



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 573**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02745526 .0**
86 Fecha de presentación : **13.06.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1395825**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **Procedimiento de detección de autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide.**

30 Prioridad: **13.06.2001 FR 01 08068**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **BIOMERIEUX**
69280 Marcy-l'Etoile, FR

72 Inventor/es: **Incaugarat, Brigitte;**
Jolivet, Michel;
Letourneur, Odile;
Nogueira, Maria, Léonor;
Sebbag, Mireille;
Serre, Guy y
Vincent, Christian

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 283 573 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide.

5 La poliartritis reumatoide (PR) es el más frecuente de los reumatismos inflamatorios crónicos. Se trata de una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una inflamación de las articulaciones que afecta a más de 500.000 personas en Francia y a más de 2 millones de personas en los Estados Unidos. El suero de los pacientes afectados contiene unos anticuerpos de los cuales algunos son específicos y pueden constituir un marcador de la enfermedad que permite su diagnóstico incluso en un estado precoz.

10 Unos anticuerpos específicamente presentes en los enfermos afectados de PR y que reaccionan con un antígeno epitelial esofágico del ratón se han descrito por primera vez por B. J. J. Young *et al.*, en Br. Med. J. 2: 97-99 (1979). En esta época éstos fueron denominados "anticuerpos antiqueratinas" (AKA), pero se ha demostrado que éstos eran, de hecho unos anticuerpos anti-filagrina (AAF). Sus antígenos son las formas ácido-neutras de las filagrinas (Simon *et al.*, J.Clin. Invest., 92, 1387, (1993)).

15 La filagrina se genera a partir de la profilagrina, que es una poliproteína fosforilada de los gránulos queratohialinos de la epidermis. La profilagrina tiene un peso molecular elevado (aproximadamente 400.000 en el hombre), es soluble en presencia de altas concentraciones de sales o de urea. Posee un alto contenido de ácidos aminados básicos (arginina e histidina), así como de glicina, serina y ácido glutámico. Es pobre en ácidos aminados no polares y no contiene ni metionina, ni cisteína, ni triptófano. Está altamente fosforilada sobre uno de los residuos de serina, lo que le confiere un punto isoelectrico cercano a la neutralidad.

20 La profilagrina se escinde en unidades de filagrina durante un proceso complejo de maduración, que implica una desfosforilación, seguida de una escisión por unas proteasas a nivel de los segmentos interdominios. Esta escisión genera en primer lugar unos fragmentos de un tamaño intermedio, y seguidamente las moléculas funcionales de filagrina.

25 Las filagrinas obtenidas de la desfosforilación y de la escisión de la profilagrina son unas proteínas básicas cuyo contenido en ácidos aminados es similar al de las profilagrinas. Participan en la organización de los filamentos de queratina, y sufren una maduración progresiva durante la que los residuos arginina, básicos, son convertidos en residuos citrulina, neutros, bajo la acción de la peptidilarginina deiminasa (Harding C. R. y Scott I.R., J. Mol. Biol. 170, p. 651-673 (1983)). Esto provoca una reducción de su afinidad por las queratinas de las que se desprenden; entonces son totalmente degradadas bajo la acción de diversas proteasas.

30 Las propiedades de las profilagrinas y de las filagrinas han sido bien estudiadas en particular en la rata, en el ratón y en el hombre. El tamaño de la profilagrina varía, según las especies, entre 300 y 400 kD y el de las filagrinas entre 27 y 64 kD.

35 El gen que codifica para la profilagrina se compone de subunidades repetidas de las que cada una codifica para una molécula de filagrina, separadas por unas porciones que codifican para los segmentos peptídicos interdominios. Todas las unidades de repetición que codifican para cada una de las filagrinas humanas tienen la misma longitud (972 pares de bases en el hombre); sin embargo, en el hombre, se observan unas variaciones importantes (10-15%) de secuencia de una subunidad a otra. Si bien la mayoría son conservadoras, algunas de estas variaciones inducen unos cambios de ácidos aminados y en ciertos casos unos cambios de la carga eléctrica de la proteína. Así las filagrinas humanas forman, independientemente de las modificaciones postranscripcionales, una población heterogénea de moléculas de un tamaño similar pero con unas secuencias y unas cargas (pHi igual a $8,3 \pm 1,1$) diferentes (Gan *et al.*, Biochem. 29, p. 9432-9440 (1990)).

40 El polimorfismo observado en el hombre entre las secuencias de las unidades filagrina en el interior de un mismo gen de profilagrina no aparece en la rata y en el ratón. Las filagrinas presentan además una gran variabilidad inter e intra específica a nivel de su secuencia. Esta variabilidad no afecta sin embargo a sus propiedades funcionales, ni a su composición global en ácidos aminados, y a sus propiedades bioquímicas. Asimismo, las localizaciones tisulares de la profilagrina y de las filagrinas son idénticas en los diferentes mamíferos estudiados.

45 Los auto anticuerpos (AAF) están asociados a los parámetros clínicos y biológicos que definen las formas más activas y más severas de la enfermedad, y precederían la aparición de los síntomas clínicos. Su detección resulta por tanto una etapa esencial en el diagnóstico de la PR.

