | APS | 0,55 | 0,90 | 20 | 59 | 44 | 11 |
| | | | | | AR | 0,89 | 0,38 | 19 | | | 17 |
| | | | | | OA | 0,80 | 0,23 | 20 | | | 16 |

10

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de un patrón peptídico que comprende los siguientes péptidos:

| | Masa/carga(m/z) | Peso molecular(Da) | SEQ ID NO: |
|------------|-----------------|--------------------|------------|
| Péptido 01 | 1392,7526 | 1391,7526 | 1 |
| Péptido 02 | 1532,8060 | 1531,806 | 2 |
| Péptido 03 | 1758,9790 | 1757,979 | 3 |
| Péptido 04 | 1910,0176 | 1909,0176 | 4 |
| Péptido 05 | 2165,1272 | 2164,1272 | 5 |
| Péptido 06 | 2180,1445 | 2179,1445 | 6 |
| Péptido 07 | 2280,1501 | 2279,1501 | 7 |
| Péptido 08 | 2291,2260 | 2290,226 | 8 |
| Péptido 09 | 2407,2880 | 2406,288 | 9 |
| Péptido 10 | 2436,2922 | 2435,2922 | 10 y el |
| Péptido 11 | 2663,4314 | 2662,4314 | 11, |

5 como marcador en el diagnóstico de artrosis en un sujeto.

2. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que el patrón peptídico comprende además al menos uno de los péptidos:

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: |
|------------|------------------|---------------------|------------|
| Péptido 12 | 871,502 | 870,502 | 12 |
| Péptido 13 | 896,490 | 895,490 | 13 |
| Péptido 14 | 961,627 | 960,627 | 14 |
| Péptido 15 | 980,529 | 979,529 | 15 |
| Péptido 16 | 1019,604 | 1018,604 | 16 |
| Péptido 17 | 1108,588 | 1107,588 | 17 |
| Péptido 18 | 1117,669 | 1116,669 | 18 |
| Péptido 19 | 1148,634 | 1147,634 | 19 |
| Péptido 20 | 1213,667 | 1212,667 | 20 |
| Péptido 21 | 1237,674 | 1236,674 | 21 |
| Péptido 24 | 1255,716 | 1254,716 | 24 |
| Péptido 28 | 1403,749 | 1402,749 | 28 |
| Péptido 32 | 1470,813 | 1469,813 | 32 |
| Péptido 33 | 1502,810 | 1501,810 | 33 |
| Péptido 34 | 1518,710 | 1517,71 | 34 |
| Péptido 36 | 1568,914 | 1567,914 | 36 |

ES 2 568 702 A1

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: |
|------------|------------------|---------------------|------------|
| Péptido 38 | 1585,846 | 1584,846 | 38 |
| Péptido 40 | 1641,892 | 1640,892 | 40 |
| Péptido 41 | 1641,892 | 1640,892 | 41 |
| Péptido 42 | 1669,862 | 1668,862 | 42 |
| Péptido 43 | 1706,931 | 1705,931 | 43 |
| Péptido 50 | 1810,992 | 1809,992 | 50 |
| Péptido 51 | 1815,922 | 1814,922 | 51 |
| Péptido 52 | 1825,005 | 1824,005 | 52 |
| Péptido 53 | 1834,946 | 1833,946 | 53 |
| Péptido 54 | 1864,027 | 1863,027 | 54 |
| Péptido 55 | 1875,997 | 1874,997 | 55 |
| Péptido 56 | 1876,017 | 1875,017 | 56 |
| Péptido 57 | 1884,000 | 1883,000 | 57 |
| Péptido 60 | 1922,877 | 1921,877 | 60 |
| Péptido 62 | 2012,011 | 2011,011 | 62 |
| Péptido 64 | 2153,112 | 2152,112 | 64 |
| Péptido 65 | 2186,092 | 2185,092 | 65 |
| Péptido 67 | 2296,219 | 2295,219 | 67 |
| Péptido 68 | 2315,195 | 2314,195 | 68 |
| Péptido 70 | 2348,245 | 2347,245 | 70 |
| Péptido 74 | 2602,358 | 2601,358 | 74 |
| Péptido 75 | 2652,448 | 2651,448 | 75 |
| Péptido 76 | 2670,387 | 2669,387 | 76 |
| Péptido 77 | 2695,362 | 2694,362 | 77 |
| Péptido 78 | 2790,425 | 2789,425 | 78 |

3. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que el patrón peptídico comprende además al menos uno de los péptidos:

