REIAL ACADÈMIA
DE FARMÀCIA
DE CATALUNYA



DISCURS

LLEGIT EN L'ACTE D'INGRÉS DE L'ACADÈMICA CORRESPONENT
IL·LUSTRE SRA. DRA. ISABEL HARO VILLAR
CELEBRAT EL DIA 28 D'OCTUBRE DE 2026

PRESENTACIÓ A CÀRREC DE L'ACADÈMICA NUMERÀRIA
EXCEL·LENTÍSSIMA SRA. DRA. MARÍA LUÍSA GARCÍA

BARCELONA
2026

PÈPTIDS SINTÈTICS EN EL DIAGNÒSTIC DE MALALTIES HUMANES

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmica Corresponent
Il·lustre Sra. Dra. Isabel Haro Villar
Celebrat el dia 28 d'octubre de 2026

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numerària
Excel·lentíssima Sra. Dra. María Luísa García

Barcelona
2026

L'Acadèmia no es fa solidària de les opinions que s'exposen en les publicacions, de les quals és responsable l'autor.

Generalitat de Catalunya
Departament de Salut

Amb la col·laboració del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya

Dipòsit legal: B-18650-2026
GAM DIGITAL

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numerària
Excel·lentíssima Sra. Dra. María Luísa García

Excel·lentíssim Senyor President
de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Senyores i Senyors,

Vull agrair la deferència que ha tingut la Junta de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, en designar-me per a fer la presentació de la Dra. Isabel Haro Villar, Acadèmica Corresponent electa, en aquest acte solemne i protocol·lari d'ingrés en aquesta docta corporació, que em dona l'oportunitat de posar en relleu la seva brillant trajectòria professional.

La Dra. Haro va néixer a Barcelona l'any 1960 i va créixer a l'Hospitalet de Llobregat, en el si d'una família que li va transmetre els valors de l'esforç, del treball ben fet i de la perseverança. El suport constant dels seus pares fou determinant perquè pogués desenvolupar plenament les seves capacitats i afrontar amb confiança els reptes personals i acadèmics. Com a germana gran de tres germanes, va assumir ben aviat responsabilitats que contribuïren a forjar un caràcter basat en el compromís, la constància i el sentit del deure, qualitats que han presidit tota la seva trajectòria personal, acadèmica i professional.

Va cursar els estudis d'educació primària a l'Hospitalet de Llobregat i el batxillerat i el Curs d'Orientació Universitària a Barcelona, on va obtenir un expedient acadèmic brillant, distingit amb la qualificació de Matrícula d'Honor al COU. Aquesta distinció li va permetre cursar els estudis de llicenciatura amb exempció del pagament de les taxes acadèmiques i, durant tots els anys de la carrera universitària, fou beneficiària d'una beca d'estudis en reconeixement al seu excel·lent rendiment acadèmic.

L'any 1982 es va llicenciar en Ciències Químiques per la Universitat de Barcelona, on va obtenir, dos anys més tard, el grau de llicenciatura. El 1984 va obtenir el Certificat d'Aptitud Pedagògica per l'Institut de Ciències de l'Educació i, el 1998, el títol de doctora en Ciències Químiques.

Encara que es va iniciar en la recerca al Departament de Bioquímica de la Universitat de Barcelona, on va realitzar la seva tesina en el camp de la cinètica enzimàtica, la trajectòria científica de la Dra. Haro està lligada al Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). El 1985 es va incorporar al Laboratori de Pèptids del Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC com a becària pre-doctoral del Pla de Formació de Personal Investigador (FPI) per a la realització de la tesi doctoral sobre la síntesi i l'activitat biològica d'anàlegs de la substància P, que va finalitzar el 1988 amb la màxima qualificació d'excel·lent cum laude.

Per continuar la seva formació de recerca, un cop finalitzada la tesi, va realitzar un post-doctorat de dos anys, entre 1989 i 1990, al CSIC i al Royal Free Hospital de Londres amb una beca del CSIC i de l'European Molecular Biology Organization (EMBO). Al llarg d'aquests anys, primer com Científica Titular del CSIC i a partir de 2004 com a Investigadora Científica, la Dra. Isabel Haro va desenvolupar la seva recerca en l'àmbit de la síntesi i caracterització de les propietats i funcions biològiques de molècules bioactives. Les seves qualitats innates per a la investigació, la creativitat, la capacitat de treball i el rigor científic li van permetre desenvolupar i consolidar una nova línia de recerca en la Unitat de Síntesi i Aplicacions Biomèdiques de Pèptids, basada en el paper de les molècules d'origen peptídic en diversos processos fisiològics i les seves potencials aplicacions teranòstiques.

La Dra. Haro, que ha estat coordinadora des de 2017, del grup de recerca consolidat per la Generalitat de Catalunya: Recerca traslacional en disseny i síntesi pel diagnòstic de malalties reumàtiques, és una investigadora de reconegut prestigi a nivell nacional i internacional. Ha participat com a investigadora principal en 15 projectes de recerca finançats per entitats públiques i privades (MINECO, Unió Europea, CSIC, Generalitat de Catalunya, Hospital Clínic de Barcelona i les fundacions La Marató de TV3 i Fundació per a la Recerca i la Pre-

venció de la Sida a Espanya), i ha estat co-investigadora principal d'un assaig clínic multicèntric (PALABA, 2018-2025). Els resultats d'aquestes investigacions es reflecteixen en la seva extensa producció científica, que ha donat lloc a més de 200 publicacions en revistes científiques indexades d'impacte elevat, 7 revisions, 33 capítols de llibre, 23 conferències convidades, més de 60 contribucions en congressos nacionals i 180 en congressos internacionals. A més, ha contribuït significativament a la difusió dels resultats de la recerca a la societat a través de diversos articles de divulgació, notes de premsa i la participació en programes de televisió (com Lab24 de RTVE).

És membre del comitè editorial de la revista Current Medicinal Chemistry des del 2008 i avaluadora de les principals revistes científiques del sector, i va ser membre del comitè científic del XV International Symposium on Luminescence Spectrometry.

En els darrers anys ha supervisat 39 tesis de llicenciatura i treballs d'estudiants de màster, i ha dirigit 16 tesis doctorals —que han merescut la màxima qualificació—, a més de supervisar estudiants d'Erasmus+ i becaris post-doctorals. Aquesta labor ha estat una peça clau en la formació de noves generacions d'investigadors, atès que ha abocat la seva vasta experiència per guiar els estudiants cap a l'excel·lència acadèmica. Aquesta intensa activitat investigadora ha estat reconeguda amb 6 trams de recerca (sexennis) per la Comissió Nacional Avaluadora de l'Activitat Investigadora.

Un pilar fonamental de la seva trajectòria científica és la transferència dels resultats de la recerca al sector industrial. Ha aconseguit que l'excel·lència investigadora es tradueixi en solucions terapèutiques tangibles que impacten directament en el benestar públic, escurçant la distància entre el laboratori i la millora real de la salut ciutadana. En aquest sentit, ha establert contractes de recerca com a IP amb empreses capdavanteres del sector i ha realitzat tasques de suport tecnològic per a diversos grups hospitalaris. A més, té concedides 8 patents (una de les quals a Europa i als Estats Units). Aquesta activitat de transferència ha estat reconeguda amb un sexenni de transferència.

Aquesta important activitat investigadora ha estat reconeguda amb diversos premis, entre els quals cal destacar el Primer Premi Juan José

García Domínguez a la investigació en química, atorgat per la Societat Espanyola de Química Industrial; el Primer Premi Laboratoris Cusí, pel treball Síntesi, encapsulació en liposomes i avaluació immunològica de la seqüència peptídica (110-121) pertanyent a la proteïna VP3 de la càpside del virus de l'hepatitis A, i el Primer Premi Ramón Madroñero, de la Societat Espanyola de Química Terapèutica, pel treball Selecció d'estructures immunoadjuvants per al disseny d'una vacuna d'origen químic contra el virus de l'hepatitis A.

La recerca desenvolupada sobre pèptids en el diagnòstic i pronòstic de l'artritis reumatoide va ser seleccionada per la Plataforma Tecnològica Espanyola de Medicaments Innovadors de Farmaindustria (2013). En aquest camp, la Societat Espanyola de Reumatologia va atorgar el primer premi a la millor publicació sobre artritis reumatoide (2020), publicada a la revista Annals of the Rheumatic Diseases (amb un factor d'impacte de 19,103).

Cal destacar la publicació, aquest mateix any 2026, a la revista Nature Medicine, de la qual la Dra. Haro és autora sènior. Aquesta revista és una referència mundial en biomedicina i compta amb un factor d'impacte de 50 segons el Journal Citation Reports de 2024, publicat el 2025. Més enllà del seu extraordinari valor científic, aquesta publicació constitueix el reconeixement més alt a una trajectòria científica d'excel·lència, construïda al llarg de dècades de treball rigorós, dedicació i compromís amb la recerca biomèdica.

La tasca docent desenvolupada per la Dra. Isabel Haro ha estat centrada en diferents programes de màster i doctorat. Des del 2013 ha dirigit diversos treballs de fi de grau: 10 TFG a la Facultat de Biologia de la UB (en els graus en Biologia, en Biomedicina i en Biotecnologia) i 8 a la Facultat de Química de la UB. A més, des del 1990 ha estat membre de tribunals de tesis doctorals, tesines i màsters presentats a les facultats de Química, Farmàcia i Biologia de les Universitats de Barcelona i Autònoma de Barcelona. El novembre de 2017 va impartir a Madrid el curs de formació a l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris (AEMPS) Pèptids i oligonucleòtids. Síntesi, caracterització. Control d'impureses. En el període 2003-2018 va participar, com a docent, en el curs de doctorat Models de Membrana del programa de doctorat del Departament de Fisicoquímica de la UB; en

el programa de cooperació educativa de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, i en un conveni de col·laboració per a la formació pràctica en centres de treball amb el Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya (amb alumnes de l'Escola Industrial i de l'Institut d'Educació Secundària Arquitecte Manuel Raspall).

A més de la trajectòria de docència i recerca, el compromís de la Dra. Haro amb les institucions la va portar a desenvolupar una intensa tasca de gestió, fonamental per al correcte funcionament i desenvolupament del Centre. Ha estat directora del Departament de Química de Pèptids i Proteïnes de l'IIQAB-CSIC (2006) i vice-directora de l'IQAC-CSIC des del març del 2019 fins al desembre del 2020. Ha estat membre de la Comissió d'Àrea de Ciències i Tecnologies Químiques del CSIC entre el 2012 i el 2018, del Comitè Executiu de la Connexió Nanomedicina-CSIC del 2021 al 2023 i del Comitè de Direcció de l'IQAC-CSIC del 2016 al 2022, essent actualment membre del Comitè d'Ètica de l'IQAC-CSIC. Cal destacar la seva participació com a membre de la comissió d'experts de projectes de l'Àrea de Ciències i Tecnologies Químiques del Pla Nacional, de projectes de Prova de Concepte del Pla Nacional del Ministeri (PDC-2021-2023) i de projectes de consolidació investigadora (CNS-2022). És avaluadora de l'Agència Estatal d'Investigació des del 2006 i de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya des del 2005. Ha estat avaluadora de projectes FONDECYT de Xile, FONCYT d'Argentina i de projectes de tesi de la Universitat Nacional de Colòmbia.