50 Según el documento WO-A-98/08946 a nombre del solicitante, se ha puesto a punto un procedimiento de detección de los AAF, en una muestra biológica, basado en el descubrimiento según el cual la citrulinación de la filagrina era necesaria para la detección de los AAF presentes en unos sueros de pacientes afectados de PR, generando esta citrulinación unos epítopos reconocidos por los AAF. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:

55 se pone en contacto la muestra biológica analizada con una filagrina recombinante citrulinada o un fragmento de ésta, en unas condiciones apropiadas para la formación de inmunocomplejos con los AAF, y

se detectan los inmunocomplejos eventualmente formados con los AAF.

ES 2 283 573 T3

Los resultados evidencian una alta sensibilidad del procedimiento, reconociendo una mayoría de los sueros de pacientes afectados de PR la filagrina recombinante citrulinada.

5 Sin embargo se ha observado durante las etapas de diagnóstico de la PR en los pacientes cuyos sueros resultaban positivos en este procedimiento, que no todos eran casos de PR. En efecto, este procedimiento lleva a la detección de falsos positivos, como se ilustrará en los siguientes ejemplos, y por lo tanto no puede ser utilizado de forma fiable, debido a una especificidad insuficiente.

10 Los actuales inventores han puesto a punto ahora un nuevo test ELISA para el diagnóstico de la PR en unos pacientes, que posee una gran especificidad conservando a la vez la alta sensibilidad del procedimiento citado anteriormente.

Según este procedimiento, se detectan unos autoanticuerpos (AAF) específicos de la poliartritis reumatoide (PR), en una muestra biológica susceptible de contener dichos autoanticuerpos (AAF) y otros anticuerpos no específicos de la PR, como sigue:

15 se dispone por una parte, de una filagrina (FNC) o de un derivado de la filagrina (FNC) o de un péptido de la filagrina (PFNC), comprendiendo dicho péptido después de la citrulinación, un epítipo de la filagrina, y por otra parte, dicha filagrina citrulinada (FC) o un derivado de dicha filagrina citrulinada (FC) o de dicho péptido citrulinado (PFC), consistiendo la citrulinación en la conversión de uno o de los residuos arginina en citrulina,

20 se pone dicha muestra biológica en contacto, por un lado, con dicha filagrina (FNC) o el mencionado derivado de dicha filagrina (FNC) o dicho péptido (PFNC), y por otro lado, con dicha filagrina (FC) o dicho derivado de dicha filagrina (FC), o dicho péptido (PFC), en unas condiciones apropiadas para la formación de inmunocomplejos con los anticuerpos (AAF),

25 se detectan y se cuantifican los inmunocomplejos formados entre los autoanticuerpos (AAF) o los otros anticuerpos presentes en la muestra y dicha filagrina (FNC) o dicho derivado de dicha filagrina (FNC) o dicho péptido (PFNC), por un lado, y dicha filagrina citrulinada (FC) o dicho derivado de dicha filagrina citrulinada (FC) o dicho péptido (PFC), por otro lado, siendo expresada esta cuantificación por un valor respectivamente X_{NC} y X_C ,

30 se resta el valor de X_{NC} al de X_C .

35 Para la realización del procedimiento de la invención, la filagrina (FNC) o el derivado de la filagrina (FNC) o el péptido (PFNC) es inmovilizado sobre un soporte sólido y la filagrina (FC) o un derivado de una filagrina (FC) o el péptido (PFC) es inmovilizado sobre otro soporte sólido. Puede tratarse, entre otros, de dos pocillos de una placa de microtitulación o de dos conos del aparato Vidas (marca registrada) comercializado por el solicitante, pero también de unas tiras o de cualquier otro soporte apropiado.

40 Antes de describir con mayor detalle la invención y de presentar sus variantes preferidas, se definen a continuación algunos de los términos empleados en la descripción y las reivindicaciones.

45 La citrulinación es la reacción de conversión de un residuo arginina en citrulina por la transformación del grupo $-C(NH)NH_2$ de la arginina en $-CONH_2$. La reacción se realiza ventajosamente *in vitro* por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD). Esta enzima puede ser una PAD de músculo del conejo; sin embargo está al alcance del experto en la materia seleccionar otra PAD apropiada. Se puede evidentemente prever cualquier otro medio de citrulinación, tal como unos reactivos químicos, unos microorganismos.

50 Según la invención, cuando se hace referencia a una filagrina citrulinada, se entiende que una proporción de al menos 20% de los residuos arginina han sido convertidos en residuos citrulina, realizándose esta conversión al azar. Preferentemente, esta proporción es de al menos 30%, y ventajosamente de al menos 50%. Se ha observado que la inmunorreactividad de una filagrina citrulinada cuya proporción de citrulinación es de aproximadamente 80% es similar a la de una filagrina cuya proporción de citrulinación es de aproximadamente 50%. En estas condiciones, no es útil por lo tanto intentar alcanzar unas proporciones muy elevadas de citrulinación.

55 Si la citrulinación no se realiza al azar, sino que regioespecífica, y en particular, si se puede limitar la reacción de conversión a un residuo arginina que pertenece a un epítipo de la filagrina después de la citrulinación, la proporción de citrulinación puede ser más baja que los valores citados anteriormente, sin que la inmunorreactividad de la filagrina así citrulinada se vea por ello afectada.

