



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 297 521**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04804125 .5**

(86) Fecha de presentación : **21.12.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1700129**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

(54) Título: **Método para la evaluación de la artritis reumatoide mediante la medición de anti-PCC e interleuquina 6.**

(30) Prioridad: **23.12.2003 EP 03029658**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Wild, Norbert;**
Karl, Johann;
Grunert, Veit, Peter y
Zolg, Werner

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Método para la evaluación de la artritis reumatoide mediante la medición de anti-PCC e interleuquina 6.

5 La presente invención está relacionada con un método que mejora la evaluación de la artritis reumatoide. El método se utiliza especialmente en la evaluación de la presencia o ausencia de artritis reumatoide *in vitro*. El método por ejemplo se realiza mediante el análisis de marcadores biológicos, lo que comprende la medida en la muestra de la concentración de anti-PCC e interleuquina 6, y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de artritis reumatoide. Para mejorar aun más la evaluación de la AR en un método de esta invención
10 puede determinarse el nivel de uno o más marcadores adicionales junto con el anti-PCC y la interleuquina 6 y pueden correlacionarse con la presencia o ausencia de AR. La invención también está relacionada con la utilización de un panel de marcadores que comprende el anti-PCC y la interleuquina 6 en el diagnóstico de la artritis reumatoide e ilustra un equipo para la realización del método de la invención.

15 La artritis reumatoide ("AR") es una enfermedad crónica, inflamatoria, sistémica que se manifiesta de forma más notable en las articulaciones afectadas, en particular las de las manos y pies. La aparición de la artritis reumatoide puede ser lenta, oscilando entre unas pocas semanas y algunos meses, o la enfermedad puede surgir rápidamente de forma aguda.

20 La AR tiene una distribución mundial e involucra a todos los grupos étnicos. Aunque la enfermedad puede aparecer a cualquier edad, la prevalencia aumenta con la edad y el pico de incidencia está entre los cuarenta y sesenta años. La estimación de prevalencia en la población norteamericana varía entre el 0,3% y 1,5%. Actualmente, alrededor de 2.500.000 individuos están diagnosticados de artritis reumatoide sólo en los Estados Unidos, con algunas estadísticas que apuntan a entre 6,5 y 8 millones de afectados potenciales por la enfermedad. Las mujeres se ven afectadas 2-3
25 veces más frecuentemente que los hombres.

Los síntomas iniciales de la artritis reumatoide son principalmente específicos de las articulaciones, como el dolor en las articulaciones con hinchazón o sensibilidad en éstas, pero también puede incluir manifestaciones bastante inespecíficas como rigidez, fiebre, nódulos subcutáneos, y fatiga. Es muy característica la afectación simétrica de las
30 articulaciones. Las articulaciones de las manos, pies, rodillas y muñecas son las más frecuentemente afectadas, con la implicación eventual de las caderas, codos y hombros. A medida que la enfermedad progresa, cualquier tipo de movimiento se convierte en doloroso y difícil lo que conduce finalmente a una pérdida de la función de las articulaciones implicadas. Los casos más severos de artritis reumatoide pueden resultar en dolor intenso y destrucción de las articulaciones. Anualmente, se realizan 300.000 procedimientos quirúrgicos de reemplazo de huesos y articulaciones en un
35 esfuerzo para aliviar el dolor y la pérdida de movilidad resultante de la destrucción de las articulaciones relacionada con la artritis.

El sistema de clasificación de la AR más ampliamente utilizado son los criterios de clasificación de AR del American College of Rheumatology revisados en 1987. (Arnett, F.C., *et al.*, Arthritis Rheum. 31 (1988) 315-324). De
40 acuerdo con estos criterios (conocidos como criterios ARA), se dice que un paciente sufre AR si el paciente cumple al menos cuatro de los siete criterios siguientes, en el que los criterios 1-4 deben estar presentes durante al menos seis semanas: 1) rigidez matutina durante al menos una hora, 2) artritis de tres o más áreas en las articulaciones, 3) artritis de las articulaciones de las manos, 4) artritis simétrica, 5) nódulos reumatoides, 6) factor reumatoide ("FR") en suero, y 7) cambios radiográficos. Estos criterios tienen una sensibilidad y especificidad de aproximadamente un 90%.

45 El único marcador bioquímico generalmente aceptado (véanse los anteriores criterios ARA) y que ayuda en el diagnóstico de la AR es el factor reumatoide (FR) detectado en suero.

Los cambios histológicos en la AR no son específicos de la enfermedad sino que dependen en gran medida del
50 órgano involucrado. La lesión inflamatoria primaria en la articulación involucra el sinovio. Los cambios iniciales son daños en la microvasculatura sinovial con oclusión del lumen, hinchazón de las células endoteliales, y espacios entre las células endoteliales, como se ha documentado mediante microscopía electrónica. Esta fase normalmente está asociada con una débil proliferación de la capa celular de revestimiento superficial. Dos tipos celulares constituyen el revestimiento sinovial: los sinoviocitos de tipo A derivados de la médula ósea, que tiene características de los
55 macrófagos, y los sinoviocitos de tipo B mesenquimales. Ambos tipos celulares contribuyen a la hiperplasia sinovial, lo que sugiere una interacción paracrina entre estos dos tipos de células. Esta fase de inflamación está asociada con congestión, edema y exudación de fibrina. La infiltración celular aparece en las fases iniciales de la enfermedad e inicialmente consiste principalmente de linfocitos T. Como consecuencia de la inflamación, el sinovio se convierte en hipertrófico por la proliferación de vasos sanguíneos y fibroblastos sinoviales, y por la multiplicación y engrosamientos
60 de las capas de recubrimiento sinovial.

El tejido de granulación se extiende al cartílago y se conoce como panus. El tejido invade de forma activa y destruye el hueso periarticular y el cartílago en el margen entre el sinovio y el hueso, conocido como AR erosiva.

65 Las manifestaciones articulares de la AR pueden situarse en dos categorías: signos reversibles y síntomas relacionados con la sinovitis inflamatoria y el daño estructural irreversible provocado por la sinovitis. Este concepto es útil no solo para clasificar la enfermedad y determinar la prognosis sino que también sirve para seleccionar el tratamiento médico o quirúrgico. El daño estructural en el típico paciente normalmente se inicia en algún punto entre el primer y el

segundo año de la enfermedad (Van der Heijde, D. M., *et al.*, Br. J. Rheumatol. 34 (1995) 74-78). Aunque la sinovitis tiende a seguir un patrón fluctuante, el daño estructural progresa como una función linear de la cantidad de la sinovitis anterior.

La etiología de los eventos tempranos en la AR permanecen desconocidos. Actualmente se acepta ampliamente un componente autoinmune, pero todavía se discuten otros factores. La posibilidad de una infección bacteriana o viral se ha perseguido intensamente. Todos los esfuerzos para asociar un agente infeccioso con la AR mediante aislamiento, microscopía electrónica o biología molecular han fracasado. Es posible que no haya una causa primaria única de la AR y que los diferentes mecanismos puedan llevar al daño inicial en el tejido y precipitar la inflamación sinovial.

Los signos clínicos de sinovitis pueden ser sutiles y a menudo subjetivos. El calentamiento, hinchazón, articulaciones obviamente inflamadas, normalmente sólo se aprecian en las fases más activas de la sinovitis inflamatoria. La pérdida de cartilago y la erosión del hueso periarticular son los rasgos característicos del daño estructural. Los rasgos clínicos relacionados con el daño estructural están marcados por un deterioro progresivo funcional y anatómico. El daño estructural en la articulación es irreversible y acumulable.

El tratamiento efectivo de la artritis reumatoide comprende generalmente una combinación de medicación, ejercicio, descanso y una terapia adecuada de protección de las articulaciones. La terapia para un paciente particular depende de la gravedad de la enfermedad y las articulaciones involucradas. Son utilizados ampliamente los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, corticosteroides, sales de oro, metotrexato e inmunosupresores sistémicos para reducir la inflamación y la destrucción de las articulaciones. El uso de esteroides e inmunosupresores, no obstante, presenta riesgos significativos y efectos secundarios en términos de toxicidad y vulnerabilidad a estados potencialmente letales. Más recientemente los fármacos basados en "agentes biológicos" se han introducido en la terapia de la AR. Tales fármacos, por ejemplo, son receptores solubles o anticuerpos dirigidos contra el TNF- α que reduce significativamente la inflamación. Aunque muy prometedores, los productos biológicos tienen aún un uso limitado debido a su alto coste.

Los datos de los estudios clínicos longitudinales y epidemiológicos proporcionan guías para el tratamiento. Estos estudios enfatizan 1) la necesidad de un diagnóstico precoz, 2) la identificación de factores de pronóstico, y 3) un tratamiento agresivo precoz. El diagnóstico precoz y el tratamiento, preferiblemente dentro de los primeros meses después del inicio de los síntomas, puede ayudar a prevenir el daño irreversible de las articulaciones.