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: |
|------------|------------------|---------------------|------------|
| Péptido 22 | 1247,652 | 1246,652 | 22 |
| Péptido 23 | 1249,655 | 1248,655 | 23 |
| Péptido 26 | 1299,609 | 1298,609 | 26 |
| Péptido 30 | 1465,689 | 1464,689 | 30 |
| Péptido 31 | 1467,852 | 1466,852 | 31 |
| Péptido 35 | 1519,750 | 1518,750 | 35 |
| Péptido 39 | 1612,849 | 1611,849 | 39 |
| Péptido 45 | 1736,970 | 1735,970 | 45 |
| Péptido 46 | 1743,885 | 1742,882 | 46 |
| Péptido 47 | 1745,901 | 1744,901 | 47 |

ES 2 568 702 A1

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: |
|------------|------------------|---------------------|------------|
| Péptido 48 | 1771,885 | 1770,885 | 48 |
| Péptido 58 | 1899,060 | 1898,060 | 58 |
| Péptido 59 | 1906,873 | 1905,873 | 59 |
| Péptido 61 | 1932,038 | 1931,038 | 61 |
| Péptido 63 | 2020,138 | 2019,138 | 63 |
| Péptido 66 | 2190,132 | 2189,132 | 66 |
| Péptido 69 | 2344,169 | 2343,169 | 69 |
| Péptido 71 | 2394,298 | 2393,298 | 71 |
| Péptido 72 | 2409,281 | 2408,281 | 72 |
| Péptido 73 | 2565,322 | 2564,322 | 73 |

4. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que el patrón peptídico comprende además al menos uno de los péptidos:

| | Masa/carga (m/z) | Peso molecular (Da) | SEQ ID NO: |
|------------|------------------|---------------------|------------|
| Péptido 22 | 1247,652 | 1246,652 | 22 |
| Péptido 25 | 1263,683 | 1262,683 | 25 |
| Péptido 26 | 1299,609 | 1298,609 | 26 |
| Péptido 27 | 1380,780 | 1379,780 | 27 |
| Péptido 29 | 1449,800 | 1448,800 | 29 |
| Péptido 30 | 1465,689 | 1464,689 | 30 |
| Péptido 31 | 1467,852 | 1466,852 | 31 |
| Péptido 37 | 1569,907 | 1568,907 | 37 |
| Péptido 39 | 1612,849 | 1611,849 | 39 |
| Péptido 46 | 1743,882 | 1742,882 | 46 |
| Péptido 47 | 1745,901 | 1744,901 | 47 |
| Péptido 48 | 1771,885 | 1770,885 | 48 |
| Péptido 49 | 1786,909 | 1785,909 | 49 |
| Péptido 58 | 1899,060 | 1898,060 | 58 |
| Péptido 59 | 1906,873 | 1905,873 | 59 |
| Péptido 66 | 2190,132 | 2189,132 | 66 |
| Péptido 69 | 2344,169 | 2343,169 | 69 |
| Péptido 79 | 2940,755 | 2939,755 | 79 |

5

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizado por que el patrón peptídico es característico de sujetos que presentan artrosis frente a sujetos control sanos o frente sujetos que padecen otra patología artrósica diferente a la artrosis.

10

6. Uso según la reivindicación 5 caracterizado por que las patologías artrósicas diferentes a la artrosis se seleccionan entre: artritis reumatoide o artritis psoriásica.

7. Uso según la reivindicación 3 caracterizado por que selecciona entre sujetos que padecen artrosis de sujetos que padecen artritis reumatoide.

5 8. Uso según la reivindicación 4 caracterizado por que selecciona entre sujetos que padecen artrosis de sujetos que padecen artritis psoriásica.

9. Método *in vitro* para diagnosticar artrosis en un sujeto, o para monitorizar la eficacia de la terapia administrada a un sujeto que padece artrosis, que comprende:

- 10 a) aislar la fracción proteica de una muestra biológica procedente del sujeto,
b) digerir la fracción proteica obtenida en la etapa a) con tripsina, y
c) detectar la presencia o ausencia de un patrón peptídico según se describe en la reivindicación 1,

15 en donde si dicho patrón peptídico es detectado, entonces el sujeto padece artrosis o la terapia administrada al sujeto no está siendo eficaz.

10. Método según la reivindicación 9, caracterizado por que en la etapa c) adicionalmente se puede detectar la presencia o ausencia de los patrones peptídicos según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

20 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en que la muestra es un fluido biológico.

25 12. Método según la reivindicación 11, en el que el fluido biológico se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, líquido sinovial y orina.

30 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la obtención del patrón peptídico se lleva a cabo mediante espectrometría de masas, ELISA o citometría de flujo.