60 Por derivado de una filagrina (FNC) o derivado citrulinado correspondiente se entiende: una filagrina quimera que consiste en una asociación de fragmento(s) de secuencias de filagrina humana y de rata y/o una asociación de fragmento(s) de secuencias de filagrina humana y/o de rata y de péptido(s) consenso.

65 Para la realización del procedimiento de la invención, la filagrina es seleccionada preferentemente de entre la filagrina humana y una filagrina de origen animal. Consiste ventajosamente en una filagrina recombinante de rata, que tiene la secuencia SEC ID n°:1.

ES 2 283 573 T3

En vez de la filagrina, se puede seleccionar un péptido de la filagrina (PFNC), cuya secuencia comprende al menos un residuo arginina, y el péptido citrulinado correspondiente (PFC) para el que dicho residuo arginina al menos de PFNC habrá sido convertido en residuo citrulina. Según una variante del procedimiento de la invención, el péptido comprende un epítipo de la filagrina después de la citrulinación. Así, se puede seleccionar un péptido (PFNC) en particular de entre los siguientes péptidos:

- el péptido S47S cuya secuencia está representada en SEC ID n°: 2 correspondiente a los ácidos aminados 71 a 119 de la secuencia de una unidad de filagrina humana y que comprende 6 residuos arginina,
- el péptido E12H cuya secuencia está representada en SEC ID n°: 3 tal como se ha determinado por referencia a las secuencias nucleotídicas del gen de la profilagrina humana descritas por Gan S.Q *et al.* (Biochemistry, 29: 9432-9440, (1990)) y que comprende 1 residuo arginina,
- el péptido E12D cuya secuencia está representada en SEC ID n°: 4 tal como se ha determinado por referencia a las secuencias nucleotídicas del gen de la profilagrina humana descritas por Gan S.Q *et al.* (Biochemistry, 29: 9432-9440, (1990)) y que comprende 3 residuos arginina,
- el péptido G22Q cuya secuencia está representada en SEC ID n°: 5 correspondiente a una secuencia consenso de una unidad filagrina de rata que comprende 4 residuos arginina,
- el péptido G26E cuya secuencia está representada en SEC ID n°: 6 correspondiente a una secuencia consenso de una unidad filagrina de rata que comprende 10 residuos arginina.

Como se ha mencionado anteriormente, si se dispone de una filagrina (FNC) para realizar el procedimiento de la invención, la filagrina citrulinada (FC) utilizada presenta la secuencia peptídica de la filagrina (FNC) en la que están citrulinados al menos 20%, preferentemente al menos 30%, y aún mejor al menos 50% de los residuos arginina de dicha FNC.

Los autoanticuerpos (AAF) son circulantes, y se puede seleccionar una muestra biológica para analizar según el procedimiento de la invención entre la sangre, el plasma, el suero.

Se realiza la detección y la cuantificación de los inmunocomplejos formados mediante cualquier técnica bien conocida por el experto en la materia, y en particular mediante la utilización de una enzima para la detección y de su sustrato colorimétrico o fluorescente para la cuantificación (ejemplos: fosfatasa alcalina/4-metilumbeliferilfosfato peroxidasa/ortofenilendiamina).

Como se ilustrará en los ejemplos siguientes, se pueden así poner en contacto los inmunocomplejos formados con un conjugado constituido por un anticuerpo marcado dirigido contra las inmunoglobulinas humanas, en unas condiciones apropiadas para la formación de inmunocomplejos marcados, y se detectan y se cuantifican a continuación los inmunocomplejos marcados. Ventajosamente el conjugado es un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, entero o fragmentado (ejemplos: fragmentos Fab', Fab'₂) marcado con peroxidasa o con fosfatasa alcalina, se detecta y cuantifica a continuación la formación de inmunocomplejos marcados por colorimetría o fluorimetría, siendo expresada la cuantificación en valores X_{NC} y X_C de densidad óptica o de fluorescencia.

Una prueba positiva que revela la presencia de autoanticuerpos (AAF) específicos de la PR, en la muestra analizada, se caracteriza porque el valor X_C es superior al valor de X_{NC} .

Se ilustrará ahora la invención y sus características y ventajas se pondrán más claramente de manifiesto.

50 Ejemplo 1

Obtención de una filagrina recombinante de rata

A) Clonación del gen de la profilagrina de la rata

Los trabajos de Haydock y Dale, 1986 (J. Biol. Chem., 261, 12520-12525) y de Rothnagel *et al.*, 1987 (J. Biol. Chem., 262, 15643-15648) han mostrado que el gen de la profilagrina de rata estaba compuesto por 20 ± 2 unidades repetidas de aproximadamente 1200 pares de bases (pb) y no disponía de ningún intrón en su región que codifica, estando compuesta cada unidad de profilagrina por un dominio filagrina y una secuencia de enlace.

Por otra parte, se ha publicado la secuencia que codifica para dos unidades de profilagrina incompletas por Haydock y Dale, 1990 (DNA Cell Biol., 9, 251-261).