Existe de hecho una necesidad de métodos, especialmente basados en parámetros bioquímicos, que apoyen la evaluación de la existencia de artritis reumatoide. La presente invención proporciona tales métodos y los reactivos para evaluar la presencia o ausencia de artritis reumatoide *in vitro*. Los métodos también ayudarán a la monitorización de la eficacia del tratamiento en los pacientes que sufren de AR.

La presente invención está dirigida a un método para evaluar la artritis reumatoide *in vitro* mediante marcadores biológicos, que comprende la medición en una muestra de la concentración de anti-PCC e interleuquina 6 y correlacionar las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de la artritis reumatoide.

La presente invención también está relacionada con el uso de un panel marcador que comprende al menos anti-PCC e interleuquina 6 en el diagnóstico de la AR.

La presente invención también proporciona un equipo para realizar el método de acuerdo con la presente invención que comprende al menos los reactivos necesarios para medir específicamente el anti-PCC y la interleuquina 6, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para realizar la medición.

En una primera realización preferida, la presente invención está relacionada con un método para evaluar la artritis reumatoide *in vitro* mediante marcadores biológicos, que comprende medir en una muestra la concentración de anti-PCC e interleuquina 6 y correlacionar las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de la artritis reumatoide.

Tal como se utiliza aquí, cada uno de los siguientes términos posee el significado asociado con él en su sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" significa un marcador o más de un marcador.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal y como se utiliza aquí se refiere a una molécula a utilizar como la diana para analizar muestras de pacientes. Ejemplos de tales dianas moleculares son proteínas o polipéptidos así como anticuerpos presentes en una muestra. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contemplan para incluir cualquier variante de dicha proteína así como fragmentos de dicha proteína o dicha variante, en particular, los fragmentos detectables inmunológicamente. Un experto en la materia podrá reconocer que las proteínas que son liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular que son dañadas, por ejemplo, durante la inflamación pueden ser degradadas o escindidas en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que pueden ser posteriormente activados mediante proteólisis. Tal como podrá apreciar un experto en la materia, las proteínas o fragmentos de los mismos pueden también estar presentes como parte de un complejo. Tal complejo también puede utilizarse como un marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador están codificadas por el mismo gen, pero difieren en su PI o PM, o en ambos (por ejemplo,

como resultado de un procesamiento alternativo del mRNA o pre-mRNA, por ejemplo corte y empalme alternativo o proteólisis limitada) y además, o de forma alternativa, puede aparecer una modificación post-traducciona diferencial (por ejemplo, glicosilación, acilación y/o fosforilación).

5 El término marcador, como se ha mencionado antes, en la presente invención también está relacionado con los anticuerpos presentes en una muestra. En el caso de la AR estos anticuerpos son autoanticuerpos, es decir, anticuerpos en la muestra de un paciente que se unen a un antígeno presente o producido por las propias células del paciente.

10 El término “muestra” tal y como se utiliza aquí se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de la evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra del paciente preferiblemente puede comprender cualquier fluido corporal. Las muestras preferibles para las pruebas incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y fluido sinovial. Las muestras preferidas son sangre completa, suero, plasma o fluido sinovial, siendo el plasma o suero la más preferible.

15 Como un experto en la materia apreciará, cualquiera de estos diagnósticos se realiza *in vitro*. La muestra del paciente se deshecha tras esto. La muestra del paciente se utiliza tan sólo para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. Normalmente, la muestra es una muestra líquida.

20 El término “evaluación de la artritis reumatoide” se utiliza para indicar que el método de acuerdo con la presente invención ayudará al médico (junto con otras variables, por ejemplo, los criterios ARA expuestos (véase más arriba)) a establecer su diagnóstico para la AR. En una realización preferida, esta evaluación relacionará la presencia o ausencia de AR. Tal como un experto en la materia apreciará, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con un 100% de especificidad y a la vez con un 100% de sensibilidad para una enfermedad determinada, más bien los marcadores biológicos se utilizan para valorar con cierta probabilidad o valor predictivo la presencia o ausencia de una enfermedad. Preferiblemente el método de acuerdo con la presente invención ayuda en la evaluación de la presencia o ausencia de AR.

30 Tal como un experto en la materia apreciará, el paso de correlacionar un nivel de marcador con la presencia o ausencia de AR puede realizarse y lograrse de diferentes maneras. En general, se selecciona una población de referencia y se establece un rango normal. Establecer un rango normal utilizando una población de referencia apropiada, para el anti-PCC así como para la IL-6, forma parte de la experimentación de rutina. Se acepta de forma generalizada que el rango normal en una extensión cierta pero limitada depende de la población de referencia en que éste se establece. La población de referencia ideal tiene que ser numerosa, por ejemplo, de cientos a miles y agrupados por edad, género y opcionalmente otras variables de interés. El rango normal en términos de valores absolutos, como una concentración determinada, también depende del ensayo utilizado y la estandarización utilizada en producir el ensayo.

40 Los niveles dados para el anti-PCC y la IL-6 en la sección de ejemplos ha sido medido y establecido con los procedimientos de ensayo proporcionados. Debe entenderse que los diferentes ensayos pueden llevar a diferentes valores de corte, sin alejarse del alcance de la presente invención.

45 Los péptidos citrulinados son antígenos para autoanticuerpos bastante importantes como los encontrados en el suero de pacientes con AR. Han sido estudiados de forma intensiva durante los últimos años por varios grupos de investigadores (véase por ejemplo, WO 98/08946; WO 98/22503; WO 99/28344; WO 99/35167, WO 01/46222 y WO 03/050542). Recientemente Schellekens y colaboradores (Schellekens, G.A., *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 155-163) describieron que un ensayo de ELISA basado en péptidos cíclicos citrulinados específicos (PCC) mostraron características de rendimiento superiores respecto a la exactitud diagnóstica de la AR en comparación con el mismo ensayo utilizando péptidos lineales.

50 Los auto-anticuerpos contra PCC, es decir, los anticuerpos que tienen más probabilidad de reaccionar con polipéptidos citrulinados circulantes en el suero de un paciente y que se unen a PCC en un ensayo *in vitro* se denominan “anti-PCC”. La solicitud de patente de van Venroij *et al.* (WO 98/22503) describe ciertos péptidos citrulinados y muestra que la ciclación conduce a una reactividad mejorada de los respectivos péptidos. En un ejemplo específico se muestra que, si un péptido con la fórmula general HQCHQESTXGRSRGRCGRSGS (ID. DE SEC. N°:1), en el que X significa citrulina, se cicla mediante un puente disulfuro entre los dos residuos de cisteína, la sensibilidad aumenta a un 63% en comparación con el 36% del correspondiente péptido lineal. Como los autoanticuerpos en el suero de paciente poseen una reactividad ligeramente diferente a los diferentes péptidos cíclicos, en la WO 98/22503 se sugirió una combinación de péptidos para mejorar aún más el ensayo.

60 El anti-PCC se midió como se describe en van Venroij *et al* en la WO 03/050542. En resumen, se utiliza una combinación de péptidos que contienen sitios de epítopos con la fórmula general X-G y X-no-G en la que X indica citrulina, G glicina y no-G cualquier aminoácido H, I, W, S, R, K, Y, M, F, V, P, Cit o un análogo de los mismos para evaluar el nivel de anticuerpos anti-PCC (anti-PCC) en una muestra. Los péptidos específicos útiles en tal evaluación se describen en la WO 03/050542. Tal como un experto en la materia apreciará fácilmente, son posibles otras mejoras y depuraciones respecto al antígeno del péptido citrulinado cíclico utilizado en el ensayo para medir el anti-PCC, que resultará por ejemplo en una secuencia alterada de la secuencia del péptido citrulinado cíclico. No obstante, tales modificaciones no se alejan del espíritu de esta invención.

El anticuerpo que se une al PCC, es decir, el anti-PCC, se midió en un ensayo serológico. Preferiblemente tal ensayo se estableció utilizando uno o más PCC como antígeno y detectando la unión de anticuerpos anti-PCC comprendidos en una muestra al antígeno PCC mediante los métodos apropiados.

- 5 Los métodos de detección preferidos son los ensayos de unión específicos, especialmente inmunoensayos. Los inmunoensayos son bien conocidos por los expertos en la materia. Los métodos para llevar a cabo estos ensayos así como las aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en los libros de texto relacionados. Ejemplos de libros de texto relacionados son Tijssen, P., en: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Ed. R.H. Burdon y v.P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, 1990, 221-278 y varios volúmenes de *Methods in Enzymology*, Ed. S.P. Colowick, N.O. Caplan y S.P., Academic Press, relacionados con los métodos de detección inmunológicos, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

Los anticuerpos anti-PCC pueden detectarse mediante formatos de ensayo homogéneos, por ejemplo, mediante la aglutinación de partículas de látex recubiertas con PCC.