La trajectòria de la Dra. Haro no es pot entendre sense el suport de la seva família, que ha estat un estímul i un referent constant al llarg de la seva vida. Els seus pares, que des de ben petita li van inculcar els valors que han orientat la seva vida personal i professional, li han brindat sempre un suport incondicional. Juntament amb el seu marit, Guillermo, han estat el seu principal punt de suport i li han donat la confiança i la serenitat necessàries per afrontar els reptes personals i professionals. També, les seves germanes, dedicades a la docència, han compartit amb ella el compromís amb el coneixement i l'educació. Avui, aquesta vocació per la ciència i el coneixement té continuïtat en els seus fills, Guillem i Irene, tots dos científics i docents, i comença a projectar-se en una nova generació amb l'arribada del

seu net, Roger. Aquesta continuïtat familiar constitueix, sens dubte, una de les satisfaccions més grans d'una vida dedicada al servei de la ciència, de la Universitat i de la societat.

En aquesta breu presentació de la trajectòria professional de la Dra. Haro, ha quedat palès que té mèrits més que suficients per ser admesa com a acadèmica corresponent d'aquesta Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya i tinc la seguretat que sabrà correspondre a l'honor que li atorga l'Acadèmia, enriquint-la amb la seva experiència científica i professional i amb el seu saber-fer. És per això que, una vegada hagi llegit el discurs reglamentari, demano al Excm. Sr. President que tingui a bé d'imposar a la Dra. Isabel Haro la medalla i l'estola així com, de lliurar-li el títol acreditatiu d'acadèmica corresponent d'aquesta corporació.

Moltes gràcies

ÍNDEX

Pròleg 13

1. Introducció 19

2. Del diagnòstic clínic clàssic al diagnòstic molecular: la necessitat de biomarcadors sensibles i específics 19

3. Biomolècules en diagnòstic: aplicacions i limitacions 21

4. Fonaments dels pèptids sintètics 22
4.1. Pèptids lineals i pèptids cíclics 23
4.2. Epítops lineals i epítops conformacionals 24

5. Síntesi química de pèptids 25
5.1. Síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS) 27
5.2. Purificació de pèptids sintètics 29
5.3. Control de qualitat 29

6. Estabilitat i biodisponibilitat dels pèptids. Modificacions químiques 30
6.1. Estratègies de millora de l'estabilitat i la biodisponibilitat dels pèptids sintètics 30
6.1.1. Modificacions de la cadena. Incorporació de D-aminoàcids ... 30
6.1.2. Ciclació de pèptids 31
6.1.3. Conjugación amb polímers. PEGilació 31
6.1.4. Conjugació amb lípids 32
6.1.5. Nanocarriers per a l'administració de pèptids 32

7. Plataformes tecnològiques basades en pèptids 33
7.1. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) basat en pèptids 34
7.2. Microarrays peptídics 35
7.3. Tests ràpids basats en pèptids (lateral flow assays, LFA) ... 36
7.4. Pèptids sintètics en diagnòstic per la imatge (Positron Emission Tomography, PET i Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) 36

8. Aplicacions clíniques de pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties. 37
8.1. Diagnòstic de malalties infeccioses 37
8.2. Diagnòstic en oncologia 40
8.3. Diagnòstic de malalties neurodegeneratives 42
8.4. Diagnòstic de malalties autoimmunes 43

9. Implicacions de les modificacions post-traduccionals en l'autoimmunitat: paper de la citrul·linació, l'homocitrul·linació i l'acetilació en la patogènesi, el diagnòstic i el pronòstic de l'artritis reumatoide 45

10. Avantatges, limitacions i reptes dels pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties humanes 50
10.1. Avantatges principals 51
10.2. Limitacions tècniques 52
10.3. Reptes clínics i translacionals 53

11. Conclusions i perspectives futures 53

12. Referències 55

Excel·lentíssim Senyor President
de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Senyores i Senyors,

Vull dedicar les primeres paraules del meu discurs d'ingrés com a acadèmica corresponent adscrita a la Secció 1a (Química, Física i Ciències de la Terra), a expressar el meu més sincer agraïment a aquesta prestigiosa Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya per acollir-me i dipositar la seva confiança en la meva persona. De manera especial, voldria agrair als acadèmics numeraris que han promogut la meva candidatura, la Dra. Maria Lluïsa García, el Dr. Joan Bech i el Dr. Oriol Valls, així com als molt il·lustres acadèmics que han tingut a bé donar suport a aquesta proposta. A tots ells, els expresso el més profund reconeixement pel seu suport. Aquest nomenament representa per a mi un gran honor, i assumeixo el compromís de correspondre-hi amb la màxima professionalitat, rigor i dedicació.

Els principals objectius científics que han vertebrat la meva trajectòria investigadora s'inscriuen en l'àmbit de la síntesi, la caracterització i l'estudi de les propietats i funcions biològiques de molècules bioactives. D'una manera més específica, la meva tasca s'ha orientat a aprofundir en el paper de les molècules d'origen peptídic en diversos processos fisiològics i, conseqüentment, en la valoració de les seves potencials aplicacions diagnòstiques i terapèutiques. En aquest sentit, els diversos projectes de recerca en què he participat al llarg de més de quaranta anys de trajectòria professional, han estat centrats tant en el disseny i la síntesi química de pèptids amb activitat biològica com en el desenvolupament de les formes d'administració més adients.

És, sens dubte, impossible fer esment de totes les persones amb qui he tingut el privilegi d'establir col·laboracions científiques, tant en l'àmbit estatal com internacional, i que han contribuït de manera decisiva

i valuosa al desenvolupament dels projectes que he liderat o en els que he participat, amb una marcada vocació multidisciplinària dins l'àmbit biomèdic. A totes elles els dec una part molt significativa del camí recorregut.

En aquest recorregut, no puc deixar de recordar les meves primeres passes en el món de la recerca al Departament de Bioquímica de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, on vaig obtenir la Llicenciatura en Química i allà on es va despertar la meva vocació científica. Recordo amb nostàlgia el mestratge dels Drs. Bozal i Cortés i les bones estones compartides amb els estudiants que en aquell temps fèiem la Tesina al Department.

Posteriorment, vaig dur a terme la meva Tesi Doctoral al Laboratori de Pèptids del Centre d'Investigació i Desenvolupament del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), sota la direcció de la Dra. Francesca Reig. A ella li vull expressar el meu més sincer agraïment per acollir-me al seu grup de recerca i per introduir-me en el mon dels pèptids. Així mateix, la presència i el suport constant de la Dra. Maria Asunción Alsina, una investigadora incansable i un referent en la Facultat de Farmàcia, van ser determinants al llarg d'aquells anys. Igualment, voldria fer extensiu aquest agraïment a totes les persones amb qui vaig tenir l'oportunitat de compartir no només la tasca científica, sinó també molt bons moments tant dins com fora del laboratori, i que han deixat una empremta inesborrable.

Tota la meva carrera científica l'he desenvolupat al CSIC. Per la Unitat de Síntesi i Aplicacions Biomèdiques de Pèptids, grup de recerca que he tingut l'honor de liderar, hi han passat nombrosos estudiants de màster, pre-doctorals i post-doctorals, investigadors i col·laboradors; tots ells fonamentals en la construcció del projecte científic compartit. Tanmateix, no puc deixar de reconèixer de manera molt especial la valuosa i decisiva contribució de la Dra. Maria José Gómara, una de les meves primeres estudiants de doctorat i, des de fa més de trenta anys, investigadora del grup amb qui he tingut el privilegi de treballar colze a colze. La seva constància, rigor científic, capacitat de treball i compromís inqüestionable han estat determinants en la consolidació i continuïtat de la nostra línia de recerca. Sense la seva dedicació i excel·lència professional, difícilment es podrien entendre molts dels assoliments del grup

al llarg d'aquests anys. Li vull expressar, per tant, el meu més profund i sincer agraïment per la seva extraordinària tasca i per la seva inestimable contribució, tant en l'àmbit professional com en l'humà.

Entre les diverses línies de recerca en què he treballat al llarg de la meva trajectòria científica, vull destacar especialment l'obtenció de biosensors peptídics amb aplicació en el desenvolupament de nous mètodes de diagnòstic i pronòstic de l'artritis reumatoide, línia en la qual la col·laboració amb el Dr. Raimon Sanmartí, de la Unitat d'Artritis de l'Hospital Clínic, ha estat absolutament clau. Recordo amb especial emoció el nostre primer projecte compartit, en el marc de La Marató de TV3, l'any 2002. Han passat molts anys des de llavors; hem treballat conjuntament en nombrosos projectes, hem publicat molts articles i, sobretot, hem consolidat una col·laboració científica continuada en el temps i una sòlida amistat. Gràcies a la visió integradora d'en Raimon, molts dels resultats de la nostra recerca amb pèptids han pogut assolir una translació real i tangible, contribuint a la millora de protocols diagnòstics i a l'impuls de noves línies d'investigació. En aquest context, no puc deixar de fer esment de l'assaig clínic PALABA, en el qual he tingut l'oportunitat de participar, experiència que vull agrair sincerament al Dr. Sanmartí per haver-me-la brindat. Ha estat, sens dubte, un veritable privilegi poder formar part d'aquest projecte, així com de la publicació que se'n va derivar a la prestigiosa revista científica *Nature Medicine*.

Per finalitzar, vull expressar el meu més profund agraïment a la meva família. Als meus pares, que sempre m'ho van donar tot, per haver estat un veritable exemple per mi i una guia al llarg del camí de la vida que he recorregut. No podria haver tingut uns pares millors. A les meves germanes, Núria i Belén, pel seu suport incondicional i pels moments compartits al llarg dels anys. Als meus fills, Guillem i Irene, per l'alegria i l'orgull que representa per a mi ser la vostra mare. Al meu net, Roger, que em regala felicitat amb cada somriure. I, finalment, a en Guillermo, per haver estat sempre al meu costat, en tots els moments. Gràcies per ser-hi sempre. Tots ells han estat, i continuen essent, el meu suport més ferm i el meu referent més essencial, sense el qual res del que he assolit no hauria estat possible.

Moltes gràcies a tots.

PÈPTIDS SINTÈTICS EN EL DIAGNÒSTIC DE MALALTIES HUMANES

1. Introducció

El diagnòstic primerenc i precís de les malalties humanes constitueix un dels pilars fonamentals de la medicina moderna. En les darreres dècades, el progrés de la biologia molecular i la bioquímica ha permès una transició gradual des del diagnòstic basat exclusivament en els símptomes clínics i les proves histopatològiques, cap a estratègies centrades en la detecció de biomarcadors moleculars. Aquest canvi ha estat impulsat per la necessitat d'augmentar la sensibilitat diagnòstica, reduir el temps de resposta i permetre una millor estratificació dels pacients. En aquest context, les biomolècules utilitzades tradicionalment en diagnòstic, com ara anticossos monoclonals, proteïnes recombinants o àcids nucleics han demostrat una gran utilitat, però també presenten limitacions inherents que estan relacionades amb el cost de producció, l'estabilitat, la variabilitat entre lots i la complexitat estructural. Aquestes limitacions han estimulat la recerca de molècules alternatives que puguin oferir una combinació òptima d'especificitat, estabilitat i facilitat de producció. Els pèptids sintètics han emergit com una d'aquestes alternatives prometedores. Gràcies a la seva naturalesa modular i al control precís que ofereix la síntesi química, permeten reproduir regions funcionals específiques de proteïnes naturals, especialment epítops reconeguts pel sistema immunitari. A més, la possibilitat d'introduir modificacions químiques a les seqüències, de manera racional, amplia considerablement el seu potencial com a eina diagnòstica.