A partir de estos datos, se han concebido unos oligonucleótidos destinados a la amplificación por PCR de la secuencia que codifica para una unidad profilagrina de rata completa. Se ha preparado la matriz de ADN genómico de rata a partir de sangre total de una rata Wistar. Se han obtenido tres productos de PCR diferentes con tres pares de oligonucleótidos diferentes. Estos productos de PCR han sido clonados en un vector pCAPs (PCR cloning kit,

ES 2 283 573 T3

Boehringer) y secuenciados. Presentan entre ellos un grado de homología elevado (de más del 99%) así como una homología del 95 y del 98% con las dos unidades de profilagrina incompletas publicadas por Haydock y Dale, 1990.

5 Estos datos confirman la naturaleza del ADN obtenido y sugieren que las secuencias disponibles son representativas de los dominios profilagrina de rata existentes, esperándose una cierta variabilidad inter e intra individuo.

Una de las secuencias obtenidas ha sido clonada en un vector de expresión pMR (Cheynet *et al.*, 1993, Prot. Exp. Purif., 4, 367-372) en fusión con una secuencia que codifica para 6 histidina en 5'. Se ha utilizado la construcción identificada bajo la denominación pOL041 para transformar unas bacterias de *E. coli*. Ésta codifica para una proteína
10 de 399 ácidos aminados y de un peso molecular teórico de 42.210 que presenta la secuencia SEC ID n°:1

B) Expresión y purificación de la filagrina recombinante de rata

Cultivo

15 Para la puesta en cultivo de una cepa de *E. coli* transformada (BL21 o DH5 α), se realiza un aislamiento sobre un medio gulosado con ampicilina 0,1 mg/ml a partir del banco conservado a -80°C.

A partir de una colonia aislada, se realiza un cultivo previo en medio líquido (extracto de levadura, glucosa 2% y
20 ampicilina 0,1 mg/ml) en Erlen, puestos a +37°C y bajo agitación orbital (280 rpm).

Este cultivo previo permite a continuación la siembra de Erlen de cultivo, de 5 l, conteniendo cada uno 1 l del mismo medio completado eventualmente con PMSF 0,5 mM en final. Estos Erlen son cultivados a +37°C bajo
25 agitación a 280 rpm, hasta la obtención de una DO a 600 nm de 0,8. A partir de este valor de DO, el cultivo continúa durante 3 horas.

Se para entonces el cultivo y se centrifuga 25 minutos a 6.000 g. Los culotes bacterianos son entonces recogidos y conservados a -25°C.

Purificación

30 Se realiza la lisis del culote bacteriano por acción de la lisozima en presencia de un inhibidor de proteasas en un tampón NaH₂PO₄ 0,1 M/NaCl 0,6 M/Tween 0,2%/Azida Na 1 mM/Imidazol 6 mM pH 7,3 y por sonicación. Este lisado es entonces clarificado 30 minutos a 23.700 g y el sobrenadante es conservado.

35 Se purifica la filagrina recombinante por cromatografía por quelación de metales (Níquel) a +4°C.

Brevemente después del reequilibrado del gel en tampón de lisis, el sobrenadante de la lisis es inyectado sobre la columna y seguido de un lavado (y de la señal de detección UV 280 nm), por el tampón NaH₂PO₄ 0,1 M/NaCl 0,6
40 M/Azida Na 1 mM/Imidazol 6 mM pH 7,3, hasta el retorno de la señal de detección UV 280 nm a la línea de base.

La filagrina recombinante (rFlg) adsorbida sobre el gel, es eluida, por el tampón NaH₂PO₄ 0,1 M/NaCl 0,6 M/Azida Na 1 mM/Imidazol 0,5 M pH 7,15.

45 La fracción obtenida de esta manera es concentrada sobre membrana de 10 kDa.

Se realiza la última etapa de purificación por cromatografía de filtración sobre gel sobre un soporte de Superdex 200, en tampón Tris 20 mM/NaCl 0,3 M pH 11. Se inyecta el concentrado en la columna, siendo recogidas las fracciones por el seguimiento de la señal UV a 280 nm y 214 nm. Esta etapa permite aislar y recuperar la filagrina
50 recombinante de interés, inmunológicamente activa, en el segundo pico de elución (PM \approx 42.000).

Ejemplo 2

Citrulinación de la filagrina recombinante

55 Después de la dosificación de las proteínas totales por el método de Bradford (reactivos Biorad), se realiza la citrulinación, por acción de la Peptidil Arginina Deiminasa durante 4 horas, a 37°C, bajo agitación magnética a razón de 4 unidades enzimáticas/mg de proteínas totales, en presencia de EDTA 0,1 M/DTT 1 M/CaCl₂ 0,5 M. La proporción de proteínas totales es entonces dosificada de nuevo sobre la fracción deiminada.

60 La filagrina citrulinada es purificada por cromatografía Ni-NTA, y a continuación por cromatografía por filtración sobre gel.

65 La proporción de citrulinación detectada es del 53%.

Los siguientes ejemplos 3 y 4 ilustran el diagnóstico de la PR en un procedimiento de detección de la técnica anterior y en un procedimiento de detección según la invención, para permitir su comparación.

ES 2 283 573 T3

El procedimiento de detección de la técnica anterior consiste en una prueba ELISA, del tipo descrito en el documento WO-98/08946 a nombre del solicitante, que emplea filagrina citrulinada, y está basado en la detección de los inmunocomplejos formados entre los anticuerpos AAF eventualmente presentes en la muestra y la filagrina citrulinada.