- 15 Preferiblemente se utiliza un inmunoensayo heterogéneo para medir el anti-PCC. Tal medición heterogénea se basa en el recubrimiento directo o indirecto con PCC de una fase sólida, la incubación de la fase sólida con una muestra conocida o que se sospecha que contenga anticuerpos anti-PCC bajo condiciones que permitan la unión de anticuerpos anti-PCC al PCC, y la detección de forma directa o indirecta de la unión de anticuerpo anti-PCC. Otro formato de ensayo es el denominado ensayo puente de doble antígeno, en el que, en el caso de una medición de anti-PCC, los PCC se sitúan tanto en la cara de la fase sólida como en la cara de la detección del inmunoensayo, por lo que los autoanticuerpos en una muestra del paciente forman un puente entre estos antígenos "dobles". Cuando sea necesario o apropiado, se incluyen pasos de lavado durante la realización de un inmunoensayo heterogéneo.

- 25 La interleuquina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que posee numerosas actividades biológicas que pueden dividirse en aquellas involucradas en la hematopoyesis y aquellas involucradas en la activación de la respuesta inmune innata. La IL-6 es un reactante de fase aguda y estimula la síntesis de una serie de proteínas, incluyendo moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción de proteínas hepáticas de fase aguda, y su síntesis es inducida por las citoquinas IL 1 y TNF- α . La IL-6 se produce normalmente en los macrófagos y los linfocitos T. La concentración normal en suero de IL-6 es < 5 pg/ml.

- Mientras que en el caso de los anti-PCC, se miden los (auto-)anticuerpos comprendidos en una muestra, para la IL-6 se detecta la molécula marcadora IL-6 en sí. La IL-6 por ejemplo puede ser medida mediante un tipo de inmunoensayo competitivo o uno de tipo sándwich. La IL-6 preferiblemente se mide en un inmunoensayo de tipo sándwich que se basa esencialmente en un anticuerpo que se une de forma específica a la IL-6, que se une directa o indirectamente o es capaz de unirse a una fase sólida, un anticuerpo que se une de forma específica a la IL-6 que está marcado de forma detectable, y en la incubación de estos reactivos bajo condiciones que permiten la unión de los anticuerpos anti-IL-6 a la IL-6 de una muestra, la separación del anticuerpo no unido marcado, la determinación de la cantidad de anticuerpo marcado unido por la IL-6, y la correlación de la cantidad de anticuerpo marcado unido a la concentración de IL-6 en la muestra.

- La situación ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único evento o proceso provocara la respectiva enfermedad como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En el resto de casos, un diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se comprende por completo como es el caso de la AR. Por lo tanto, para el diagnóstico de la AR en general se consideran conjuntamente los diferentes síntomas clínicos y los marcadores biológicos. Los marcadores pueden determinarse individualmente o pueden medirse simultáneamente en una realización preferida de la invención utilizando las tecnologías de chip o matriz basada en cuentas. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan entonces independientemente utilizando un límite individual para cada marcador o se combinan para interpretarse.

Tal y como se muestra en la sección de Ejemplos, la mera combinación de los dos marcadores anti-PCC e IL-6 mejora significativamente la exactitud del diagnóstico de la AR.

- 55 En un método de acuerdo con la presente invención se determina al menos la concentración de los biomarcadores y de la IL-6 respectivamente, y la combinación de marcadores se correlaciona con la presencia o ausencia de AR.

- Como un experto en la materia apreciará, existen varias vías para utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la incógnita diagnóstica de la investigación. En una aproximación bastante sencilla, pero sin embargo bastante efectiva, se asume un resultado positivo si una muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados. Este puede ser el caso del diagnóstico de por ejemplo una enfermedad infecciosa, como el SIDA. Frecuentemente, no obstante, se evalúa la combinación de marcadores. Preferiblemente los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo para anti-PCC e IL-6, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la incógnita diagnóstica subyacente. Los valores marcador pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad utiliza métodos como el análisis discriminante (AD) (es decir, AD lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, k del clasificador por vecino más cercano), MCP (Mínimos Cuadrados Parciales), métodos basados en árboles (es decir, Re-

gresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos Boosting/Bagging), modelos lineales generalizados (es decir, Regresión Logística), métodos basados en los componentes principales (es decir, SIMCA), Modelos Aditivos Generalizados, métodos basados en la lógica difusa, métodos basados en redes neuronales y en algoritmos genéticos. El experto en la materia no tendrá problema en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención.

Preferiblemente el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo con la presencia o ausencia de AR, se selecciona de entre el AD (es decir, AD lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, k del clasificador por vecino más cercano), MCP (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos basados en árboles (es decir, Regresión lógica, CART, Métodos de bosque aleatorio, Métodos Boosting) y Modelos Lineales Generalizados (es decir, Regresión Logística). Los detalles relacionados con estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., Kooperberg C., LeBlanc, M., *Logic regression*, J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H., *Regularized Discriminant Analysis*, J. de la Asociación Estadística Americana, 84 (1989) 165-175; Trevor Hastie, Robert Tibshirani y Jerome Friedman, *The Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag, 2001; Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) *Classification and regression trees*, California: Wadsworth; Breiman, L., *Random Forests*, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., *Pattern Classification*, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001).

En una realización preferida de la invención se utiliza un punto de corte optimizado multivariado para la combinación subyacente de los marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo enfermo de sano. En este tipo de análisis los marcadores no son independientes pero forman un panel de marcadores. Puede establecerse que la combinación de mediciones de anti-PCC y de IL-6 mejora significativamente la exactitud diagnóstica de la AR en comparación con los controles sanos o, si también se evalúa, en comparación con los pacientes con osteoartritis (OA). Especialmente este último hallazgo es de gran importancia, porque los pacientes con OA y AR, respectivamente, pueden necesitar tratamientos bastante diferentes.

La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor por sus características operativas del receptor (COR) (véase especialmente Zweig, M. H., y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). La gráfica de COR es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión sobre el rango completo de datos observados.

El funcionamiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de la prueba para distinguir de forma adecuada dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales condiciones son por ejemplo salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.

En cada caso, la representación de COR describe la superposición entre las dos distribuciones mediante la representación de la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el rango completo de los umbrales de decisión. En el eje y aparece la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de la prueba positivos verdaderos)/(número de verdaderos positivos + número de resultados de la prueba falsos negativos)]. Esto también ha sido denominado positividad de la presencia de una enfermedad o estado. Se calculó sólo del subgrupo afectado. En el eje x aparecen los falsos positivos, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula por completo del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calcularon de forma completamente separada, utilizando los resultados de las pruebas de los dos subgrupos diferentes, la representación de COR es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la representación de COR representa un par de sensibilidad/1-especificidad que corresponde a un umbral particular de decisión. Una prueba con una discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) posee una representación de COR que pasa a través de la esquina izquierda superior, en la que la fracción verdadera positiva es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falsa positiva es 0 (especificidad perfecta). La representación teórica de una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hacia la esquina superior derecha. La mayoría de representaciones están entre estos dos extremos. (Si la representación de COR se sitúa completamente debajo de la diagonal de 45°, se puede remediar fácilmente invirtiendo los criterios de "positividad" de "mayor que" a "menor que" o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cercana es la representación a la esquina superior izquierda, mayor es la exactitud total de la prueba.

Un objetivo conveniente en la cuantificación de la exactitud diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su resultado mediante un único número. La medición global más común es el área bajo la representación COR. Por convención, este área es siempre $\geq 0,5$ (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para hacerlo posible). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de los valores de prueba). El área no depende sólo de una porción particular de la representación como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad con un 90% de especificidad, sino de su representación completa. Esto es una expresión cuantitativa, descriptiva de lo cerca que está la representación de COR con la representación perfecta (área = 1,0).

En una realización preferida la presente invención está relacionada con un método para mejorar la exactitud diagnóstica de la artritis reumatoide frente a controles sanos y/o pacientes que sufren de OA midiendo en una muestra la concentración de al menos los anti-PCC e interleuquina 6, y correlacionando las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de artritis reumatoide, y la mejora resulta en que más pacientes son clasificados correctamente como afectados de AR frente a los controles sanos y/o pacientes afectados de OA en comparación con una clasificación basada en anti-PCC solo. El panel de marcadores de la AR que comprende anti-PCC e IL-6 puede utilizarse en la valoración de la gravedad de la enfermedad de los pacientes que sufren AR.

Como un experto en la materia apreciará, pueden utilizarse uno o más biomarcadores adicionales para mejorar aún más la evaluación de la AR. Para ilustrar este potencial adicional de la utilización de anti-PCC e IL-6 como los marcadores clave de un panel de marcadores para la evaluación de AR se ha utilizado el término “al menos” en las reivindicaciones anexadas. Con otras palabras, el nivel medido para uno o más marcadores adicionales puede combinarse con la medición de anti-PCC e IL-6 en la evaluación de la AR.

El marcador o marcadores adicionales utilizados junto con anti-PCC e IL-6 pueden considerarse como parte de un panel marcador de AR, es decir, una serie de marcadores apropiados para refinar más la evaluación de la AR. El número total de marcadores en un panel de marcadores de AR es preferiblemente inferior a 20 marcadores, más preferiblemente inferior a 15 marcadores, también preferiblemente inferior a 10 marcadores, siendo lo más preferible 8 o menos marcadores. Son preferibles los paneles de marcadores de AR que comprenden 3, 4, 5, o 6 marcadores en total.