35 14. Un Kit para llevar a cabo los usos según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y/o el método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, que comprende anticuerpos específicos contra los péptidos comprendidos en el patrón peptídico según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15. Un array para llevar a cabo los usos según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y/o el método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, que comprende un

conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos comprende anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con los péptidos comprendidos en patrón peptídico según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5

16. Un array para llevar a cabo los usos según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y/o el método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, que comprende los péptidos que comprenden el patrón peptídico según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10

17. Uso de un kit según la reivindicación 14 o un array según la reivindicación 15 ó 16 para el diagnóstico *in vitro* de artrosis, o para monitorizar la eficacia de la terapia administrada a un sujeto que padece artrosis.

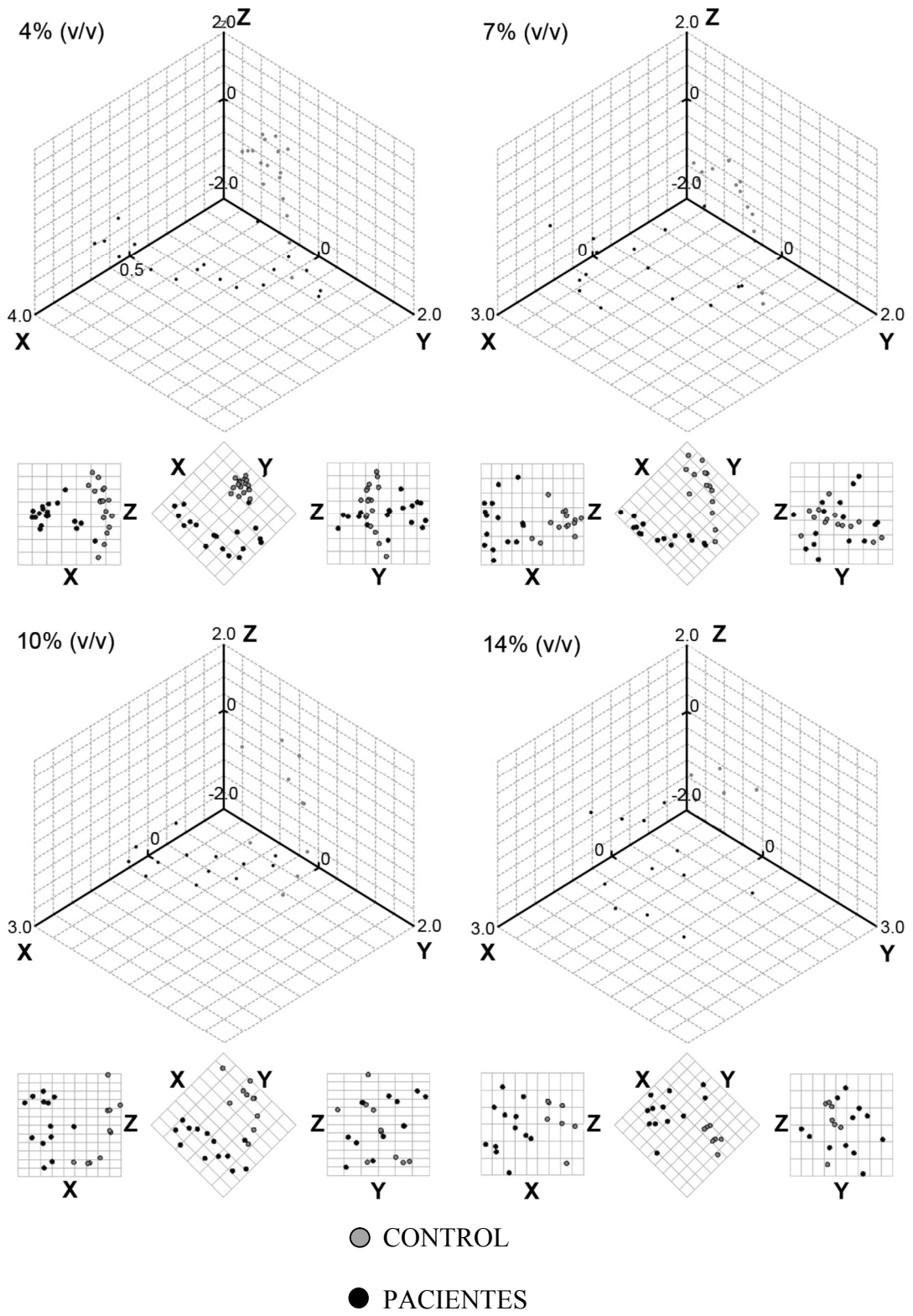


FIG. 1

ES 2 568 702 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Profesor Novoa Santos
Servizo Galego de Saude (SERGAS)
Universidade de Vigo