2. Del diagnòstic clínic clàssic al diagnòstic molecular: la necessitat de biomarcadors sensibles i específics

El diagnòstic clínic clàssic està basat principalment en l'anamnesi, l'exploració física i l'ús de proves complementàries convencionals, com són les determinacions bioquímiques, l'estudi histopatològic i les tècniques d'imatge. Tot i la seva utilitat indiscutible, aquest presenta importants limitacions en les fases inicials de la malaltia, quan els signes clínics són absents, poc específics o compartits amb altres patologies.

Els avenços en biologia molecular i el desenvolupament de tecno-

logies d'anàlisi a gran escala han impulsat una transició progressiva cap al diagnòstic molecular, el qual permet caracteritzar les malalties a partir de les seves alteracions genètiques, transcriptòmiques, proteòmiques o metabolòmiques. Aquest nou paradigma facilita una comprensió més profunda dels mecanismes fisiopatològics implicats i possibilita la detecció primerenca dels processos patològics abans de la seva manifestació clínica, així com una classificació més precisa de les malalties (1).

En aquest context, els **biomarcadors** moleculars adquireixen un paper central. Un biomarcador es defineix com *una característica que es mesura i avalua objectivament com a indicador de processos biològics normals, processos patogènics o respostes farmacològiques a una intervenció terapèutica*. Aquesta definició de biomarcador va sorgir de la conferència de consens de la *Food and Drug Administration* (FDA) dels Estats Units i els Instituts Nacionals de Salut, a l'abril de 1999 (2). Per tal que un biomarcador sigui clínicament rellevant, és imprescindible que presenti una elevada sensibilitat, la qual permeti detectar la malaltia en estadis primerencs minimitzant els falsos negatius, i una alta especificitat; es a dir, que garanteixi la correcta discriminació entre individus sans i afectats, així com entre patologies amb manifestacions clíniques similars. La necessitat de biomarcadors sensibles i específics és particularment important en àrees com són l'oncologia, les malalties neurodegeneratives i autoimmunes i les patologies rares, on el retard en el diagnòstic pot tenir conseqüències clíniques greus i irreversibles. En oncologia, per exemple, la identificació d'alteracions moleculars específiques ha permès no només un diagnòstic més precoç, sinó també l'estratificació dels pacients i la selecció de teràpies dirigides (3). A més, els biomarcadors moleculars són essencials per al desenvolupament de la medicina de precisió, ja que permeten predir la resposta als tractaments, monitoritzar l'evolució de la malaltia i ajustar les estratègies terapèutiques més adequades, segons el perfil molecular individual del pacient (4). Tanmateix, la seva aplicació en clínica requereix processos rigorosos de validació analítica i clínica, així com una avaluació del seu impacte real en la pràctica assistencial.

Així doncs, el pas del diagnòstic clínic clàssic al diagnòstic molecular representa una evolució conceptual i tecnològica cap a una medicina

més precisa, predictiva i personalitzada. El desenvolupament i la validació de biomarcadors moleculars amb alta sensibilitat i especificitat és un repte clau per tal de millorar el diagnòstic primerenc, optimitzar la presa de decisions clíniques i, en última instància i el que és més important, millorar la salut i la qualitat de vida dels pacients.

3. Biomolècules en diagnòstic: aplicacions i limitacions

Les proteïnes recombinants, els anticossos monoclonals i els àcids nucleics són les principals eines moleculars emprades, en el diagnòstic clínic actual, per a la detecció i el seguiment de les malalties (5).

Les proteïnes recombinants permeten disposar d'antígens i receptors altament definits pel desenvolupament d'immunoassaigs sensibles i específics, com són les tècniques d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), els tests ràpids o els biosensors. Els seus principals avantatges són l'elevada reproductibilitat i puresa, la disponibilitat a gran escala i la reducció del risc biològic associat a l'ús dels patògens complets. Tanmateix, la seva aplicabilitat diagnòstica es pot veure limitada per la manca de modificacions post-traduccionals en els sistemes d'expressió, que pot afectar el plegament correcte de la proteïna i, per tant, generar epítops amb una antigenicitat diferent a la de la proteïna nativa, fet que tindria impacte en la sensibilitat i especificitat dels immunoassaigs (6).

Els **anticossos monoclonals** proporcionen una gran especificitat i afinitat per la detecció de dianes proteiques en formats molt diversos (immunoassaigs en fase sòlida, immunohistoquímica, immunofluorescència o immunocromatografia de flux lateral). Presenten una elevada especificitat i afinitat, el que permet una detecció molt precisa dels biomarcadors, fins i tot en concentracions molt baixes. No obstant això, la producció, caracterització i validació d'anticossos monoclonals és un procés llarg i costós, que requereix un rigorós control de qualitat (7).

Les tècniques basades en **àcids nucleics (ADN i ARN)** han revolucionat el diagnòstic clínic, ja que permeten detectar directament, mitjançant estratègies d'amplificació, seqüenciació massiva i hibridació

molecular, el material genètic associat a patògens, mutacions o alteracions d'expressió gènica, amb una sensibilitat i especificitat molt superiors als mètodes convencionals. D'aquesta forma es redueix el temps de resposta i s'incrementa la precisió diagnòstica (8). Malgrat els avantatges, el seu ús es pot veure limitat per la necessitat d'un equipament especialitzat, de personal altament qualificat i de protocols de treball molt estrictes que evitin contaminacions, ja que podrien generar falsos positius o resultats poc reproduïbles.

Així doncs, tot i els avenços tan significatius que han estat assolits els darrers anys, aquestes estratègies moleculars presenten les limitacions abans indicades, fet que ha estimulat la recerca d'altres molècules alternatives, més simples però que mantinguin l'eficàcia funcional; es a dir, que siguin capaces de preservar la informació molecular essencial que és necessària pel reconeixement biològic. En aquest escenari és on emergeixen els **pèptids sintètics**.

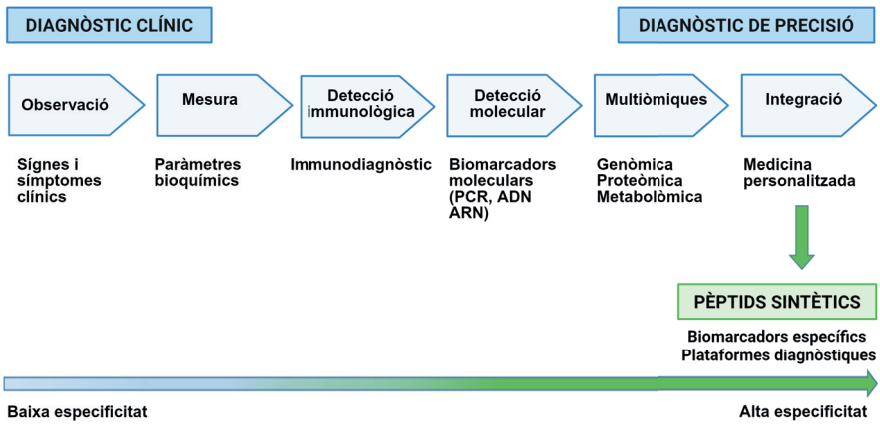


Figura 1. Evolució conceptual del diagnòstic clínic al diagnòstic molecular (imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com)

4. Fonaments dels pèptids sintètics

Els pèptids són biopolímers formats per cadenes curtes d'aminoàcids (entre 2 i 50 aminoàcids), que generalment s'obtenen per síntesi quí-

mica, principalment per processos de síntesi en fase sòlida; una metodologia que va ser desenvolupada pel Professor Merrifield a la dècada dels 60 (9). A diferència dels pèptids obtinguts per tècniques recombinants, els pèptids sintètics permeten un control precís de la seqüència i es poden dur a terme modificacions químiques a la mateixa, fet que els converteix en eines fonamentals per a la recerca biomèdica. En la pràctica experimental i en la clínica s'utilitzen majoritàriament pèptids curts, d'entre 10 i 30 residus d'aminoàcids, ja que aquests solen proporcionar un bon equilibri entre especificitat funcional, facilitat de síntesi i cost de producció.

Els pèptids sintètics es poden classificar segons diversos criteris, incloent-hi característiques estructurals, funció biològica o modificacions químiques a les seqüències peptídiques. Una de les classificacions més habituals distingeix entre pèptids lineals i pèptids cíclics, atès que aquesta diferència estructural té un impacte directe sobre l'estabilitat, la flexibilitat, la conformació i l'activitat biològica dels pèptids. Específicament, dins l'àmbit de la immunologia podríem distingir entre pèptids com a epítops lineals o conformacionals i d'altra banda, es poden també classificar segons la presència d'aminoàcids no naturals o enllaços químics modificats dins la seva estructura primària, característiques que són especialment rellevants en el disseny i síntesi de pèptids amb aplicacions farmacològiques.

4.1. Pèptids lineals i pèptids cíclics

Els **pèptids lineals** estan formats per cadenes d'aminoàcids que es troben units mitjançant enllaços amida, també anomenats enllaços peptídics, amb els extrems amino-terminal i carboxi-terminal de la seqüència en forma lliure. Aquesta estructura els confereix una elevada flexibilitat conformacional; no obstant això, aquesta flexibilitat també comporta una major susceptibilitat a la degradació pels enzims proteolítics o proteases, la qual cosa limita l'estabilitat i la vida mitjana dels pèptids lineals *in vivo*.

Els **pèptids cíclics** es caracteritzen per la presència d'un enllaç covalent que tanca la cadena peptídica, principalment mitjançant un enllaç amida que s'estableix entre els extrems amino- i carboxi-terminals,

però també, una altra estratègia força habitual és generar el cicle a través de ponts disulfur formats entre residus de cisteïna que es troben a l'estructura primària del pèptid. La ciclació redueix significativament la flexibilitat conformacional i contribueix a estabilitzar l'estructura tridimensional del pèptid. Com a conseqüència, els pèptids cíclics presenten una major resistència a la degradació enzimàtica i, sovint, una afinitat més elevada per les seves dianes moleculars.

4.2. Epítops lineals i epítops conformacionals

Un epítop, també denominat determinant antigènic, es defineix com *la regió específica d'un antigen que és reconeguda per un anticòs o per un receptor de cèl·lules T*. L'estudi dels epítops és essencial per comprendre el reconeixement immune i per al desenvolupament de vacunes i eines diagnòstiques, àmbits en què els pèptids sintètics tenen un paper molt rellevant (10, 11).

Els **epítops lineals** són aquells que estan formats per aminoàcids que es troben contigus dins de la seqüència de la proteïna i que poden ser reconeguts independentment de l'estat de plegament d'aquesta. Els pèptids sintètics lineals, amb longituds d'entre 8 i 15 aminoàcids, solen ser útils per a obtenir epítops lineals, els quals són àmpliament emprats en els assaigs immunològics tipus ELISAs.