En una realización preferida, la presente invención está relacionada con un método para evaluar la presencia o ausencia de artritis reumatoide *in vitro* mediante marcadores biológicos, lo que comprende la medición en una muestra de la concentración de anti-PCC, interleuquina 6 y además la concentración de uno o más marcadores adicionales y la correlación de las concentraciones de anti-PCC, IL-6 y de los marcadores adicionales con la presencia o ausencia de artritis reumatoide.

Será apreciado que uno o más marcadores diferentes puedan combinarse con cualquier marcador conocido o futuro de la AR. Un marcador se califica como un marcador de la AR si la ABC para este marcador solo, cuando se evalúa la exactitud diagnóstica comparando pacientes con AR con controles sanos, es de al menos 0,65.

Preferiblemente el marcador o marcadores adicionales se selecciona de entre el grupo que consiste en proteína C-reactiva (=PCR), amiloide A sérica (=AAS), S100, osteopontina, FR, metaloproteasa 1 de la matriz (=MMP-1), metaloproteasa 3 de la matriz (=MMP-3), ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovio.

La proteína C-reactiva (PCR) es una proteína de fase aguda homopentamérica que se une al Ca^{2+} , con subunidades de 21 kDa, que está involucrada en la defensa del huésped. La síntesis de la PCR está inducida por la IL-6, e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede activar la síntesis de IL-6 por las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración normal en plasma de la PCR es $< 3 \mu\text{g/ml}$ (30 nM) en el 90% de la población sana, y $< 10 \mu\text{g/ml}$ (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones en plasma de la PCR puede por ejemplo medirse mediante formatos de ensayo homogéneo o ELISA. La proteína C-reactiva es un marcador de la inflamación sistémica subyacente.

El amiloide A sérica (=AAS) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Se sintetiza principalmente en el hígado en respuesta a la estimulación de IL-1, IL-6 o $\text{TNF-}\alpha$ y está involucrada en la regulación de la respuesta inmune dependiente de las células T. En los eventos agudos la concentración de AAS aumenta hasta 1000 veces alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para monitorizar la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, rechazo de trasplante renal, traumatismos o infecciones. En la artritis reumatoide se ha utilizado en algunos casos como sustituto para la PCR, pero el AAS no está aceptado todavía de forma generalizada.

La osteopontina (=OPN) es una glicoproteína fosforilada secretada, altamente ácida, que se une al calcio. Se conocen tres isoformas que se originan de un corte y empalme alternativo que pueden estar libres o unidas a la matriz extracelular. A través del motivo RDG del esqueleto del péptido de 32 kDa, la OPN puede unirse a integrinas como la $\text{av}\beta 3$. Aunque se purificó originariamente a partir de la matriz ósea, se expresa en numerosos fluidos corporales y tejidos incluyendo leche, orina, células T activadas, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas, tejido renal y algunas células tumorales. Su expresión se estimula en respuesta a varias citoquinas, factores de crecimiento o mediadores inflamatorios. Las concentraciones de OPN aumentadas se han asociado con sepsis, cáncer metastático, isquemia cerebral, placas ateroscleróticas, formación de granuloma en tuberculosis y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Chabas, D., *et al.*, Science 294 (2001) 1731-1735) o RA (Petrow, P.K., *et al.*, Arthritis Rheum. 43 (2000) 1597-1605).

Los factores reumatoides (=FR) son autoanticuerpos dirigidos contra la región constante Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (Waalder, E., Acta Pathol. Microbiol. Scand. 17 (1940) 172-188; Moore, T. L., y Dorner, R. N., Clin. Biochem. 26 (1993) 75-84). Aunque el FR presenta algunas limitaciones, es actualmente el único marcador inmunológico de artritis reumatoide incluido en los criterios ARA. Al margen de la AR también se ha encontrado en otras enfermedades inflamatorias reumáticas, enfermedades no reumáticas e incluso en personas sanas con edad superior a 60 años (Bartfeld, H., Ann. NY Acad. Sci. 168 (1969) 30-40). Los autoanticuerpos de FR pertenecen a todas

las clases de inmunoglobulinas y la mayoría de los ensayos utilizados actualmente no diferencian entre los isotipos IgM, IgG e IgA. Estos ensayos de FR también denominados ensayos de FR total determinan mayoritariamente las IgM pero también cubren las IgG o IgA en cierto grado dependiendo del formato del ensayo y del proveedor (Bas, S., *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 61 (2002) 505-510). Más recientemente los isotipos IgG e IgA de FR han pasado a ser de interés en el diagnóstico de la AR. Cuando los tres isotipos de FR se encuentran elevados, el valor diagnóstico del ensayo FR puede ser mayor (Swedler, W., *et al.*, J. Rheumatol 24 (1997) 1037-1044). Además se atribuye cierto valor pronóstico a algunos de estos isotipos FR. Especialmente, se ha detectado que una concentración elevada de FR de tipo IgA es un indicador de una progresión grave de la enfermedad (Jorgensen, C., *et al.*, Clin. Exp. Rheum. 14 (1996) 301-304). En una combinación de marcadores de acuerdo con la presente invención, el marcador de FR puede ser cualquier forma de determinación del FR, lo que incluye FR total, isotipos únicos específicos de FR o cualquier combinación de isotipos de FR.

La familia de metaloproteasas de matriz (=MMP) degrada casi todos los componentes de la matriz extra-celular. Por ello, las MMP se han relacionado con varios tipos de cáncer, pero también con los procesos inflamatorios en la AR. La MMP-1 y la MMP-3 son producidas por los fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales tras la estimulación por citoquinas proinflamatorias como la IL-1 o el TNF- α . Generalmente las MMP se encuentran en la circulación como una proforma inactiva y el marcador MMP-1 y MMP-3, respectivamente, tal y como se utiliza aquí también está relacionado con tal proforma inactiva. MMP-1 y MMP-3 se han detectado en el fluido sinovial de los pacientes con AR y los niveles responden a la terapia anti-TNF- α . La metaloproteasa más preferible para su utilización en un panel de marcadores de AR de acuerdo con la presente invención es la MMP-1.

En lugar de las metaloproteasas mencionadas anteriormente, también es posible utilizar sus correspondientes inhibidores, en conjunto denominados inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz (=TIMP), por ejemplo, MMP-1 y MMP-3 son inactivadas *in vivo* por TIMP-1, que es una sialoglicoproteína de 29,5 kDa que forma un complejo estequiométrico 1:1 con las MMP. Se ha investigado la relación de TIMP-1 y TIMP-2 con la destrucción de cartílago en la AR (Ishiguro, N., *et al.*, Arthritis Rheum. 44 (2001) 2503-2511).

Las proteínas S100 forman una familia en constante aumento de proteínas que se unen al Ca²⁺, que actualmente incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero pero algunas pueden formar también heterodímeros entre ellas, por ejemplo la S100A8 y la S100A9. Las funciones intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de proteínas, de actividades enzimáticas, la dinámica del citoesqueleto o la implicación en la proliferación celular y en la diferenciación. Como algunas proteínas S100 se liberan también desde las células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo, supervivencia neuronal, proliferación astrocitaria, inducción de apoptosis y regulación de los procesos inflamatorios. La S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 se han encontrado en la inflamación, entre las que S100A8 responde a inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 aumentan en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se relacionan con diferentes enfermedades con componente inflamatorio, lo que incluye algunos cánceres, el rechazo de aloinjerto renal, colitis y de forma más importante con la AR. (Burmeister, G., y Gallacchi, G., Inflammopharmacology 3 (1995) 221-230; Foell, D., *et al.*, Rheumatology 42 (2003) 1383-1389). Los marcadores S100 más preferibles para su utilización en un panel de marcadores de AR de acuerdo con la presente invención son S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12.

El CD14 es una proteína de la membrana de promonocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos activados, en los que sirve como receptor para el lipopolisacárido. Induce la secreción de factores citotóxicos e inmunomoduladores como el oxígeno reactivo (O₂), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8) y factor activador de plaquetas (PAF). El CD14 unido a membrana se libera para proporcionar CD40 soluble (=sCD14) en respuesta a los factores activadores o diferenciadores como el IFN γ o el TNF- α . La función fisiológica del sCD14 no está del todo clara todavía. Como en la AR y en otras enfermedades autoinmunes están involucrados procesos inflamatorios e inmunológicos, el sCD14 también se ha investigado en estas enfermedades. Cuando se evaluó la terapia anti-CD14 como una nueva opción terapéutica en la AR, la concentración de sCD14 anteriormente elevada se disminuyó rápidamente y se redujo la sinovitis (Horneff, G., *et al.*, Clin. Exp. Immunol 91 (1993) 207-213).

El glicosaminoglicano ácido hialurónico es una de las macromoléculas esenciales para el funcionamiento de una articulación. Es sintetizado por los fibroblastos y otras células especializadas del tejido conectivo. El ácido hialurónico está involucrado en la formación de la matriz extracelular y en las uniones de célula a célula. Se encuentran altas concentraciones en el fluido sinovial, donde es responsable de la retención de agua, contribuyendo de esta manera a la lubricación de las articulaciones. En la artritis reumatoide la síntesis de ácido hialurónico es estimulada por los mediadores proinflamatorios IL-1 y TNF- α lo que conduce a un aumento de los niveles en suero/plasma (Sawai, T., y Uzuki, M., Connective Tissue 33 (2001) 253-259).