5 El procedimiento de detección según la invención es una prueba ELISA que emplea filagrina citrulinada y filagrina no citrulinada y que se basa en la detección paralela de los inmunocomplejos formados con la filagrina citrulinada por un lado y la filagrina no citrulinada por otro, y en la diferencia de valores entre los dos.

Ejemplo 3

10

A) Muestras

Las pruebas han sido realizadas sobre las siguientes muestras:

15 63 sueros testigo afectados de las siguientes patologías: algodistrofia, gota, hemopatía maligna, enfermedad de Paget, neuralgia, patología mecánica, periartritis nudosa, polimiositis, reumatismo lúpico, reumatismo psoriático, esclerodermia, espondiloartritis anquilosante, espondiloartropatía, síndrome de Goujerot, síndrome de Sharp, vascularitis.

65 sueros de pacientes afectados de poliartritis reumatoide diagnosticada clínicamente.

20

B) Material

Placa Nunc Maxisorp 468667

25

Estufa a 35-39°C

Lavador Axia microwasher U4402

Lector de placas Biotek (marca comercial).

30

C) Protocolo

Depósito en los pocillos: 100 μ l por pocillo de 2,5 μ g/ml de filagrina, durante 2 horas a 37°C en tampón PBS pH 7,2

35

3 lavados con 300 μ l por pocillo de tampón PBS Tween 0,05% pH 7,2

Pasivación de 1 hora a 37°C con 250 μ l por pocillo de tampón PBS BSA 1% pH 7,2

40

3 lavados con 300 μ l por pocillo de tampón PBS Tween 0,05% pH 7,2

Incubación durante 1 hora a 37°C con 100 μ l por pocillo de suero diluido al 1/100^a en tampón Tris 10 mM, NaCl 350 mM, TRITON X 100 1%, BSA 1%, suero de conejo 10% pH 7,5

45

3 lavados con 300 μ l por pocillo de tampón PBS Tween 0,05% pH 7,2

Incubación de un conjugado anti-IgG humano diluido en Tampón Tris 10 mM, NaCl 350 mM, Triton X100 1%, BSA 1%, suero de conejo 10% pH 7,6; 100 μ l por pocillo

50

3 lavados con 300 μ l por pocillo de tampón PBS Tween 0,05% pH 7,2.

Revelado enzimático

- 100 μ l de ortofenilendiamina (OPD) por pocillo

55

- Incubación 10 min a 18-25°C

- Bloqueo por 100 μ l de H₂SO₄

60

- Lectura a 492 nm.

Las muestras son dosificadas en paralelo sobre una placa revestida de filagrina no citrulinada y sobre otra placa revestida de filagrina citrulinada.

65

Las muestras son dosificadas sin duplicar.

Los resultados son expresados en densidad óptica. Las señales indicadas a una densidad óptica de 3 son iguales o superiores a 3.

ES 2 283 573 T3

D) Resultados

Los resultados están agrupados en las tablas 1 y 2 siguientes.

5 Con los resultados obtenidos sobre filagrina citrulinada según el documento WO-A-98/08946 (tabla 1), las prestaciones son las siguientes:

100% de especificidad	umbral a 1,337	34% de sensibilidad (22/65)
98% de especificidad	umbral a 0,937	38% de sensibilidad (25/65)
95% de especificidad	umbral a 0,335	61,5% de sensibilidad (40/65).

15 Con los resultados obtenidos sobre filagrina citrulinada-filagrina no citrulinada según la invención (tabla 2), las prestaciones son las siguientes:

100% de especificidad	umbral a 0,731	38% de sensibilidad (25/65)
98% de especificidad	umbral a 0,009	69% de sensibilidad (45/65)
95% de especificidad	umbral a -0,004	77% de sensibilidad (50/65).

20 En los dos casos, a 95% de especificidad 3 sueros son unos falsos positivos.

Todas las muestras detectadas sobre la fase filagrina citrulinada son detectadas con el sistema diferencial a 100% y a 98% de especificidad. Un único suero es detectado además con el sistema diferencial. A 95% de especificidad, 7 muestras son detectadas además con el sistema diferencial.

El sistema diferencial es más eficaz que la fase filagrina citrulinada sobre esta población con 69% de sensibilidad para 98% de especificidad.

30 Para esta población, las prestaciones de las pruebas utilizadas habitualmente son las siguientes:

GIFOR (inmunofluorescencia sobre corte de esófago de ratón)		
98% de especificidad	umbral a 2	49% de sensibilidad (32/65)
Gblot		
98% de especificidad	umbral a 2,25	58% de sensibilidad (38/65).