Els **epítops conformacionals** estan constituïts per seqüències d'aminoàcids no contigües, procedents de diferents seqüències peptídiques que es solapen en plegar-se tridimensionalment l'estructura proteica. Identificar amb precisió els epítops conformacionals d'estructures proteiques complexes és essencial en el desenvolupament de noves vacunes. En aquest sentit, els mètodes tradicionals, com és la cristallografia de raigs X, proporcionen dades precises; malgrat això, són costosos i requereixen molt de temps de treball. Això ha comportat l'auge dels mètodes computacionals per tal de predir els epítops (12). És important tenir en compte però, que l'obtenció d'epítops conformacionals, mitjançant pèptids sintètics, és més complexa i sovint requereix diverses estratègies químiques destinades a estabilitzar una conformació específica, com són la ciclació del pèptid o el disseny de *peptidomimètics*. Aquests darrers són molècules peptídiques disse-

nyades per imitar l'estructura i la funció biològica dels pèptids, incorporant aminoàcids no naturals, enllaços químics modificats o esquelets moleculars alternatius (13).

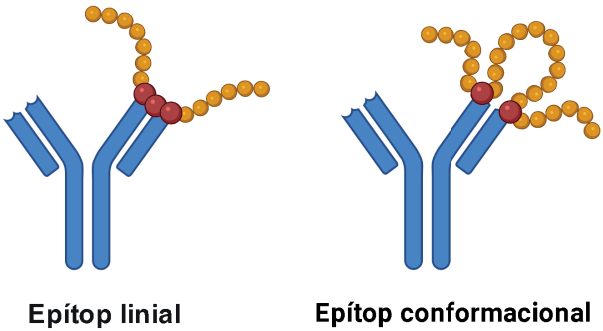


Figura 2. Representació esquemàtica dels diferents epítops o determinants antigènics
(imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com)

5. Síntesi química de pèptids

La història de la química de pèptids es va iniciar a principis del segle XX quan Emil Fisher, a qui va ser concedit el Premi Nobel de Química l'any 1902, va obtenir per síntesi química el pèptid més senzill, el dipèptid glicil-glicina (Gly-Gly), fet que va constituir la primera formació d'un enllaç peptídic al laboratori. Fisher va demostrar que els aminoàcids podien unir-se químicament per formar estructures similars a les proteïnes naturals, establint les bases conceptuals de la química de pèptids (14).

El segon període històric es situa entre les dues guerres mundials, ja que va ser en aquest període quan van ser descoberts pèptids amb un gran interès farmacològic, com és la insulina. També es va introduir el primer grup protector de funcions amines, el carbobenzoxi (*abreviat com a Cbz o Z*), d'una importància crucial per a dur a terme els processos sintètics de forma més dirigida, establint-se així la primera

estratègia sistemàtica ortogonal de protecció/desprotecció en la síntesi de pèptids (15). Aquest concepte d'ortogonalitat química esdevingué essencial pel desenvolupament de metodologies sintètiques més complexes.

El període situat entre els anys 50 i 80 va ser especialment productiu, ja que, d'una banda, Vincent du Vigneaud aconseguí la primera síntesi total d'una hormona peptídica, l'oxitocina, un nonapèptid amb un pont disulfur intramolecular; demostrant així la viabilitat de sintetitzar pèptids que són biològicament actius (16), fet pel qual se li va concedir el Premi Nobel en Química l'any 1955. A aquests treballs els va seguir l'anàlisi estructural i la síntesi de nombroses hormones peptídiques i factors reguladors, com ara la calcitonina, la insulina o l'hormona paratiroïdal, consolidant-se la síntesi peptídica com una eina clau en bioquímica i medicina.

Especialment important va ser la introducció d'un nou concepte metodològic per a la síntesi de pèptids, que va revolucionar aquest camp: la **síntesi de pèptids en fase sòlida** (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS). Aquest gran salt tecnològic va ser desenvolupat per Bruce Merrifield (9), investigador a qui, després de la seva molt productiva carrera, se li va concedir el Premi Nobel en Química l'any 1984.

Durant els anys següents, nombrosos investigadors de tot el món van reportar a la literatura científica valuoses aportacions, que van contribuir al desenvolupament d'aquest procés químic tan innovador. Sense pretendre ser exhaustiva, es podrien citar com algunes de les contribucions més significatives les següents: 1) Carpino i Han introdueixen un nou grup protector, el 9-fluorenilmetoxicarbonil (*Fmoc*), que va permetre dissenyar una nova estratègia sintètica en fase sòlida, basada en els grups protectors Fmoc/tBu, la qual ha esdevingut el mètode estàndard per la SPPS, donada la seva ortogonalitat i condicions suaus de desprotecció (17); 2) Al llarg dels anys 80, diversos investigadors van desenvolupar resines millorades per dur a terme el procés de síntesi en fase sòlida i així se'n descriuen diverses de les que avui dia es troben comercialitzades (18, 19); 3) Es important assenyalar també, les aportacions realitzades per James Tam en el camp dels pèptids ramificats o MAPs (*Multiple Antigenic Peptides*) que han estat emprats, principalment, en la millora d'antígens peptídics amb

aplicació en el disseny de vacunes sintètiques (20); 4) Als anys 90 s'implementen metodologies per la síntesi ràpida de llibreries peptídiques, revolucionant el camp de la recerca d'antígens peptídics en permetre l'exploració sistemàtica de grans repertoris de seqüències i la identificació d'epítops amb rellevància diagnòstica (21).

5.1. Síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS)

La síntesi en fase sòlida de pèptids és la metodologia més utilitzada per a l'obtenció de pèptids sintètics. El concepte és relativament simple; l'àcid carboxílic de l'aminoàcid C-terminal de la seqüència s'uneix covalentment a un suport polimèric insoluble (*també conegut com a resina*), sobre el qual es van incorporant successivament els aminoàcids següents, mitjançant cicles repetitius de desprotecció del grup amino del aminoàcid ja incorporat i l'acoblament del següent aminoàcid, convenientment protegit i activat. En la SPPS, els grups reactius dels aminoàcids trifuncionals es protegeixen temporalment per evitar reaccions no desitjades. Les dues estratègies de protecció més utilitzades són la química Boc (*tert-butiloxicarbonil*) i, majoritàriament, la química Fmoc (*9-fluorenilmetoxicarbonil*), la qual permet una desprotecció suau en condicions bàsiques i és compatible amb una àmplia varietat de grups protectors dels aminoàcids trifuncionals (22, 23).

Aquest procés iteratiu es repeteix fins que es completa la síntesi de la seqüència peptídica desitjada. Finalment, es desancora el pèptid de la resina i, simultàniament, s'alliberen els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids. Un dels principals avantatges de la SPPS és que els subproductes i reactius emprats en excés es poden eliminar fàcilment mitjançant rentats, fet que simplifica el procés i permet automatitzar-lo. Aquesta característica ha fet possible la síntesi ràpida i eficient de pèptids amb un alt grau de reproductibilitat.

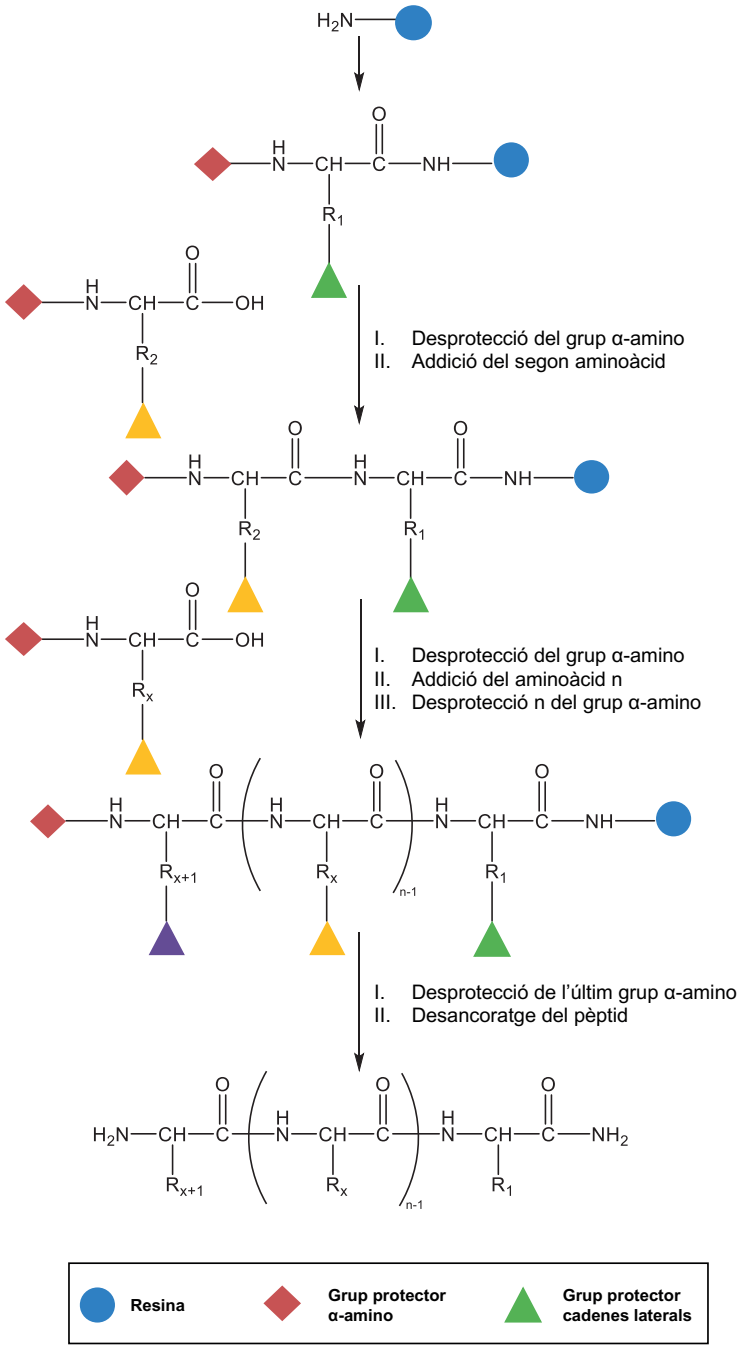


Figura 3. Esquema general del procediment de la síntesi en fase sòlida de pèptids

5.2. Purificació de pèptids sintètics

Un cop finalitzada la síntesi i desancorat el pèptid de la resina, el producte obtingut (*anomenat cru peptídic*) sol contenir impureses que deriven de reaccions incompletes, truncaments de cadena o modificacions de les cadenes laterals no desitjades. Per aquest motiu, la purificació és una etapa crítica en l'obtenció de pèptids sintètics.

La tècnica de purificació més emprada és la cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase reversa (*Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC), que permet separar els pèptids en funció de la seva hidrofobicitat (24). Altres estratègies de purificació inclouen la cromatografia d'intercanvi iònic, la cromatografia d'exclusió molecular i, en casos més específics, la precipitació selectiva o la ultrafiltració. L'elecció del mètode depèn de la longitud del pèptid, de les seves propietats fisicoquímiques i de l'aplicació final requerida.

5.3. Control de qualitat

El control de qualitat és essencial per garantir la identitat, la puresa i la funcionalitat dels pèptids sintètics, especialment quan es destinen a aplicacions biològiques o clíniques. Aquest control inclou, habitualment, una combinació de tècniques analítiques que són complementàries.