Una característica de la artritis reumatoide es la invasión de las articulaciones por un tejido sinovial proliferante también conocido como panus. Una parte significativa del panus consiste en vasos sanguíneos que suministran nutrientes al tejido en crecimiento. Por lo tanto, también se han investigado en la AR las moléculas relevantes en la angiogénesis, tanto como marcadores de AR como posibles dianas terapéuticas (Brenchley, P.E.C., Clin. Exp. Immunol. 121 (2000) 426-429). Entre estas, el factor de crecimiento endotelial vascular (=VEGF) se ha evaluado en más detalle. El VEGF es una glicoproteína secretada que se modifica para generar cuatro isoformas diferentes. Dos de estas isoformas se difunden fácilmente mientras que el resto de isoformas se unen fuertemente a la heparina y se encuentran mayoritariamente en asociación con proteoglicanos que contienen heparina. El VEGF actúa como una quimioquina

sobre las células endoteliales, monocitos y osteoblastos conduciendo en último término a la neovascularización y a un aumento de la permeabilidad microvascular. El VEGF se ha detectado en el fluido sinovial y el suero de los pacientes con AR (Lee, S.S., *et al.*, Clin. Exp. Rheumatology 19 (2001) 321-324; Ballara, S., Arthritis Rheum. 44 (2001) 2055-2064). Preferiblemente, el marcador de angiogénesis es el VEGF.

Los tejidos de las articulaciones más importantes son hueso, cartílago y el sinovio. Como la artritis reumatoide es una enfermedad destructiva estos tejidos serán los más afectados. Estos son una fuente probable de potenciales marcadores biológicos en el campo de la AR. En principio estos marcadores pueden proceder no sólo de la destrucción del respectivo tejido sino también de un proceso de reparación desregulado y/o inefectivo. Un experto entenderá que los marcadores del metabolismo del hueso, cartílago y sinovio pueden originarse por la síntesis o por la destrucción de estos tejidos. Los diferentes marcadores del metabolismo del hueso, cartílago y/o sinovio pueden perfilarse a partir de dos grupos diferentes de proteínas. Proceden de los numerosos tipos de colágeno o de proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas a menudo están involucradas en la formación de la matriz extracelular. Algunos de estos marcadores pueden encontrarse en los tres tejidos en cantidades variables.

Los marcadores y productos del metabolismo del hueso y/o cartílago incluyen tanto marcadores de la degradación del hueso y/o cartílago como marcadores de la formación del hueso y/o cartílago. Los marcadores preferibles derivados del metabolismo del colágeno son marcadores como:

1. Piridinolina (=PYD), desoxipiridinolina (=DPD) y Glc-Gal-PYD: La piridinolina (=PYD) estabiliza el colágeno entrecruzando las cadenas de la triple hélice de colágeno. La estructura química de la PYD es muy estable y puede encontrarse en suero y orina como subproducto de la degradación del colágeno (Knott, L., y Bailey, A.J., Bone 22 (1998) 181-187). Se ha asociado con la artritis (Kaufmann, J., *et al.*, Rheumatology 42 (2003) 314-320). La PYD sirve para monitorizar la afectación del cartílago en la destrucción de articulaciones ya que es liberada desde el cartílago y sólo hasta cierto grado por el hueso mientras su prima cercana desoxi-piridinolina (=DPD) se origina mayoritariamente a partir del hueso. Los tres marcadores se han asociado con la artritis (Kaufmann, *supra*). La forma glicosilada Glc-Gal-PYD se ha encontrado mayoritariamente en el tejido sinovial (Gineyts, E., *et al.*, Rheumatology 40 (2001) 315-323).

2. Telopéptidos entrecruzados: CTX-I, CTX-II, NTX-I y el epítipo LQ que son telopéptidos entrecruzados del extremo C- o N-terminal de los colágenos tipo I o tipo II, respectivamente, y de los que el β -CTX-I es también conocido como β -CrossLaps® (Bonde, M., *et al.*, Clin. Chem. 40 (1994) 2022-2025). El telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (=ICTP) se refiere a un fragmento y marcador del colágeno tipo I que originalmente se derivó a partir de colágeno tipo I mediante escisión con cianobromuro.

3. Péptidos lineales derivados del colágeno: El ensayo denominado Cartilaps® mide un péptido lineal que se deriva de la región C-terminal del colágeno tipo II.

4. Aminoácidos modificados: El colágeno comprende aminoácidos modificados como la hidroxiprolina y galactosil hidroxilisina que pueden utilizarse como marcador de la ruptura del colágeno (Al-Dehaimi, A.W., *et al.*, Clin. Chem. 45 (1999) 676-681).

5. Neoepítopos del colágeno: Col2-3/4 y CIIN son neoepítopos generados por la escisión inicial del colágeno II por las colagenasas (Billinghurst, R.C., *et al.*, J. Clin. Invest. 99 (1997) 1534-1545).

6. Marcadores de colágeno que se considera que reflejan la formación de hueso: el propéptido N-terminal así como el C-terminal del colágeno tipo I (=PINP y PICP), respectivamente, se escinden del polipéptido precursor (procolágeno) durante/tras la síntesis y se consideran marcadores de la formación de hueso. PIICP es el propéptido correspondiente del colágeno tipo II, mientras PIIINP se deriva del colágeno tipo III.

Preferiblemente el marcador del metabolismo del hueso y/o cartílago también puede ser un marcador no colágeno, como: CS846, que es un epítipo del condroitin sulfato generado durante la síntesis de agregano; proteína de matriz oligomérica del cartílago (=PMOC) que tiene funciones de enlazante en el cartílago (Saxne, T., y Heinegard, D., Br. J. Rheumatol. 31 (1992) 583-591); proteína de la capa intermedia del cartílago (=PCIC), que es una proteína de la matriz del cartílago (Lorenzo, P., *et al.*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 23463-23468); proteínas de la matriz del cartílago 1-3 también conocidas como matrilinas; condromodulinas que actúan como moléculas señalización en el cartílago (Suzuki, F., Connect. Tissue Res. 35 (1996) 303-307); proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago (=PARDC) o MIA, que tiene una función aun por definir en la modulación de los condrocitos (Müller-Ladner, U., *et al.*, Rheumatology 38 (1999) 148-154); osteocalcina, sintetizada por los osteoblastos, es una importante proteína de matriz no colágena del hueso y se utiliza para monitorizar el recambio óseo (Gundberg, C. M., *et al.*, J. Clin. Ligand Assay 21 (1998) 128-138); y las sialoproteínas del hueso, que son importantes proteínas de matriz no colágenas del hueso, como la sialoproteína II del hueso, ahora conocida como la sialoproteína del hueso, que por ejemplo, se ha evaluado como marcador del recambio óseo (Saxne, T., *et al.*, Arthritis Rheum. 38 (1995) 82-90).

Los productos del metabolismo del sinovio que pueden utilizarse como marcador para la evaluación de la AR incluyen: CTXIII, que es un telopéptido derivado del colágeno tipo III, YKL40 que es una proteína de tipo quitinasa 3 de la matriz extracelular (Johansen, J. S., *et al.*, Scand. J. Rheumatol. 30 (2001) 297-304), y agregano, que es un bloque de construcción de los proteoglicanos así como su producto de degradación, el queratán sulfato.

Preferiblemente el panel de marcadores de la AR comprende al menos tres marcadores, entre los que figuran anti-PCC, IL-6 y un tercer marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, AAS, S100, osteopontina, FR, MMP-1, MMP-3, ácido hialurónico y un producto del metabolismo del colágeno.

5 En la evaluación del panel de marcadores de la AR que comprende anti-PCC, IL-6 y S100, es especialmente preferible S100A12.

Un panel de marcadores de la AR más preferible comprende anti-PCC, IL-6 y AAS.

10 Un panel de marcadores de la AR más preferible comprende anti-PCC, IL-6 y la proforma de la MMP-1, es decir, pro-MMP-1.

15 Como se ha mencionado anteriormente (véanse los criterios ARA), a pesar de las severas limitaciones, el factor reumatoide (FR) actualmente es el único marcador bioquímico generalmente aceptado para apoyar en el establecimiento de un diagnóstico de AR. Se tiene claras expectativas de que la combinación de marcadores de la presente invención mejorará significativamente el diagnóstico de AR y complementará o podría incluso finalmente reemplazar el ensayo del FR. La utilización de un panel de marcadores que comprende al menos anti-PCC e interleuquina 6 en diagnóstico de la AR por lo tanto representa una realización más preferible de la presente invención.