40 Las prestaciones obtenidas en ELISA sobre filagrina de rata son mejores que las técnicas utilizadas actualmente, GIFOR y GBlot.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 283 573 T3

TABLA 1

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC)			
Testigos negativos	FC	Sueros PR	FC
58	0,050	78	0,051
57	0,056	76	0,059
10	0,058	72	0,077
33	0,060	74	0,077
51	0,062	81	0,079
53	0,062	79	0,088
44	0,064	73	0,091
54	0,066	71	0,098
47	0,069	80	0,102
49	0,069	75	0,109
38	0,070	65	0,113
39	0,070	86	0,121
40	0,071	66	0,124
50	0,072	83	0,132
29	0,073	69	0,141
45	0,073	77	0,147
25	0,076	84	0,151
55	0,076	85	0,156
28	0,079	90	0,157
42	0,083	67	0,158
46	0,083	68	0,158
60	0,085	70	0,202
43	0,087	89	0,207
31	0,088	88	0,276
34	0,088	92	0,299
37	0,090	93	0,387
41	0,090	87	0,409
16	0,092	64	0,434
35	0,092	82	0,472
48	0,092	95	0,496
26	0,093	98	0,499
52	0,093	96	0,524
17	0,097	94	0,535
61	0,098	100	0,611
27	0,111	99	0,659
19	0,113	91	0,667
20	0,113	103	0,726

ES 2 283 573 T3

TABLA 1 (continuación)

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC)			
Testigos negativos	FC	Sueros PR	FC
4	0,116	101	0,729
22	0,116	102	0,801
36	0,123	97	0,853
18	0,124	104	0,939
24	0,124	105	1,203
14	0,128	106	1,240
12	0,129	107	1,526
23	0,130	108	1,694
7	0,133	109	1,900
5	0,134	110	2,076
9	0,135	111	2,387
30	0,142	114	2,593
59	0,146	112	2,610
6	0,158	113	3,000
21	0,159	115	3,000
11	0,166	116	3,000
32	0,167	117	3,000
15	0,169	118	3,000
62	0,193	119	3,000
56	0,222	120	3,000
3	0,253	121	3,000
13	0,269	122	3,000
1	0,335	123	3,000
8	0,369	124	3,000
63	0,937	125	3,000
2	1,337	126	3,000
		127	3,000
		128	3,000

TABLA 2

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC) y no citrulinada (FNC)

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC) y no citrulinada (FNC)							
Testigos negativos	FNC	FC	FC - FNC	sueros PR	FNC	FC	FC - FNC
1	0,780	0,335	-0,445	64	0,777	0,434	-0,343
2	1,747	1,337	-0,410	65	0,202	0,113	-0,089
3	0,433	0,253	-0,180	66	0,204	0,124	-0,080
4	0,268	0,116	-0,152	67	0,222	0,158	-0,064
5	0,271	0,134	-0,137	68	0,221	0,158	-0,063
6	0,294	0,158	-0,136	69	0,195	0,141	-0,054
7	0,262	0,133	-0,129	70	0,255	0,202	-0,053

ES 2 283 573 T3

TABLA 2 (continuación)

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC) y no citrulinada (FNC)							
Testigos negativos	FNC	FC	FC - FNC	sueros PR	FNC	FC	FC - FNC
8	0,492	0,369	-0,123	71	0,131	0,098	-0,033
9	0,231	0,135	-0,096	72	0,109	0,077	-0,032
10	0,149	0,058	-0,091	73	0,115	0,091	-0,024
11	0,256	0,166	-0,090	74	0,099	0,077	-0,022
12	0,218	0,129	-0,089	75	0,131	0,109	-0,022
13	0,351	0,269	-0,082	76	0,072	0,059	-0,013
14	0,209	0,128	-0,081	77	0,157	0,147	-0,010
15	0,248	0,169	-0,079	78	0,055	0,051	-0,004
16	0,158	0,092	-0,066	79	0,090	0,088	-0,002
17	0,162	0,097	-0,065	80	0,104	0,102	-0,002
18	0,188	0,124	-0,064	81	0,079	0,079	0,000
19	0,174	0,113	-0,061	82	0,466	0,472	0,006
20	0,173	0,113	-0,060	83	0,124	0,132	0,008
21	0,219	0,159	-0,060	84	0,137	0,151	0,014
22	0,171	0,116	-0,055	85	0,137	0,156	0,019
23	0,179	0,130	-0,049	86	0,101	0,121	0,020
24	0,172	0,124	-0,048	87	0,372	0,409	0,037
25	0,123	0,076	-0,047	88	0,236	0,276	0,040
26	0,139	0,093	-0,046	89	0,137	0,207	0,070
27	0,153	0,111	-0,042	90	0,057	0,157	0,100
28	0,120	0,079	-0,041	91	0,514	0,667	0,153
29	0,113	0,073	-0,040	92	0,058	0,299	0,241
30	0,181	0,142	-0,039	93	0,134	0,387	0,253
31	0,126	0,088	-0,038	94	0,240	0,535	0,295
32	0,204	0,167	-0,037	95	0,156	0,496	0,340
33	0,096	0,060	-0,036	96	0,122	0,524	0,402
34	0,122	0,088	-0,034	97	0,424	0,853	0,429
35	0,125	0,092	-0,033	98	0,063	0,499	0,436
36	0,156	0,123	-0,033	99	0,208	0,659	0,451
37	0,122	0,090	-0,032	100	0,117	0,611	0,494
38	0,101	0,070	-0,031	101	0,207	0,729	0,522
39	0,101	0,070	-0,031	102	0,165	0,801	0,636
40	0,098	0,071	-0,027	103	0,072	0,726	0,654
41	0,117	0,090	-0,027	104	0,142	0,939	0,797
42	0,110	0,083	-0,027	105	0,231	1,203	0,972
43	0,112	0,087	-0,025	106	0,087	1,240	1,153
44	0,089	0,064	-0,025	107	0,118	1,526	1,408
45	0,097	0,073	-0,024	108	0,268	1,694	1,426
46	0,107	0,083	-0,024	109	0,136	1,900	1,764
47	0,092	0,069	-0,023	110	0,095	2,076	1,981
48	0,113	0,092	-0,021	111	0,127	2,387	2,260