La determinació de la massa molecular mitjançant espectrometria de masses, per MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) o per ESI-MS (*ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry*), permet confirmar la identitat del pèptid sintetitzat (25). Paral·lelament, la RP-HPLC analítica s'utilitza per avaluar el grau de puresa i detectar possibles impureses. En funció de l'aplicació, també es poden emprar tècniques addicionals, com són l'anàlisi d'aminoàcids o la ressonància magnètica nuclear o també assaigs funcionals *in vitro*. L'ús de totes aquestes tècniques assegura que el pèptid compleix els requisits de qualitat necessaris per a la seva utilització posterior en recerca o en el seu desenvolupament terapèutic.

6. Estabilitat i biodisponibilitat dels pèptids. Modificacions químiques

Els pèptids tenen un elevat potencial tant diagnòstic com terapèutic, donada l'alta especificitat i la baixa toxicitat que presenten. No obstant això, la seva aplicació en clínica es veu limitada per una baixa estabilitat química i una biodisponibilitat reduïda (26, 27).

La biodisponibilitat dels pèptids està condicionada per diversos factors, incloent-hi la susceptibilitat a enzims proteolítics, la baixa permeabilitat a través de membranes biològiques i la ràpida eliminació renal, fets que determinen que aquests presentin una vida mitjana curta en la circulació sistèmica. D'altra banda, la degradació proteolítica és també un dels principals obstacles per a l'ús de pèptids com a fàrmacs. En l'organisme, proteases com són la pepsina o la tripsina, que es troben presents principalment al tracte gastrointestinal, hidrolitzen els enllaços peptídics i degraden ràpidament els pèptids quan aquests són administrats per via oral, donant lloc a fragments inactius. Així mateix, les proteases plasmàtiques contribueixen també a una ràpida degradació sistèmica, després de l'administració parenteral. Es per això que la majoria dels pèptids requereixen d'una administració intravenosa o subcutània.

Considerant doncs les característiques intrínseques dels pèptids, la seva aplicació en biomedicina sovint requereix la incorporació de modificacions químiques en l'estructura, per tal d'optimitzar els aspectes relacionats amb l'estabilitat, la biodisponibilitat o el *direccionament* a dianes específiques (28).

6.1. Estratègies de millora de l'estabilitat i la biodisponibilitat dels pèptids sintètics

6.1.1. Modificacions de la cadena. Incorporació de D-aminoàcids

Les modificacions de la cadena principal són les que habitualment s'utilitzen per tal de millorar l'estabilitat proteolítica dels pèptids. Les

aproximacions més comuns inclouen la substitució de L-aminoàcids per D-aminoàcids, la inserció d'aminoàcids N-alquilats i la incorporació de β-aminoàcids, α-aminoàcids substituïts en α ó α-aminoàcids substituïts en posició β. La substitució d'aminoàcids L per D-aminoàcids és una estratègia eficient per tal de protegir els pèptids de la degradació per proteases, ja que aquests enzims reconeixen només els isòmers L. Tanmateix, una simple substitució de tots els L-aminoàcids per D-aminoàcids no sol ser del tot eficaç, donat que, freqüentment, la conformació del pèptid resultant no representa la geometria correcta d'unió als receptors. En aquest sentit, la *retroinversió*, on tots els L-aminoàcids es substitueixen per D-aminoàcids però l'ordre de la seqüència també s'inverteix, pot ajudar a restaurar l'activitat dels pèptids D (29).

6.1.2. Ciclació de pèptids

La formació de pèptids cíclics és una estratègia utilitzada freqüentment per tal de millorar l'estabilitat dels anàlegs peptídics lineals. Generalment, els pèptids cíclics presenten una millor estabilitat *in vitro i in vivo,* degut a que la restricció conformacional generada amb la ciclació sol incrementar la resistència a proteases i, en certs casos, també pot millorar l'afinitat de la unió del pèptid als seus receptors biològics.

La ciclació es du a terme mitjançant diverses estratègies químiques, que consisteixen en la formació d'un enllaç covalent intramolecular que es pot establir entre les cadenes laterals dels aminoàcids trifuncionals, entre els extrems amino- o carboxi-terminals del pèptid i la cadena lateral d'un aminoàcid trifuncional i també entre els extrems amino- i carboxi-terminal del pèptid (*ciclació "cap-cua"*) (30).

6.1.3. Conjugación amb polímers. PEGilació

Una altra estratègia efectiva per tal de millorar l'estabilitat, la vida mitjana *in vivo* i també reduir la immunogenicitat dels pèptids sintètics, és la seva conjugació a polímers. La forma més comú és la PEGilació, que consisteix en la conjugació a polietilenglicol, un polímer sintètic hidrofílic format per unitats repetides d'òxid d'etilè, que no és tòxic ni immunogènic, és biocompatible i està aprovat per la FDA. La

PEGilació ha demostrat ser útil per a l'optimització de les biomolècules, millorant-ne l'estabilitat, la vida mitjana plasmàtica, la solubilitat i el perfil farmacocinètic global dels pèptids sintètics (31).

6.1.4. Conjugació amb lípids

La conjugació amb lípids és una altra estratègia eficaç per millorar les propietats farmacocinètiques dels pèptids. La unió covalent de cadenes lipídiques a les seqüències peptídiques incrementa la hidrofobicitat, afavoreix la unió a l'albúmina plasmàtica i redueix la filtració renal, el que es tradueix en una prolongació de la vida mitjana circulant. A més, la lipidació pot augmentar l'estabilitat davant la degradació proteolítica i millorar també la interacció amb membranes cel·lulars, afavorint d'aquesta manera la biodisponibilitat dels pèptids. La forma més habitual i més simple de preparació de lipopèptids consisteix en la conjugació en fase sòlida del grup carboxil terminal de l'àcid gras amb el grup amino terminal del pèptid, mitjançant la formació d'un enllaç amida (32).

6.1.5. Nanocarriers per a l'administració de pèptids

Paral·lelament, els *nanocarriers* han emergit com una plataforma prometedora per a l'administració de pèptids. Sistemes com són els liposomes, les nanopartícules polimèriques, les micel·les o les nanopartícules lipídiques permeten encapsular els pèptids, protegint-los de la degradació enzimàtica i millorant-ne, d'una banda, l'estabilitat sistèmica i, d'altra banda, modulant-ne el seu alliberament. Addicionalment, la superfície dels nanosistemes pot ser funcionalitzada amb lligands que afavoreixin el *targeting* cel·lular, incrementant d'aquesta manera l'eficàcia terapèutica i reduint els efectes adversos sistèmics (33).

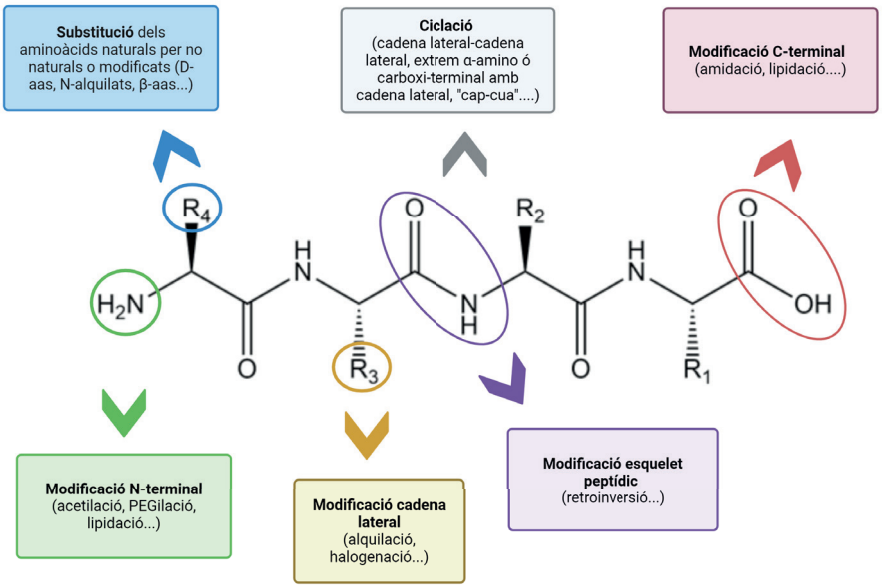


Figura 4. Estratègies de millora de l'estabilitat i la biodisponibilitat dels pèptids sintètics
(imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com)

7. Plataformes tecnològiques basades en pèptids

Les plataformes tecnològiques basades en pèptids han adquirit una importància creixent en diagnòstic, en recerca biomèdica i en el desenvolupament de biosensors. Aquestes, reconeixen anticossos específics induïts per les proteïnes senceres, però utilitzant fragments curts de pèptids seleccionats, que són aquells que contenen els determinants antigènics o epítops més potents. L'èxit d'aquest enfoc depèn de la mesura en què els pèptids sintètics siguin capaços d'imitar els epítops immunodominants dels antígens proteics.

En comparació amb les proteïnes completes, els pèptids ofereixen certs avantatges com són un control precís de la seqüència sota estudi, una reducció de la reactivitat creuada, una major reproductibilitat,

l'absència de dominis estructurals innecessaris i un menor cost de producció; doncs els processos de síntesis peptídica permeten i faciliten la producció a gran escala dels antígens sense necessitat de fer servir sistemes biològics d'expressió. Així, s'han emprat pèptids sintètics, que imiten epítops específics de proteïnes, pel desenvolupament de nous sistemes de diagnòstic per a diverses malalties humanes, posant de manifest que els assaigs immunològics, basats en seqüències peptídiques, constitueixen una eina versàtil en diagnòstic i recerca, tal com es descriu en diverses revisions generals del camp (34, 35).

D'altra banda cal mencionar que, en els darrers anys, la tecnologia del *phage display* s'ha convertit en una eina clau pel diagnòstic biomèdic, ja que permet identificar pèptids per a utilitzar-los, posteriorment, als immunoassaigs. Aquesta tècnica es basa en la inserció de seqüències d'ADN que codifiquen pèptids dins del genoma d'un bacteriòfag, de manera que aquests pèptids queden exposats a la superfície del virus. Mitjançant un procés de selecció iteratiu anomenat *biopanning*, les biblioteques de fags amb milions o milers de milions de variants de pèptids es posen en contacte amb la molècula diana i es recuperen només aquells que hi mostren una unió específica amb ella (36). Els pèptids així seleccionats es sintetitzen químicament i poden, a continuació, ser emprats en la plataforma on es desenvolupi l'assaig diagnòstic.

7.1. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) basat en pèptids

La tècnica d'ELISA va ser desenvolupada per Engvall i Perlmann l'any 1971 (37) i és una de les plataformes immunològiques més utilitzades. Es tracta d'un mètode analític quantitatiu que determina l'establiment de la unió antigen-anticòs mitjançant un assaig colorimètric.

En els ELISA basats en pèptids, aquests darrers s'immobilitzen sobre superfícies sòlides i actuen com a antígens específics per a la captura d'anticossos presents a les mostres biològiques. Com a principals avantatges es podrien assenyalar l'alta especificitat, la reducció de falsos positius associats a dominis no rellevants de les proteïnes de les quals deriven i el fet que la producció es pot estandarditzar de

forma molt reproduïble. Tanmateix, aquesta aproximació només serveix per a la detecció d'anticossos dirigits contra epítops lineals i, d'altra banda, la seva sensibilitat és en moltes ocasions inferior a la que s'obté treballant amb les proteïnes completes. Per tal de superar aquesta baixa sensibilitat peptídica, han estat descrites diverses aproximacions tals com són la unió covalent del pèptid al suport sòlid; l'ús de pèptids derivatitzats amb cues hidrofòbiques d'àcids grassos que milloren l'adsorció de les seqüències peptídiques a les microplaques de titulació; la restricció de la mobilitat peptídica mitjançant la formació de ponts disulfur o d'enllaços amida intramoleculars i l'obtenció de pèptids antigènics múltiples (*MAPs*), en forma homogènia o heterogènia (34). D'altra banda, les proteïnes completes permeten la detecció d'anticossos dirigits contra epítops conformacionals, la qual cosa pot fer augmentar la sensibilitat global de l'assaig. Malgrat això, aquestes presenten més variabilitat estructural, risc de reactivitat creuada i costos de producció més elevats. En canvi, els pèptids ofereixen una plataforma més robusta i específica quan els epítops rellevants han estat ben identificats prèviament, fet que els fa especialment adequats per a diagnòstics dirigits i personalitzats. Els ELISA peptídics són especialment útils en estudis seroepidemiològics i en el diagnòstic de malalties autoimmunes i infeccioses.