20 Tal y como un experto en la materia apreciará, pueden utilizarse uno o más marcadores adicionales para mejorar aun más la exactitud del diagnóstico, o, en caso necesario aumentar la sensibilidad del diagnóstico a expensas de la especificidad o viceversa. En algunas áreas diagnósticas, por ejemplo, en la detección de una infección por VIH, la sensibilidad es de máxima importancia. La elevada sensibilidad requerida puede conseguirse a expensas de la especificidad, lo que conduce a un número aumentado de casos falsos positivos. En otros casos, por ejemplo como ejemplo simple, cuando se evalúan los antígenos de grupo sanguíneo, la especificidad es de vital importancia.

25 Una realización más preferible está relacionada con la utilización de un panel de marcadores en el diagnóstico de la AR, cuando este panel comprende anti-PCC, interleuquina 6 y al menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, AAS, S100, osteopontina, FR, MMP-1, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de la angiogénesis y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovio.

30 El método de acuerdo con la presente invención será de gran utilidad en la valoración de la severidad de la AR. Cuanto mayor es el nivel de anti-PCC y/o mayor es el nivel de IL-6 más severa es la enfermedad. Con las combinaciones de marcadores o paneles de marcadores ahora disponibles no será más que una experimentación rutinaria el desarrollar por ejemplo, puntuaciones para la enfermedad como un indicador de la gravedad de la enfermedad. Así, el método de acuerdo con la presente invención es preferiblemente también utilizado para evaluar la severidad de la enfermedad.

35 El método de la presente invención también será de gran ayuda en la monitorización del curso de la enfermedad. Esto se consigue más fácilmente midiendo en una muestra del paciente anti-PCC e IL-6 así como marcadores adicionales opcionales en varios momentos a lo largo del tiempo y comparando los niveles absolutos y/o los niveles relativos de los marcadores en esos diferentes momentos. Por lo tanto es más preferible utilizar el método de acuerdo con la presente invención para monitorizar el curso de la enfermedad en un paciente con AR.

40 También se reconoce que la presente invención será de gran ayuda en la valoración de la eficacia de cualquier tratamiento de la AR. La eficacia del tratamiento se reflejará mediante cambios en los niveles de marcadores. Si un tratamiento tiene el efecto deseado al menos el nivel de uno de los dos de marcadores, anti-PCC o IL-6, se reducirá. El método de acuerdo con la presente invención por lo tanto también se utiliza preferiblemente para evaluar la eficacia del tratamiento. El mismo fenómeno, es decir, una reducción en el nivel de marcador de al menos uno de entre anti-PCC y IL-6, puede aplicarse fácilmente a la selección del fármaco adecuado así como la dosificación más apropiada de los fármacos en la AR. También es preferible la utilización de un método de esta invención en la selección del fármaco adecuado y/o la dosificación más apropiada.

45 El método de la presente invención también permitirá la selección e identificación de nuevos fármacos en el campo de la AR. Esta aplicación representa una realización preferida posterior.

50 Será también una gran ventaja que los subgrupos de pacientes puedan ser identificados para y en los estudios clínicos por su diferencia en el nivel de anti-PCC e IL-6, y correlacionar esta diferencia en el nivel de marcador con la eficacia del fármaco bajo investigación.

55 La presente invención también está relacionada con un equipo para realizar el método de esta invención que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente anti-PCC e interleuquina 6, respectivamente. El equipo puede comprender opcionalmente reactivos auxiliares para realizar la medición de tanto anti-PCC como IL-6.

60 Los siguientes Ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras se proporciona para ayudar en la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se indica en las reivindicaciones anexas. Se entenderá que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

“Puntuación DR” en todas las Figuras significa “puntuación discriminante regularizada regular,” es decir, la puntuación obtenida al aplicar un Análisis Discriminante Regularizado; “ABC” en todas las Figuras significa “área bajo la curva”:

Fig. 1 Análisis de COR de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles que incluyen OA utilizando log FR total solo.

Fig. 2 Análisis de COR de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles que incluyen OA utilizando log anti-PCC solo.

Fig. 3 Análisis de COR de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles que incluyen OA utilizando la combinación de log anti-PCC y log IL-6.

Fig. 4 Análisis de COR de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles que incluyen OA utilizando la combinación de log anti-PCC, log IL-6 y log ácido hialurónico.

Fig. 5 Análisis de COR de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles que incluyen OA utilizando la combinación de log anti-PCC, log IL-6 y log AAS.

Ejemplo 1

Estudio poblacional

Muestras derivadas a partir de 389 pacientes de AR altamente caracterizados con una duración máxima de enfermedad de 15 años se recogieron en cinco centros europeos con un seguimiento de dos años. Todos los individuos se diagnosticaron como pacientes de AR de acuerdo con los criterios ARA y tenían un estado funcional de $\leq$ III según la clasificación mediante los criterios ARA (Hochberg, M.C., *et al.*, Arthritis Rheum. 35 (1992) 498-502). Todos los pacientes se documentaron con un cuaderno de recogida de datos (=CRD) extensivo. El CRD incluye el cuestionario de evaluación de la salud, el cuestionario SF36, el conteo de articulaciones hinchadas y rígidas, la puntuación Larsen, parámetros de laboratorio, historial clínico de cirugías relevantes, medicación, co-morbilidades y medicación para las co-morbilidades. Se realizaron rayos X cada año siguiendo el procedimiento estandarizado. Sólo se han incluido en el presente análisis muestras basales obtenidas de los sujetos incluidos en este estudio.

También se recogieron muestras derivadas de 624 sujetos control. En estos controles se excluyeron sólo los sujetos positivos para AR pero no otras formas de artritis. De esta cohorte se escogieron 200 muestras con un rango de edad como el de las muestras de AR del estudio. Como el objetivo del estudio era discriminar la AR no sólo en sujetos sanos sino también de otras enfermedades de las articulaciones, se añadieron 190 pacientes con OA tibiofemoral o patelofemoral de la rodilla como controles enfermos. En estos pacientes de OA se determinaron los parámetros clínicos y de laboratorio y se calculó la puntuación radiográfica de Kellgren y Lawrence (Kellgren, J. H., y Lawrence, J. S., Ann. Rheum. Dis. 16 (1957) 494-502).

Los datos demográficos de la población del estudio se proporcionan en la Tabla 1.

TABLA 1

Colectivos de Pacientes			
Colectivos	N	Edad	Género (f/m/?)
AR	389	59,1 (16-87)	256/132/1
Controles incl. OA	390	60,6 (38-92)	195/195/0

Ejemplo 2

Marcadores medidos

La Tabla 2 presenta una selección de los ensayos utilizados y proporciona el formato de ensayo así como los distribuidores de los ensayos. La mayoría de los ensayos eran en formato de ELISA en placas microtituladas manuales (=PMT). FR y PCR se determinaron en un formato de ensayo homogéneo en un analizador automático Hitachi. Las concentraciones de marcador se determinaron en muestras de suero con estos ensayos disponibles comercialmente en los pacientes así como en los controles.

TABLA 2

Ensayos y distribuidores		
Biomarcador	Formato/ tipo de Ensayo	Origen
Anti-PCC	Sándwich ELISA, PMT	Axis-Shield, Dundee (UK)
PCR	Ensayo homogénea, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
Ácido hialurónico	Sándwich ELISA, PMT	Chugai, Tokyo (J)
IL-6	Sándwich ELISA, PMT	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
FR	Ensayo homogéneo, Hitachi	Roche Diagnostics, Mannheim (FRG)
AAS	Sándwich ELISA, PMT	Biosource, Nivelles (B)

Ejemplo 3

Evaluación estadística

- 5 Las cohortes de pacientes se separaron al azar en un grupo de entrenamiento (aprox. 67%) y en un grupo de prueba (aprox. 33%). En el grupo de entrenamiento se desarrolló un algoritmo de clasificación y en el grupo de prueba independiente se validó el algoritmo. Como puede observarse en la Tabla 3 los respectivos grupos se escogieron para que fueran muy parecidos en tamaño así como en edad.

10 TABLA 3

Distribución de edad de los colectivos								
Grupo	estudio	N	media	Max	q3	mediana	q1	Min
Entrenamiento	AR	259	58.7	87	68	59	51	23
Entrenamiento	Controles incl. OA	261	60.2	92	69	60	51	42
Prueba	AR	130	59.8	83	68	61	52	16
Prueba	Controles incl. OA	129	61.3	84	70	63	52	38

- Los algoritmos de clasificación se generaron con un Análisis Discriminante Regularizado (ADR), que es una generalización del Análisis discriminante común, es decir, Análisis discriminante cuadrático y lineal (McLachlan, G.J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992). En el ADR se utilizan alternativas a las estimaciones usuales de máxima verosimilitud ("plug-in") para las matrices de covarianza. Estas alternativas se caracterizan por dos parámetros (λ , γ), los valores de los cuales se adaptan a la situación individual minimizando conjuntamente una estimación basada en muestras del riesgo de clasificación errónea futura (Friedman, J.H., Regularized Discriminant Analysis, J. of the American Statistical Association, Vol. 84 (1989) 165-175). Como método alternativo los algoritmos de máquinas de soporte vectorial (Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001) pueden ajustarse con resultados de clasificación comparables.