65

ES 2 283 573 T3

TABLA 2 (continuación)

Resultados en DO a 492 nm de las pruebas ELISA sobre filagrina citrulinada (FC) y no citrulinada (FNC)							
Testigos negativos	FNC	FC	FC - FNC	sueros PR	FNC	FC	FC - FNC
49	0,089	0,069	-0,020	112	0,256	2,610	2,354
50	0,091	0,072	-0,019	113	0,555	3,000	2,445
51	0,081	0,062	-0,019	114	0,128	2,593	2,465
52	0,112	0,093	-0,019	115	0,518	3,000	2,482
53	0,081	0,062	-0,019	116	0,338	3,000	2,662
54	0,083	0,066	-0,017	117	0,315	3,000	2,685
55	0,092	0,076	-0,016	118	0,295	3,000	2,705
56	0,233	0,222	-0,011	119	0,224	3,000	2,776
57	0,065	0,056	-0,009	120	0,184	3,000	2,816
58	0,058	0,050	-0,008	121	0,184	3,000	2,816
59	0,153	0,146	-0,007	122	0,181	3,000	2,819
60	0,089	0,085	-0,004	123	0,171	3,000	2,829
61	0,095	0,098	0,003	124	0,160	3,000	2,840
62	0,184	0,193	0,009	125	0,145	3,000	2,855
63	0,206	0,937	0,731	126	0,081	3,000	2,919
				127	0,062	3,000	2,938
				128	0,056	3,000	2,944

Ejemplo 4

Este ejemplo permite comparar una prueba de diagnóstico según la invención, la prueba ArFa-ELISA, y varias pruebas de diagnóstico de la técnica anterior disponibles comercialmente o que emplean unos métodos conocidos, a saber las pruebas AKA por inmunofluorescencia, AhFA-IB, AhFA-ELISA y CCP-ELISA.

A) Muestras

Las pruebas han sido practicadas sobre 711 sueros de los cuales 240 procedían de pacientes afectados de poliartrosis reumatoide (PR) y 471 procedían de pacientes no PR. Entre los pacientes no PR, 157 estaban afectados de una enfermedad inflamatoria seleccionada de entre el lupus eritematoso progresivo (21), la esclerodermia generalizada (9), el reumatismo psoriásico (43), la espondiloartritis anquilosante (40) y otras enfermedades inflamatorias (44), y 314 estaban afectados de una enfermedad no inflamatoria seleccionada de entre la artrosis (104), la neuropatía compresiva (25), la enfermedad de Paget (68), la distrofia simpática refleja (29), las enfermedades graves de los huesos (49), y otras enfermedades no inflamatorias (39).

La filagrina es una filagrina recombinante de rata; la filagrina no citrulinada es obtenida de acuerdo con el ejemplo 1, y la filagrina citrulinada es obtenida por citrulinación (proporción de citrulinación de los residuos arginina de 40%) de la filagrina no citrulinada de acuerdo con el ejemplo 2.

B) Protocolo

Se ha realizado la detección de los anticuerpos según las pruebas AKA por inmunofluorescencia y AhFA-IB según los métodos descritos en C. Vincent *et al.*, Ann. Rheum. Dis. (1989)48, 712-722, y C. Vincent *et al.*, J. Rheumatol. (1998) 25, 838-846.

Se utiliza la prueba AhFA-ELISA según el método descrito por L. Nogueira *et al.*, Ann. Rheum. Dis. (2001) 60, 882-846.

Se realiza la prueba CCP-ELISA con el material Immunoscan™ RA (Euro-diagnostica, Arnhem, Países Bajos) utilizado según las recomendaciones del fabricante.

Se ha empleado la prueba ArFa-ELISA según la invención de acuerdo con el protocolo C) descrito en el Ejemplo 3, a excepción del hecho de que en el ejemplo presente, las muestras han sido dosificadas por cuadruplicado. La variación media entre los ensayos para una misma muestra era inferior a 6%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de autoanticuerpos (AAF) específicos de la poliartritis reumatoide (PR), en una muestra biológica susceptible de contener dichos autoanticuerpos (AAF) y de otros anticuerpos no específicos de la PR, según el cual

se dispone, por una parte, de una filagrina (FNC) o de un derivado de la filagrina (FNC) o de un péptido de la filagrina (PFNC), comprendiendo dicho péptido después de la citrulinación, un epítipo de la filagrina, y por otra parte, de dicha filagrina citrulinada (FC) o de un derivado de dicha filagrina citrulinada (FC) o de dicho péptido citrulinado (PFC), consistiendo la citrulinación en la conversión de uno o de los residuos de arginina en citrulina,

se pone dicha muestra biológica en contacto con, por un lado, dicha filagrina (FNC) o dicho derivado de dicha filagrina (FNC) o dicho péptido (PFNC), y por otro lado, dicha filagrina citrulinada (FC) o dicho derivado de dicha filagrina citrulinada (FC), o dicho péptido citrulinado (PFC), en unas condiciones apropiadas para la formación de inmunocomplejos con los autoanticuerpos (AAF),

se detecta y se cuantifica la formación de inmunocomplejos formados entre los autoanticuerpos (AAF) u otros anticuerpos presentes en la muestra y dicha filagrina (FNC) o dicho derivado de la filagrina (FNC) o dicho péptido (PFNC), por un lado, y dicha filagrina citrulinada (FC) o dicho derivado de dicha filagrina citrulinada (FC) o dicho péptido citrulinado (PFC), por otro lado, siendo expresada esta cuantificación por un valor respectivamente X_{NC} y X_C ,

se resta el valor de X_{NC} al de X_C .