7.2. Microarrays peptídics

Els microarrays peptídics es basen en la immobilització ordenada d'un nombre elevat de pèptids sobre superfícies planes, com ara vidre funcionalitzat, silici o membranes polimèriques. La detecció es realitza habitualment mitjançant fluorescència, després de la unió dels anticossos, permetent l'anàlisi simultània de la interacció de molts epítops amb els anticossos que es troben presents a les mostres biològiques. El principal avantatge d'aquesta aproximació és la miniaturització dels assaigs d'unió antigen-anticòs amb la consegüent reducció del volum de sèrum requerit dels pacients, que és sempre el factor limitant en els estudis serològics. Aquest cribratge massiu, permet el mapatge detallat d'epítops lineals, es a dir, la identificació de candidats per al desenvolupament de nous tests diagnòstics i la identificació de perfils de resposta (*immunosignatures*) característics, que són patrons d'unió d'anticossos que permeten discriminar entre diferents

malalties o entre estadis de les mateixes. Tot i aquests avantatges, els microarrays peptídics presenten certes limitacions, com són la detecció només d'epítops lineals, la dificultat de l'estandardització del procés experimental i l'anàlisi bioinformàtica del gran volum de dades que es generen. En aquest context, és clau la integració amb eines computacionals avançades per tal d'optimitzar la interpretació dels resultats (38).

7.3. Tests ràpids basats en pèptids (lateral flow assays, LFA)

Els tests ràpids de flux lateral basats en pèptids són plataformes de diagnòstic portàtils *(point-of-care*, PoC), ràpides i de fàcil ús, àmpliament utilitzades en entorns clínics i de camp, que detecten analits (*anticossos, biomarcadors, etc*) que es troben en una mostra biològica (*sèrum, saliva, etc*). En aquests dispositius, els pèptids s'immobilitzen sobre membranes de nitrocel·lulosa i permeten la captura dels analits específics a mesura que la mostra flueix per capil·laritat. El temps de resposta és curt, no requereixen equipament especialitzat i es caracteritzen per l'elevada estabilitat. No obstant això, els LFA basats en pèptids solen presentar una sensibilitat inferior respecte a mètodes de laboratori com és l'ELISA, fet que pot limitar-ne el seu ús en etapes primerenques de les malalties (39).

7.4. Pèptids sintètics en diagnòstic per la imatge (Positron Emission Tomography, PET i Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT)

Les tècniques d'imatge molecular més comuns, com ara la tomografia per emissió de positrons (*Positron Emission Tomography*, PET) i la tomografia computaritzada per emissió de fotó únic (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT), tenen un paper essencial en el diagnòstic actual, donat que la informació que proporcionen és molt específica i permeten mostrar la distribució de la malaltia. El desenvolupament tecnològic més recent ha estat centrat en el disseny de sondes extremadament precises i és en aquest àmbit on cal destacar

la utilització de sondes basades en pèptids. Els pèptids sintètics radiomarcats són vectors específics per a la imatge molecular que tenen capacitat de mostrar certs processos biològics *in vivo* amb una gran resolució i selectivitat. A diferència dels radiofàrmacs tradicionals, ofereixen una alta afinitat per a receptors i biomarcadors i són eliminats de forma ràpida de la circulació, millorant-ne així el contrast i reduint-ne la dosi efectiva que es requereix administrar als pacients.

En PET, el marcatge amb radioisòtops com són ^{18}F o ^{68}Ga ha permès desenvolupar una àmplia gamma de sondes que detecten des de receptors tumorals fins a marcadors d'infecció i inflamació, amb aplicacions clíniques en oncologia, neurologia i malalties cardiovasculars. Paral·lelament, en SPECT l'ús de pèptids marcats amb ^{99}mTc o ^{111}In amplia la disponibilitat d'isòtops i facilita el diagnòstic. Revisions recents destaquen l'ús de certes seqüències peptídiques dirigides a marcadors d'infecció i integrines específiques de teixits, reforçant el paper dels pèptids com a agents *teranòstics,* és a dir, que permeten integrar diagnòstic i teràpia per poder dur a terme una medicina més personalitzada. Aquest enfoc molecular obre una nova era en el diagnòstic per imatge PET/SPECT, on la selectivitat química dels pèptids contribueix a una detecció primerenca i a una estratificació terapèutica més precisa (40).

8. Aplicacions de pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties.

En aquest apartat, que no pretén ser exhaustiu, es presenten aplicacions dels pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties humanes amb exemples representatius que il·lustren la seva utilització en diferents àrees de la medicina.

8.1. Diagnòstic de malalties infeccioses

En el camp del diagnòstic de les malalties infeccioses, els pèptids sintètics han estat aplicats en el desenvolupament d'assaigs serològics dirigits a patògens amb rellevància epidemiològica. La literatura documenta una àmplia gamma d'exemples en què els pèptids sintètics

han estat utilitzats com a components centrals en el diagnòstic d'infeccions víriques, bacterianes i parasitàries, tant en assaigs convencionals d'ELISA com en d'altres plataformes tecnològiques.

En el cas de la **infecció pel virus de la immunodeficiència humana (HIV)**, han estat sintetitzats diversos pèptids derivats de les proteïnes de membrana gp41, gp120 i de la proteïna p24 de la càpside del virus, i posteriorment emprats com a antígens en el immunodiagnòstic de pacients infectats pel HIV, contribuint així a la definició d'epítops immunodominants. En particular, molts estudis es van adreçar a discriminar entre el HIV-1 i el HIV-2, demostrant que els pèptids són eines útils per a caracteritzar subtipus del virus (41-43). Més recentment, han estat obtingudes varies biblioteques de pèptids i es van seleccionar per *phage display* els lligands peptídics amb capacitat de detecció de la proteïna p24 del HIV (44).

De manera similar, en les **hepatitis víriques**, els pèptids sintètics han permès seleccionar regions epitòpiques específiques, altament conservades i immunodominants, reduint reactivitats creuades i millorant l'estandardització dels assaigs. En el cas del *virus de l'hepatitis A (HAV)*, estudis basats en pèptids derivats de les proteïnes de la càpside del virus VP1, VP2 i VP3, van demostrar una bona capacitat de detecció d'anticossos per ELISA, tot i que la literatura recent és limitada (45,46). Pel *virus de l'hepatitis B (HBV)*, s'han explorat fragments peptídics lineals derivats de l'antigen de superfície (HBsAg) en immunoassaigs diagnòstics, com a alternativa a les proteïnes recombinants (47). En aquest context, Meng et al. van identificar epítops de HBsAg, mitjançant un assaig de polarització de fluorescència, demostrant que determinats pèptids sintètics podien detectar anticossos anti-HBV amb elevada especificitat i bona sensibilitat (48). Posteriorment, Gu et al. van utilitzar arrays de pèptids per a fer el mapeig d'epítops lineals, reconeguts pels anticossos que es troben en diferents fases de la infecció crònica; aproximació que va ser útil pel disseny de pèptids amb una capacitat diagnòstica molt més específica (49). De manera similar, pel *virus de l'hepatitis C (HCV)*, han estat utilitzades en immunoassaigs de tipus ELISA varies seqüències peptídiques sintètiques derivades de regions del nucli i de les glicoproteïnes de l'embolcall del virus, E1 i E2, per a la detecció d'anticossos específics (50,51). Les revisions més recents assenyalen la integració d'aquests

epítops en plataformes diagnòstiques multiplexades d'alta sensibilitat amb l'objectiu de millorar tant la sensibilitat com l'especificitat en el cribratge i en el diagnòstic primerenc de la infecció (52). En el context del *virus de l'hepatitis D (HDV)*, una revisió recent indica que els pèptids derivats de l'antigen HDAg constitueixen una línia emergent; encara amb escassa validació clínica però amb resultats preliminars prometedors (53). En el cas del *virus de l'hepatitis E (HEV)*, els estudis inicials amb pèptids sintètics, derivats de regions de les proteïnes de la càpside ORF2 i ORF3, van establir la seva viabilitat diagnòstica (54); si bé actualment la majoria de plataformes diagnòstiques comercials utilitzen les proteïnes recombinants completes, atesa la seva millor sensibilitat i capacitat de preservar els epítops conformacionals. Finalment, pel *GB virus C (GBV-C)*, també conegut com a virus de l'hepatitis G, la utilització de microarrays de pèptids sintètics derivats de la proteïna de l'embocall E2 va permetre identificar regions immunodominants amb potencial aplicació en l'estudi de la co-infecció GBV-C/HIV (55).

En el context de les **infeccions per coronavirus**, s'han dut a terme un bon nombre d'estudis adreçats a la infecció causada pel coronavirus 2 de la síndrome respiratòria aguda greu (*SARS-CoV-2*, *virus causant de la COVID-19*). Així per exemple, Jiang et al. han analitzat el paper d'epítops lineals derivats de proteïnes del virus (*Spike i nucleocàpside*) tant en el desenvolupament de proves serològiques que milloren l'especificitat diagnòstica i redueixen reactivitats creuades amb altres coronavirus humans, com en la seva aplicació en plataformes multiplexades d'alta sensibilitat (56).

En l'àmbit de **les infeccions bacterianes**, com és per exemple la tuberculosi causada per *Mycobacterium tuberculosis,* ha estat estudiat àmpliament l'ús de pèptids sintètics derivats d'antígens immunodominants, com són les proteïnes ESAT-6 i CFP-10 (57). Aquests pèptids han estat emprats en assaigs *in vitro* IGRA (*Interferon-Gamma Release Assays*), que mesuren la producció d'interferó gamma per limfòcits T sensibilitzats, després de l'estimulació amb pèptids sintètics derivats dels antígens específics del bacteri (58), així com en estudis d'immuno-informàtica per a la identificació racional d'epítops T (59). Un altre exemple d'infecció bacteriana és la sífilis. En aquest cas, Borghezan et al. van dissenyar, fent servir eines de bioinformà-

tica, epítops de les proteïnes immunodominants derivades del bacteri *Treponema pallidum* (Tp0171, Tp0435, Tp0574, Tp0684 i Tp0453), els quals van ser posteriorment sintetitzats i utilitzats com antígens per a la detecció serològica de la sífilis en un assaig d'ELISA, demostrant una elevada sensibilitat i especificitat en diferents estadis clínics de la infecció (60).