- Los paneles de marcadores se construyeron paso a paso empezando por el mejor marcador único para el problema de clasificación y acabando cuando el error de clasificación total ya no cambia de forma notable. Para obtener distribuciones centralizadas cada marcador único se transformó con la función logarítmica natural. Se utilizó una validación cruzada 10 veces en el grupo de entrenamiento para obtener estimaciones robustas del error total (sensibilidad, especificidad). Una vez definido el panel de marcadores, se validó sin ningún otro ajuste con un grupo de prueba independiente.

Ejemplo 4

55 *Identificación de un panel de marcadores para el diagnóstico de la AR*

- La Tabla 4 presenta los resultados de clasificación de los pacientes diagnosticados de AR frente a los controles incl. OA en el grupo de entrenamiento. El primer marcador seleccionado fue anti-PCC, el segundo IL-6 y el tercero y último el ácido hialurónico cuando el algoritmo se detuvo. Los resultados de clasificación de la combinación de marcadores anti-PCC, IL-6 y AAS se describen también a causa de que fueron superados sólo por un estrecho margen por la combinación anti-PCC, IL-6 y ácido hialurónico. Como referencia se presentan los resultados de clasificación del FR total, que como se ha mencionado anteriormente es actualmente el único marcador bioquímico que forma parte de los criterios ARA.

- El objetivo de la presente invención es mejorar el diagnóstico correcto de la AR frente a controles que incluyen OA. El valor diagnóstico del panel de marcadores identificado se refleja mejor en la Tabla 4 mediante el error total de la clasificación. El FR, actualmente el único marcador biológico incluido en los criterios ARA, da lugar a un error total de 0,18. El anti-PCC como marcador único ya lo reduce a 0,14. La combinación preferible de anti-PCC y IL-6 mejora

significativamente la clasificación con un error total de 0,12. Añadir un tercer marcador ayuda finalmente a minimizar aun más la clasificación errónea. El panel de marcadores anti-PCC, IL-6 más ácido hialurónico tiene un error total de 0,11, y la combinación de anti-PCC, IL-6 más AAS es comparable dando lugar a un error total de 0,12.

TABLA 4

Resultados de clasificación del grupo de entrenamiento de pacientes diagnosticados de AR frente a controles que incl. OA						
N° de marca- dores	marcador panel de marcadores	Método (ADR)	Validación cruzada (10 veces)			
			ERROR TOTAL	positivos correctos Sensibili- dad	negativos correctos Especifi- cidad	
1	log FR total	$\lambda_{\cdot} = 0, \gamma_{\cdot} = 0$	0,184	68,2%	95,6%	
1	log anti-PCC	$\lambda_{\cdot} = 0, \gamma_{\cdot} = 0$	0,146	74,4%	96,6%	
2	log anti-PCC, log IL-6	$\lambda_{\cdot} = 0, \gamma_{\cdot} = 0$	0,115	80,3%	96,9%	
3	log anti-PCC, log IL-6, log ácido hialurónico	$\lambda_{\cdot} = 0, \gamma_{\cdot} = 0$	0,108	82,1%	96,5%	
3	log anti-PCC, log IL-6, log AAS	$\lambda_{\cdot} = 0, \gamma_{\cdot} = 0,25$	0,117	80,3%	96,6%	

Lo más crítico de la aproximación escogida en este estudio es la cuestión de si tiene una aplicabilidad general. Para comprobarlo, el panel de marcadores identificado en el grupo de entrenamiento se validó con un grupo de prueba independiente. Como un experto en la materia comprenderá, los resultados de los grupos de entrenamiento y de prueba pueden diferir ligeramente a causa de que ambos grupos eran realmente independientes. La Tabla 5 proporciona los resultados de clasificación utilizando los mismos marcadores únicos o panel de marcadores que en la Tabla 4. Como en el grupo de entrenamiento la combinación e anti-PCC, IL-6 y ácido hialurónico o AAS reduce el error total de la clasificación. Los resultados presentados en la Tabla 4 y 5 claramente muestran que la combinación de anti-PCC, IL-6 y opcionalmente al menos un marcador adicional mejora significativamente el diagnóstico de la AR.

TABLA 5

Resultados de clasificación del grupo de prueba de pacientes diagnosticados de AR frente a controles que incluyen pacientes con OA

N° de marca- dores	marcador o panel de marcadores	Método (ADR)	Validación cruzada (10 veces)		
			ERROR TOTAL	positivos correctos Sensibili- dad	negativos correctos Especifici- dad
1	log FR to- tal	$\lambda = 0$, $\gamma = 0$	0,193	66,9%	94,6%
1	log anti- PCC	$\lambda = 0$, $\gamma = 0$	0,166	66,9%	100%
2	log anti- PCC, log IL-6	$\lambda = 0$, $\gamma = 0$	0,112	80%	97,7%
3	log anti- PCC, log IL-6, log ácido hia- lurónico	$\lambda = 0$, $\gamma = 0$	0,108	80%	98,5%
3	log anti- PCC, log IL-6, log AAS	$\lambda = 0$, $\gamma = 0,25$	0,100	80%	100%

Las curvas de COR de los marcadores y combinaciones de marcadores, respectivamente, de la Tabla 5 se muestran en las Figuras de 1 a 5.

Lista de referencias

- Al-Dehaimi**, A.W., *et al.*, *Clin. Chem.* 45 (1999) 676-681
- 5 **Arnett**, F.C., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 315-324
- Ballara**, S., *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 2055-2064
- Bartfeld**, H., *Ann. NY Acad. Sci.* 168 (1969) 30-40
- 10 **Bas**, S., *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.* 61 (2002) 505-510
- Billinghurst**, R.C., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1534-1545
- 15 **Bonde**, M., *et al.*, *Clin. Chem.* 40 (1994) 2022-2025
- Brenchley**, P. E. C., *Clin. Exp. Immunol.* 121 (2000) 426-429
- Breiman**, L., **Friedman**, J. H., **Olshen**, R. A. y **Stone**, C. J. (1984) Classification and regression trees, California: Wadsworth
- 20 **Breiman**, L., Random Forests, *Machine Learning*, 45 (2001) 5-32
- Burmeister**, G., y **Gallacchi**, G., *Inflammopharmacology* 3 (1995) 221-230
- 25 **Chabas**, D., *et al.*, *Science* 294 (2001) 1731-1735
- Duda**, R. O., **Hart**, P. E., **Stork**, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001)
- 30 **Foell**, D., *et al.*, *Rheumatology* 42 (2003) 1383-1389
- Friedman**, J. H., Regularized Discriminant Analysis, J. of the American Statistical Association, Vol. 84 (1989) 165-175
- 35 **Gineyts**, E., *et al.*, *Rheumatology* 40 (2001) 315-323
- Gundberg**, C. M., *et al.*, *J. Clin. Ligand Assay* 21 (1998) 128-138
- Hastie**, Trevor, **Tibshirani**, Robert, **Friedman**, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001
- 40 **Hochberg**, M. C., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 35 (1992) 498-502
- Horneff**, G., *et al.*, *Clin. Exp. Immunol* 91 (1993) 207-213
- 45 **Ishiguro**, N., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 2503-2511
- Johansen**, J. S., *et al.*, *Scand. J. Rheumatol.* 30 (2001) 297-304
- 50 **Jorgensen**, C., *et al.*, *Clin. Exp. Rheum.* 14 (1996) 301-304
- Kaufmann**, J., *et al.*, *Rheumatology* 42 (2003) 314-320
- Kellgren**, J. H., y Lawrence, J. S., *Ann. Rheum. Dis.* 16 (1957) 494-502
- 55 **Knott**, L., y Bailey, A. J., *Bone* 22 (1998) 181-187
- Lee**, S. S., *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatology* 19 (2001) 321-324
- 60 **Lorenzo**, P., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23463-23468
- McLachlan**, G.J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992 *Methods in Enzymology*, Ed. S.P. Colowick, N.O. Caplan y S.P., *Academic Press*, que tratan de métodos de detección inmunológica, varios volúmenes, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.
- 65 **Moore**, T. L., y **Dorner**, R. N., *Clin Biochem.* 26 (1993) 75-84
- Müller-Ladner**, U., *et al.*, *Rheumatology* 38 (1999) 148-154

ES 2 297 521 T3

Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003)

Petrow, P. K., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 1597-1605

Ruczinski, I., **Kooperberg**, C., **LeBlanc**, M., Logic regression, *J. of Computational and Graphical Statistics*, 12 (2003) 475-511

Sawai, T., and **Uzuki**, M., *Connective Tissue* 33 (2001) 253-259

Saxne, T., and **Heinegard**, D., *Br. J. Rheumatol.* 31 (1992) 583-591

Saxne, T., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 38 (1995) 82-90

Schellekens, G.A., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 155-163

Suzuki, F., *Connect. Tissue Res.* 35 (1996) 303-307

Swedler, W., *et al.*, *J. Rheumatol* 24 (1997) 1037-1044

Tijssen, P., In: Practice and theory of enzyme immunoassays, Ed. R. H. Burdon y v.P.H. Knippenberg, *Elsevier*, Amsterdam (1990) 221-278

Van der **Heijde**, D. M., *Br. J. Rheumatol.* 34 (1995) 74-78

Waler, E., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 17 (1940) 172-188

WO 01/46222

WO 03/050542

WO 98/08946

WO 98/22503

WO 99/28344

WO 99/35167

Zweig, M. H., y **Campbell**, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para valorar la presencia o ausencia de artritis reumatoide *in vitro* mediante marcadores biológicos, lo que comprende la medida en una muestra de la concentración de al menos a) anti-PCC y b) interleuquina 6, y c) la correlación de las concentraciones determinadas en los pasos a) y b) con la presencia o ausencia de artritis reumatoide.