<120> Método para el diagnóstico de Artrosis

<130> ES2010.2

<160> 79

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg Met Glu Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Lys Trp Glu Ala Glu Pro Val Tyr Val Gln Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Leu Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

ES 2 568 702 A1

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg
1 5 10 15
Asp Arg

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Asp Ser Phe His Leu Asp Glu Gln Phe Thr Val Pro Val Glu Met Met
1 5 10 15
Gln Ala Arg

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser
1 5 10 15
Asp Glu Leu Arg
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg
1 5 10 15
Asp Arg Ala Arg
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu
1 5 10 15
Met Arg Asp Arg
20

<210> 11
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu
1 5 10 15

ES 2 568 702 A1

Met Arg Asp Arg Ala Arg
20

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Val Leu Asn Gln Glu Leu Arg
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gly Val Thr Phe Leu Leu Arg Arg
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Val Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Leu Gln Thr Asp Leu Ser Glu Phe Arg
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 568 702 A1

<400> 18
Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Asp Ala Val Ser Ala Ala Phe Lys Gly Leu Lys
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Leu Glu Thr Pro Asp Phe Gln Leu Phe Lys
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Leu Arg Cys Leu Ala Pro Leu Glu Gly Ala Arg
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 568 702 A1

<400> 25
Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys
1 5 10

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg
1 5

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys Tyr His
1 5 10

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10 15

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 568 702 A1

<400> 32
Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Val Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg
1 5 10

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10 15

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Ala Leu Tyr Leu Gln Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Arg
1 5 10

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg
1 5 10 15

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg
1 5 10 15

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg
1 5 10

<210> 39

ES 2 568 702 A1

<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg
1 5 10

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Ala Gly Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln Arg
1 5 10

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg
1 5 10 15

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Tyr Val Met Leu Pro Val Ala Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys

ES 2 568 702 A1

1 5 10 15
 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Tyr Val Gly Gly Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Ser Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Gly Leu Pro Gly Pro Pro Asp Val Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro
 1 5 10 15
 Phe

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Lys

<210> 52

ES 2 568 702 A1

<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Ile Leu Gly Gly His Leu Asp Ala Lys Gly Ser Phe Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15
Lys

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Asp Tyr Ala Glu Val Gly Arg
1 5 10 15

<210> 54
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
1 5 10 15
Lys

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Val Thr Leu Thr Cys Val Ala Pro Leu Ser Gly Val Asp Phe Gln Leu
1 5 10 15
Arg

<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg

ES 2 568 702 A1

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys
1 5 10 15

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
1 5 10 15
Lys

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
1 5 10 15
Lys

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
1 5 10 15
Arg

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu
1 5 10 15
Lys Lys

<210> 63
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His
1 5 10 15

ES 2 568 702 A1

Val Phe Arg

<210> 64
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp
1 5 10 15
Gly Arg

<210> 65
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
1 5 10 15
Ala Lys Lys

<210> 66
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Cys Glu Gly Pro Ile Pro Asp Val Thr Phe Glu Leu Leu Arg Glu Gly
1 5 10 15
Glu Thr Lys

<210> 67
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Thr Pro Gly Ala Ala Ala Asn Leu Glu Leu Ile Phe Val Gly Pro Gln
1 5 10 15
His Ala Gly Asn Tyr Arg
20

<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
1 5 10 15
Glu Gln Trp Lys
20

<210> 69
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 568 702 A1

<400> 69

Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
 1 5 10 15
 Lys His Ala Thr Lys
 20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Gln Arg
 20

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys Ile Asp Gln Thr Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Arg
 20

<210> 72

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Ala His Gly Pro Arg Pro Asp Thr Val Gly Gln Arg Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Arg Pro Ser Pro Gly Pro Ile Arg
 20

<210> 73

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly Asp Pro Gly Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Lys Gly Glu Val Gly Ala Asp Gly Val
 20 25

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ala Val Pro Pro Asn Asn Ser Asn Ala Ala Glu Asp Asp Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Gln Gly Val Val Pro Arg
 20 25

<210> 75

<211> 25

<212> PRT

ES 2 568 702 A1

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Val Arg Thr Pro Gly Ala Ala Ala Asn Leu Glu Leu Ile Phe Val
 1 5 10 15
 Gly Pro Gln His Ala Gly Asn Tyr Arg
 20 25

<210> 76

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Val Tyr Val Asp Val Leu Lys
 20

<210> 77

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 1 5 10 15
 Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 20

<210> 78

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Tyr Arg Ser Trp Val Pro His Thr Phe Glu Ser Glu Leu Ser Asp Pro
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Leu Val Ala Glu Ser
 20

<210> 79

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys
 20 25