Les malalties parasitàries constitueixen un altre camp d'aplicació dels pèptids com a eina diagnòstica (61). Així per exemple, en la malaltia de Chagas, causada per *Trypanosoma cruzi*, es van utilitzar dos pèptids sintètics (TcD i PEP2) com a antígens en un assaig d'ELISA, assolint quan es combinaven, una sensibilitat superior al 99% i una especificitat superior al 98% (62). D'altra banda, en assaigs serològics per diagnosticar la malària, s'han emprat fragments peptídics sintètics derivats de regions conservades de les proteïnes de superfície de *Plasmodium falciparum*, per mesurar respostes específiques en poblacions exposades (63).

8.2. Diagnòstic en oncologia

En l'àmbit de l'**oncologia**, els pèptids sintètics s'han utilitzat en múltiples estratègies diagnòstiques orientades tant a la detecció primerenca com a la caracterització molecular de tumors. A la literatura es descriu una àmplia varietat d'aplicacions dels pèptids sintètics, que inclouen des de la imatge molecular dirigida a receptors específics fins a la detecció de biomarcadors tumorals en fluids biològics, l'endoscòpia molecular i la caracterització serològica de respostes associades al càncer.

Un dels camps més consolidats és el desenvolupament d'agents peptídics per a la imatge molecular, dirigits a receptors que es troben sobre-expressats en les cèl·lules tumorals. Un exemple paradigmàtic és l'ús d'anàlegs sintètics de la somatostatina marcats amb radionúclids per a la detecció de tumors neuroendocrins, mitjançant tomografia per emissió de positrons (PET) o gammagrafia (64). De manera similar, els pèptids dirigits al receptor del pèptid alliberador de gastrina han estat extensament estudiats com a sondes d'imatge molecular, per a la detecció per PET del càncer de pròstata i de mama (65). En el context

del càncer de pròstata, una altra diana molecular d'especial rellevància és el PSMA (*prostate-specific membrane antigen*). Tot i que la majoria dels lligands desenvolupats per a aquest receptor són petites molècules inhibidores, també s'han identificat i dissenyat seqüències peptídiques amb afinitat específica pel PSMA, les quals han estat explorades en estudis pre-clínics d'imatge molecular i en aproximacions diagnòstiques i terapèutiques experimentals (66).

Més enllà de les aplicacions en imatge molecular *in vivo*, els pèptids sintètics també han estat investigats, com a eines de reconeixement selectiu, en l'àmbit de la detecció histopatològica i la caracterització tumoral. En aquest context, s'han utilitzat com a sondes d'unió específica en tècniques d'immunohistoquímica o en plataformes diagnòstiques basades en biosensors. Així, han estat identificats per *phage display* i posteriorment sintetitzats i emprats en estudis *in vitro*, diversos pèptids amb afinitat envers marcadors tumorals específics en càncers com són el colorectal, el gàstric o el pancreàtic. En el cas del càncer colorectal, per exemple, s'han descrit pèptids que són capaços de reconèixer molècules de superfície associades a adenomes i adenocarcinomes, els quals un cop conjugats a sondes fluorescents, s'han utilitzat en estudis d'endoscòpia molecular (67).

En aquesta mateixa línia, un altre camp d'aplicació rellevant és el desenvolupament de biosensors basats en pèptids per a la detecció de biomarcadors tumorals circulants. Gràcies a la seva elevada especificitat d'unió i a la facilitat de modificació química, els pèptids poden actuar com a elements de reconeixement en plataformes biosensores (68). En aquest context, s'han descrit sistemes basats en pèptids integrats en plataformes electroquímiques o òptiques, que són capaços de reconèixer proteïnes com són l'antigen prostàtic específic (PSA), el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) o altres biomarcadors associats amb la progressió tumoral. Paral·lelament, alguns pèptids també han estat desenvolupats com a agents d'imatge dirigits a molècules implicades en processos clau de la biologia tumoral. Entre aquests, destaquen els pèptids que reconeixen integrines com $\alpha v\beta 3$, que es troben freqüentment sobre-expressades en processos d'angiogènesi tumoral. Aquests pèptids, sovint derivats de la seqüència RGD (Arg-Gly-Asp), un cop conjugats amb fluoròfors o radionúclids s'han utilitzat com a sondes d'imatge en diversos tumors sòlids,

incloent-hi el glioblastoma i el melanoma (69).

Finalment, en l'àmbit de l'hematologia oncològica, també han estat desenvolupats pèptids derivats de seqüències específiques de proteïnes de fusió o d'antígens associats a leucèmies, amb l'objectiu de detectar respostes immunes específiques. Aquests pèptids s'han utilitzat en assaigs immunològics per a l'avaluació de respostes de limfòcits T o d'anticossos dirigits contra antígens leucèmics, contribuint així al monitoratge immunològic i a l'estudi de la malaltia en determinats subtipus de leucèmia (70).

D'altra banda, el desenvolupament de tecnologies basades en microarrays peptídics ha permès analitzar d'una forma més sistemàtica la presència d'autoanticossos en mostres de pacients oncològics. Aquestes plataformes han facilitat la caracterització de perfils serològics en tumors com són el de càncer de pulmó, de mama o d'ovari, contribuint a la identificació de signatures d'autoanticossos que són potencialment útils com a biomarcadors diagnòstics o pronòstics (71).

8.3. Diagnòstic de malalties neurodegeneratives

La literatura científica recull múltiples exemples de l'ús de pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties neurodegeneratives, incloent la seva aplicació en immunoassaigs dirigits a biomarcadors específics i en aproximacions d'imatge molecular, contribuint d'aquesta forma a la caracterització de processos patològics associats a la degeneració del sistema nerviós central.

En la **malaltia d'Alzheimer**, han estat àmpliament utilitzats fragments peptídics derivats de la proteïna β-amiloide (Aβ) i de la proteïna tau, com a antígens en assaigs immunològics per a la detecció i quantificació d'anticossos específics que es troben en el sèrum i en el líquid cefaloraquidi. Aquestes aproximacions han permès estudiar la resposta immune humoral associada a la patologia i també explorar possibles biomarcadors serològics de la mateixa (72). A més, els pèptids sintètics que reprodueixen seqüències clau implicades en l'agregació d'Aβ s'han emprat en estudis de caracterització serològica i en el desenvolupament de sondes experimentals per a la detecció de

dipòsits amiloides. En paral·lel, han estat descrits pèptids amb afinitat específica per formes agregades d'Aβ, dirigits a la detecció de plaques amiloides, els quals han estat utilitzats com a lligands en estudis d'imatge preclínica (73).

De manera similar, en altres malalties neurodegeneratives com és la **malaltia de Parkinson**, s'han utilitzat fragments peptídics derivats de la proteïna α-sinucleïna com a antígens en immunoassaigs, per a la detecció d'anticossos específics i per a l'estudi de respostes immunes associades a la patogènesi de la malaltia. Aquests pèptids també han estat emprats en estudis dirigits a caracteritzar els mecanismes d'agregació proteica i a la identificació de noves dianes potencials per al desenvolupament de sondes diagnòstiques o eines de monitoratge de la progressió de la malaltia (74).

8.4. Diagnòstic de malalties autoimmunes

En el camp de les malalties autoimmunes, la capacitat dels pèptids sintètics per reproduir epítops d'autoantígens amb elevada especificitat ha permès la seva aplicació en el diagnòstic i en la caracterització immunològica de diverses patologies autoimmunes, com són per exemple, l'artritis reumatoide, el lupus eritematós sistèmic, la malaltia celíaca, la diabetis tipus 1, l'esclerosi múltiple o la miastènia gravis (75).

En l'**artritis reumatoide** (AR), s'han identificat pèptids, derivats de proteïnes que es troben en la sinovial reumatoide, que incorporen a la seva seqüència aminoàcids modificats post-traduccionalment; els quals, posteriorment, han estat emprats en el desenvolupament d'assaigs serològics per a la detecció dels autoanticossos anti-pèptids citrulinats (*Anti-Citrullinated Peptide Antibodies*, ACPAs), que avui dia constitueixen el marcador diagnòstic més significatiu i rellevant d'aquesta malaltia inflamatòria autoimmune (76,77). A l'apartat següent es presentaran, amb una major profunditat, els principals avenços que, en el camp dels pèptids sintètics com a nova eina de diagnòstic, han estat assolits per a la diagnosi i prognosi d'aquesta greu malaltia autoimmune.

En el **lupus eritematós sistèmic** (LES) han estat utilitzats fragments peptídics sintètics que corresponen a epítops lineals d'antígens nuclears, com són les histones, les ribonucleoproteïnes o altres components del nucleosoma, per analitzar la reactivitat d'autoanticossos en el sèrum dels pacients. En aquest context, els microarrays peptídics han permès analitzar simultàniament un gran nombre d'epítops i han estat utilitzats per identificar perfils complexos d'autoanticossos en cohorts de pacients amb LES, facilitant la identificació de signatures serològiques associades tant al diagnòstic, com a l'activitat de la malaltia i les seves manifestacions clíniques específiques (78).

A més de per l'AR i el LES, els pèptids derivats d'antígens específics han estat eines fonamentals en l'estudi de la resposta immune i en la detecció d'autoanticossos en moltes altres diverses malalties autoimmunes. Així per exemple, en la **malaltia celíaca**, han estat utilitzats com a antígens pèptids desamidats derivats de la gliadina en assaigs serològics per a detectar anticossos específics i facilitar el diagnòstic i seguiment de la malaltia (79). De manera similar, en la **diabetis mellitus tipus 1** s'han emprat pèptids derivats d'autoantígens com la insulina, la GAD65 o la IA-2 per a la detecció d'autoanticossos en estudis immunològics i en fases pre-clíniques de la malaltia (80). En la **esclerosi múltiple** han estat emprats, per a caracteritzar la resposta immune humoral i analitzar l'especificitat dels autoanticossos associats a diferents variants clíniques, pèptids derivats de proteïnes de la mielina, com són la proteïna bàsica de la mielina (MBP) o la glicoproteïna oligodendrocítica de la mielina (MOG) (81). Finalment, en la **miastènia gravis**, s'han utilitzat pèptids sintètics corresponents a regions del receptor nicotínic de l'acetilcolina per a desenvolupar sistemes de detecció immunològica en mostres de sèrum (82).

Aquest conjunt d'estratègies mostra com la utilització dels pèptids com a antígens ha contribuït de manera decisiva a comprendre la patogènesi, millorar el diagnòstic i definir nous biomarcadors que són específics en diferents contextos de les malalties autoimmunes.