10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la medida de al menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, AAS, S100, osteopontina, FR, MMP-1, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovio.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho marcador adicional es el marcador AAS.

15 4. La utilización de un panel de marcadores que comprende al menos anti-PCC e interleuquina 6, para la obtención de un agente diagnóstico para el diagnóstico de la AR.

20 5. La utilización de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende anti-PCC, interleuquina 6 y al menos un marcador adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, AAS, S100, osteopontina, FR, MMP-1, MMP-3, ácido hialurónico, sCD14, marcadores de angiogénesis y productos del metabolismo del hueso, cartílago o sinovio.

6. La utilización de un panel de marcadores que comprende al menos anti-PCC, interleuquina 6 y el marcador AAS para la obtención de un agente diagnóstico para el diagnóstico de la AR.

25 7. Un equipo para la realización del método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende los reactivos necesarios para medir de forma específica anti-PCC e interleuquina 6, respectivamente, y opcionalmente los reactivos auxiliares para realizar la medida.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

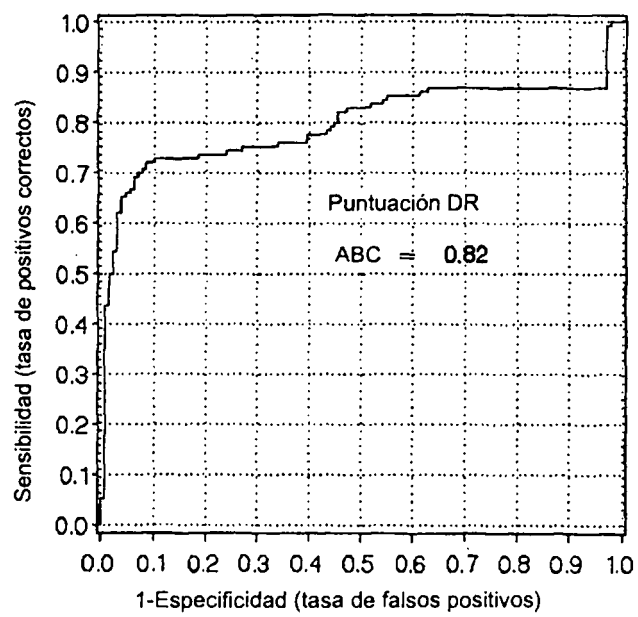


Fig. 2

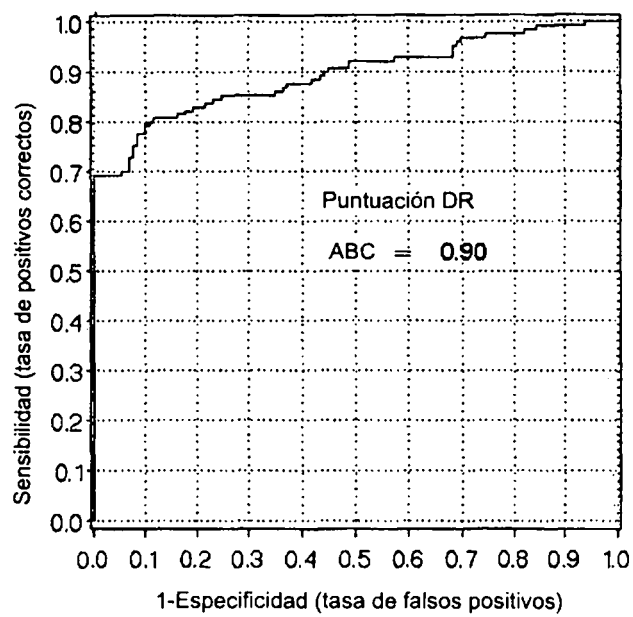


Fig. 3

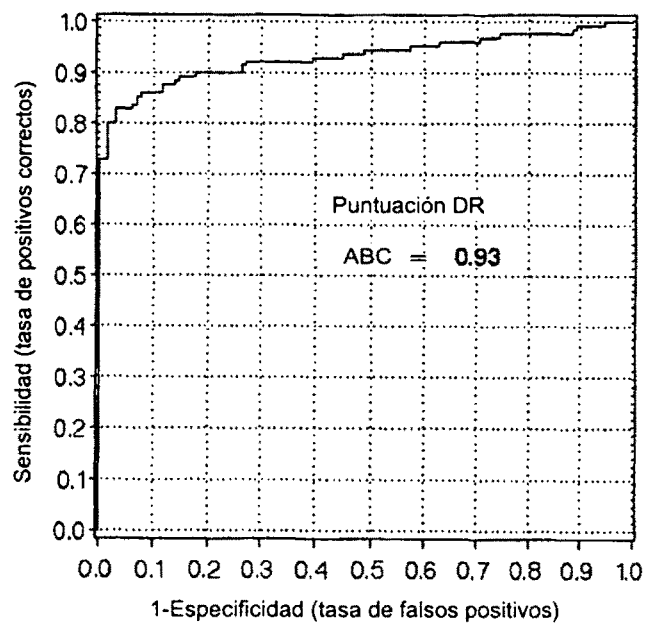


Fig. 4

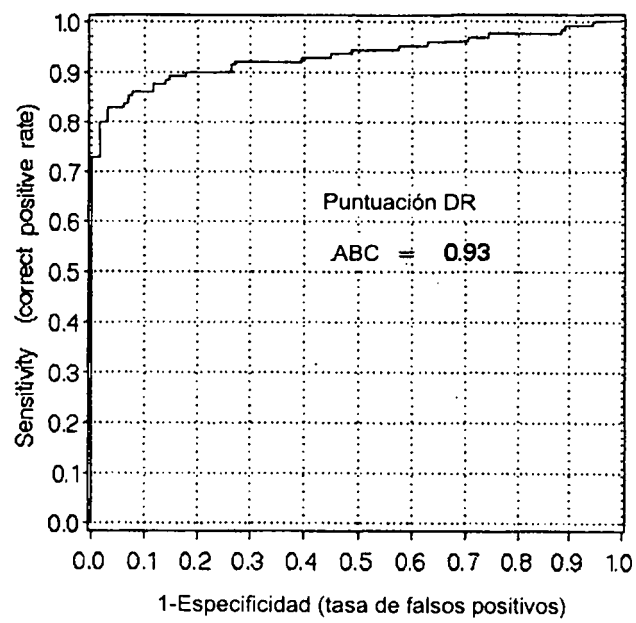
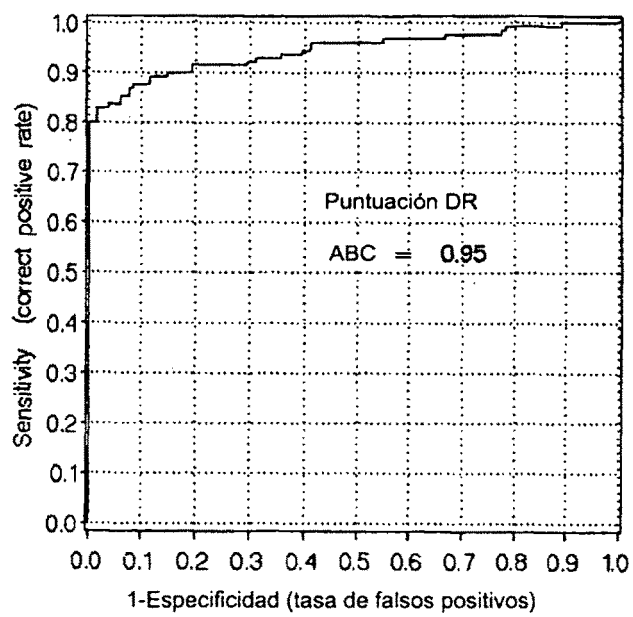


Fig. 5



ES 2 297 521 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
5	<120> Método para la evaluación de la artritis reumatoide mediante la medición de anti-PCC e interleuquina 6
	<130> 22353 WO
	<150> 03029658.6
	<151> 2003-12-23
10	<160> 1
	<170> PatentIn versión 3.2
	<210> 1
	<211> 21
15	<212> PRT
	<213> Artificial
	<220>
20	<223> péptido sintético
	<220>
	<221> característica miscelánea
	<222> (9)...(9)
25	<223> Xaa indica citrulina

<400> 1

30 His Gln Cys His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Arg Ser Arg Gly Arg Cys
 1 5 10 15

35 Gly Arg Ser Gly Ser
20

40

45

50

55

60

65