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la filagrina se selecciona de entre la filagrina humana y la filagrina de rata.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la filagrina es una filagrina recombinante de rata y tiene la secuencia SEC ID n°: 1.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el péptido comprende una secuencia peptídica seleccionada de entre la secuencia SEC ID n°: 2 a SEC ID n°:6.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la filagrina citrulinada (FC) o el péptido citrulinado (PFC) es obtenido por acción de la peptidil arginina deiminasa.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 5, **caracterizado** porque se dispone de una filagrina (FNC) y porque al menos 20% de los residuos arginina de la FNC son citrulinados para obtener dicha filagrina citrulinada (FC).

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque al menos 30%, preferentemente al menos 50% de los residuos arginina de la FNC son citrulinados.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra biológica se selecciona de entre la sangre, el plasma, el suero.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se ponen en contacto los inmunocomplejos formados con un conjugado constituido por un anticuerpo marcado dirigido contra las inmunoglobulinas humanas, en unas condiciones apropiadas para la formación de inmunocomplejos marcados, y se detectan y se cuantifican a continuación los inmunocomplejos marcados.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el conjugado es un anticuerpo antiinmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina o con peroxidasa, y se detecta y se cuantifica a continuación la formación de inmunocomplejos marcados por colorimetría o fluorimetría, expresándose la cuantificación en valores X_{NC} y X_C de densidad óptica o de fluorescencia.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque si el valor X_C es superior al valor X_{NC} , se han detectado y cuantificado, en dicha muestra, unos autoanticuerpos (AAF) específicos de la PR.

ES 2 283 573 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> bioMérieux
- 5 <120> PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE LA POLIARTRITIS REUMATOIDE
- <130> PRdelta
- 10 <140>
- <141>
- <150> FR 01 08068
- 15 <151> 2001-06-13
- <160> 6
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 399
- 25 <212> PRT
- <213> filagrina recombinante de rata
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 283 573 T3

<400> 1

5 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Asp Glu Ser
1 1 5 10 15

Met Gly Ile Gln Gln Gln Arg Gln Arg Arg Gln His Glu Gln Glu Arg
20 25 30

10 Glu His Glu His Gln Gln Pro Glu Ser Ser His Arg Gln Gln Gly Ser
35 40 45

Ser Gly Arg Thr His Arg Ala Ala Arg His Glu Gln Glu Ser Asp Ser
50 55 60

15 Thr Arg Gln Arg Gly Ser His Gln Ala His Ser Ser Ala Arg Thr Gln
65 70 75 80

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Arg Ser Gly Ala Ser Ala Ser Glu Gly Pro
85 90 95

20 Gly Pro Gln Arg Glu Ala Ala Arg Asp Ser Ser Glu His Ala Gln Ser
100 105 110

25 Arg Arg Ser Glu Thr Ile Ser Arg Gly Arg Ser Gly His Ser Thr Gly
115 120 125

Arg Ala His Glu Asp Arg His Glu Gln Ala Thr Asp Arg Ser Ala Arg
130 135 140

30 Ser Gly Ser Arg Gly Gly Gln Ala Gly Ser His Ser Glu Ser Glu Ala
145 150 155 160

Ser Gly Gly Gln Ala Gly Arg Arg Gly Thr Ala Ala Thr Arg His Thr
165 170 175

35 Ser Arg Pro Glu Gln Ser Pro Asp Thr Ala Gly Arg Thr Gly Ser Ser
180 185 190

40 Arg Gly Gln Gln Ser Ala Gln Arg His Ala Asp Ser Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Thr Arg Thr Gly Ser Arg Gly Arg Gly Glu Ser Pro Ala Gly Gln Gln
210 215 220

Ser Pro Asp Arg Ala Arg His Ile Glu Ser Arg Arg Gly Arg Thr Arg
225 230 235 240

50

55

60

65

ES 2 283 573 T3

<213> péptido de la filagrina humana

<400> 4

5 Glu Ser Ser Arg Asp Gly Ser Arg His Pro Arg Ser His Asp
 1 5 10

<210> 5

10 <211> 24

<212> PRT

<213> péptido de la filagrina de rata

15 <400> 5

 Gly Gln Ala Gly Gly Arg Gln Gly Ser Arg His Glu Gln Gly Ser Ser
 1 5 10 15
20 Arg Gly Arg Ser Gly His Glu Gln
 20

<210> 6

25 <211> 28

<212> PRT

<213> péptido de la filagrina de rata

30 <400> 6

 Gly Ser His Arg Gln Gln Ser Ser Arg Arg Gln Gly Ser Ser Arg Gly
 1 5 10 15
35 Gln Gln Ser Gly Gly Arg Gln Gly Ser Arg His Glu
 20 25

40

45

50

55

60

65