

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

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

01.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2016

Fecha de la concesión:

06.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.02.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070717

73 Titular/es:

**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 B1

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.

10

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

25 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.

30 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 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	VGIVSGWGR
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	VLGAFSDGLAHLNLK
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	LTPYADEFKVKIDQTVLEELR
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	AVPPNNSNAEDDLPTVELQGVV 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	LYHSEAFTVNFQDTEEAkk
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 inmunoadsorción 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.

30 Una vez obtenido el patrón peptídico del sujeto de estudio, si dicho patrón peptídico 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 -80 °C hasta su procesamiento.

35

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 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 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” 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

35

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 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 B1

	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 B1

	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.

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.

25

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.

30

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.

35

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.

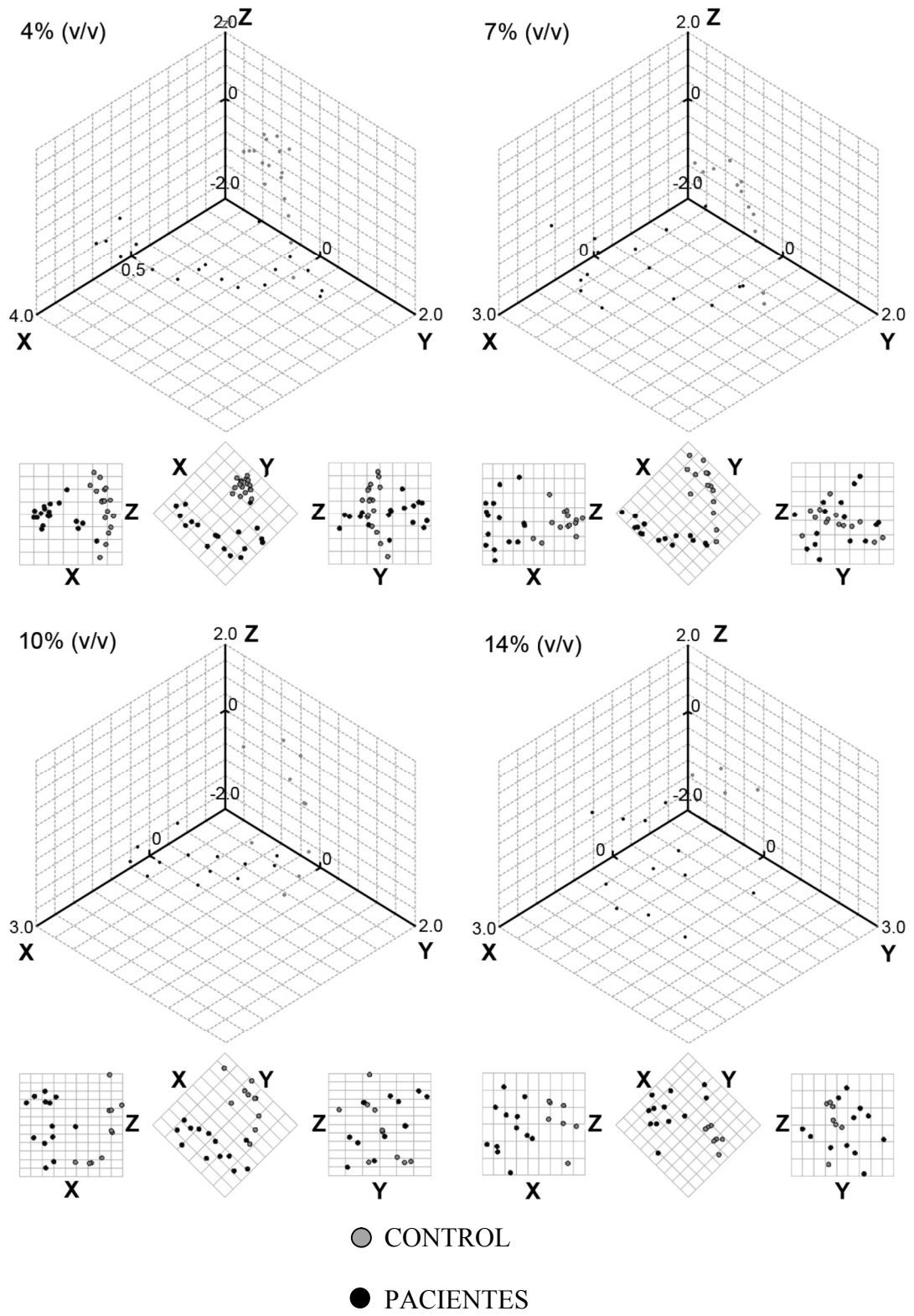


FIG. 1

ES 2 568 702 B1

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 B1

<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

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 B1

<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 B1

<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 B1

<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 B1

<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 B1

<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 B1

<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 B1

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 B1

<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 B1

<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