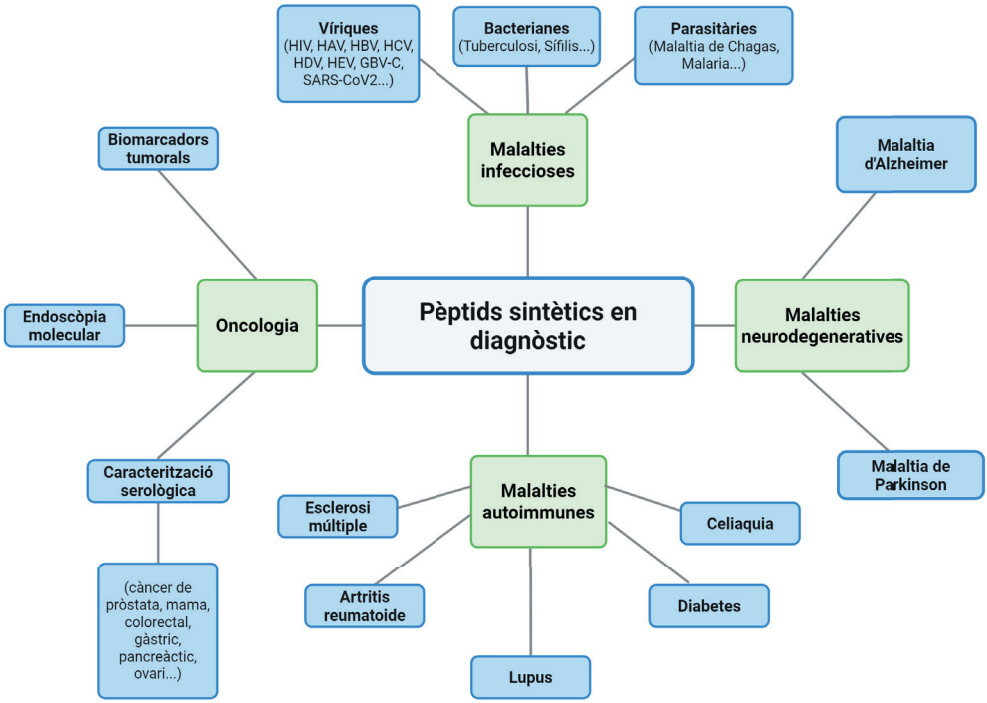


Figura 5. Exemples representatius d'aplicacions de pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties humanes
(imatge d'autoria pròpia creada amb BioRender.com)

9. Implicacions de les modificacions post-traduccionals en l'autoimmunitat: paper de la citrul·linació, l'homocitrul·linació i l'acetilació en la patogènesi, el diagnòstic i el pronòstic de l'artritis reumatoide

En aquest apartat es presenta, com exemple de resultats rellevants que van des de la investigació bàsica a la translació a la clínica, aquells que han estat assolits en el context dels pèptids sintètics aplicats a la diagnosis de l'artritis reumatoide (AR).

L'AR és una malaltia reumàtica immunomediada d'etiologia desco-

neguda que afecta aproximadament un 1% dels adults. Es caracteritza per una poliartritis crònica (*sinovitis*) que causa destrucció i deformitats articulars, juntament amb discapacitat funcional i reducció de la qualitat i de l'esperança de vida. Als darrers anys s'han fet avenços significatius en la patogènesi, el diagnòstic i el maneig de la malaltia, que han canviat el pronòstic per a una proporció molt significativa dels pacients. La investigació sobre l'ús de pèptids sintètics com a biomarcadors del diagnòstic i pronòstic d'aquesta malaltia reumàtica autoimmune ha estat una de les troballes més interessants i enigmàtiques en l'AR (83). Aquests pèptids han estat àmpliament utilitzats com a antígens en assaigs serològics per a la detecció d'autoanticossos específics associats a la AR i, a la literatura científica es descriuen diferents tipus d'ELISAs, microarrays i plataformes multiplexades, que tenen com a objectiu detectar autoanticossos específics contra determinats epítops post-traduccionalment modificats i caracteritzar així la resposta autoimmunitària en pacients amb diferents fenotips clínics.

Les modificacions post-traduccionals (PTMs) que es produeixen al teixit sinovial i que, actualment, es consideren més rellevants per l'AR són la citrul·linació, l'homocitrul·linació (*carbamilació*) i l'acetilació. Entre elles, la citrul·linació és la PTM més ben estudiada en el context de la reumatologia i els anticossos anti-proteïnes/pèptids citrul·linats (ACPAs) van ser inclosos per la Lliga Europea contra el Reumatisme (*European Alliance of Associations for Rheumatology*, EULAR) i pel Col·legi Americà de Reumatologia (*American College of Rheumatology*, ACR) com a criteris de classificació per a l'AR, l'any 2010 (84). La citrul·linació, que consisteix en la conversió d'arginina a citrullina, està mediada per l'enzim peptidilarginina deiminasa, que es troba a la sinovial inflamada. L'homocitrul·linació o carbamilació és una PTM no enzimàtica que implica la conversió de residus de lisina a residus homocitrul·linats, després d'una reacció amb cianat. L'acetilació és un procés enzimàtic reversible (equilibri entre acetilases i desacetilases) on s'afegeixen grups acetil a les amines lliures dels residus de lisina. En termes generals, tots els autoanticossos que es troben a l'AR pertanyen a la família dels anticossos anti-proteïnes/pèptids modificats (*Anti-Modified Protein/Peptide Antibodies*, AMPAs).

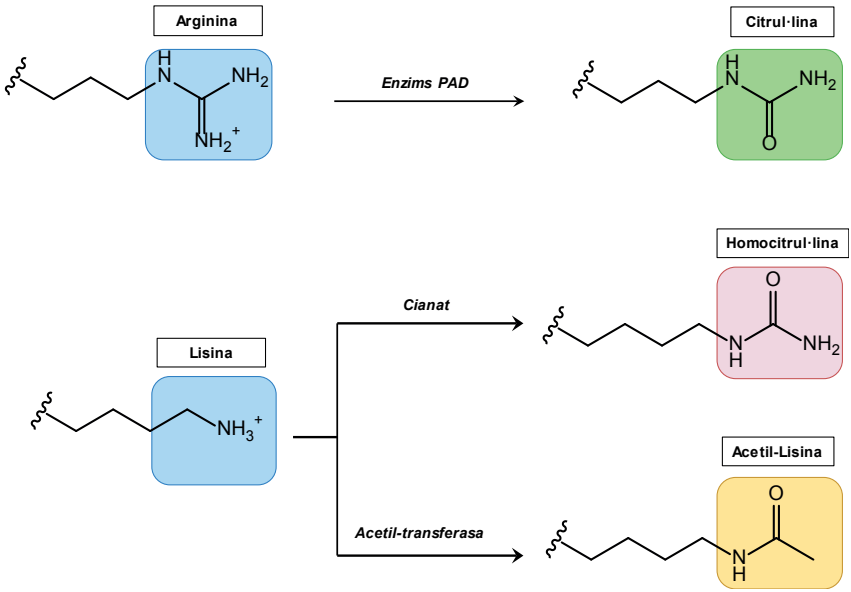


Figura 6. Modificacions post-traduccionals rellevants per a l'artritis reumatoide

Els ACPAs es poden detectar mitjançant immunoassaigs amb diferents proteïnes o pèptids citrul·linats com a substrats antigènics. A diferència de les proteïnes citrul·linades, els pèptids sintètics citrullinats proporcionen un control estricte sobre els epítops presentats i les posicions específiques de la seva seqüència on es troben els aminoàcids modificats post-traduccionalment. Són molècules químiques definides inequívocament, que imiten segments d'antígens proteics complexos implicats en la unió d'autoanticossos i que s'obtenen fàcilment en forma pura. Basant-se en aquests avantatges, Shellekens et al. van descriure pèptids citrul·linats sintètics com a antígens per a la detecció específica d'ACPAs en pacients amb AR (85) i van desenvolupar l'any 2000 l'ELISA de primera generació (CCP1) basat en un pèptid citrul·linat cíclic derivat de la filagrina (76). Des de llavors, s'han llançat al mercat kits de segona i tercera generació (CCP2 i CCP3/CCP3.1) i aquests han estat àmpliament utilitzats en la pràctica clínica. Aquestes tests comercials es basen en pèptids cíclics amb estructures primàries que no han estat publicades.

Posteriorment, treballant amb biblioteques de pèptids sintètics citrullinats, que van ser obtingudes seguint estratègies de síntesi de pèptids en fase sòlida, es van reportar epítops rellevants de proteïnes que es troben a la sinovial reumatoide inflamada (fibrina i vimentina) (86-88). Es van seleccionar diversos dominis reactius d'aquestes dues proteïnes i, posteriorment, els pèptids es van unir covalentment als pèptids d'enolasa i filagrina que havien estat reportats amb anterioritat (89,90), per així obtenir diversos *pèptids quimèrics* citrul·linats. La presència de diferents seqüències peptídiques dins de la mateixa molècula va donar lloc a efectes sinèrgics, en comparació amb els pèptids monomèrics o les mescles físiques corresponents dels mateixos. Així, els pèptids quimèrics van permetre una anàlisi detallada de la multireactivitat dels autoanticossos trobada en els sèrums de pacients que patien aquesta malaltia tan heterogènia. Els autoanticossos contra els pèptids quimèrics van mostrar balanços sensibilitat/especificitat, per a la diagnosi de l'AR, comparables als dels tests comercials CCP2 i CCP3/CCP3.1, proporcionant millors resultats pel que fa a la identificació de pacients amb un mal pronòstic radiològic (91,92).

Els ACPAs es caracteritzen per una gran heterogeneïtat, ja que mostren diferents patrons de reactivitat davant una àmplia varietat de proteïnes i pèptids citrul·linats. Gràcies a l'ús de tecnologies multiplex, ha estat possible identificar un gran nombre d'aquests pèptids com a dianes dels ACPAs. Un dels primers estudis destacats en aquest camp va ser el de Hueber et al. (93), on es van reportar microarrays del proteoma sinovial amb centenars de proteïnes i pèptids. Posteriorment, altres investigadors han desenvolupat assaigs que permeten detectar subgrups de pacients que no són identificats amb les proves comercials convencionals (94,95). En aquesta línia, en un estudi publicat per Garcia-Moreno et al. (96) es va aconseguir una especificitat del 100% mitjançant una plataforma multiplex basada en pèptids citrul·linats, establint com a criteri de positivitat la reactivitat simultània amb més de tres pèptids.

Els treballs publicats van demostrar que l'anàlisi de múltiples dianes facilita la identificació de subgrups de pacients amb característiques clíniques diferenciades, contribuint així a una millor comprensió de la malaltia. Més recentment, es va descriure que els ACPAs presentaven una àmplia reactivitat creuada amb altres PTMs, com són la carbami-

lació (anti-CarP) i l'acetilació (anti-APA) de la lisina.

Els anti-CarP es troben presents en, aproximadament, el 45% dels pacients amb AR (*entre un 10-20% dels quals són ACPAs negatius*) (97), s'han associat amb un mal pronòstic de la malaltia i han estat detectats en diverses malalties pulmonars cròniques (98). Castellanos et al. (99) van descriure, per primer cop a la literatura científica, que els anti-CarP que reconeixen proteïnes i/o pèptids homocitrul·linats es troben associats de forma significativa amb la malaltia pulmonar intersticial (*interstitial lung disease*, ILD), el que suggereix un possible vincle entre l'homocitrul·linació i el desenvolupament d'ILD en pacients amb AR. Aquest resultat pot contribuir a la detecció primerenca d'aquesta manifestació extra-articular que comporta una alta mortalitat en els pacients d'AR, fet que és crucial per establir una estratègia de tractament adequada el més aviat possible.

Tenint en compte que la superposició entre les tres famílies d'autoanticossos (ACPA, anti-CarP i anti-APA) és una característica de l'AR, es van dissenyar, posteriorment, nous antígens basats en pèptids quimèrics que contenen citrul·lina, homocitrul·lina i/o acetil-lisina per estudiar més a fons el paper dels AMPAs com a biomarcadors vinculats a la presència d'ILD. Així, es va reportar, per primera vegada a la literatura, un pèptid que conté simultàniament les tres PTMs més rellevants per a l'AR en posicions específiques de la seva estructura primària (*Chimeric Fibrin-Filaggrin Citrullinated Homocitrullinated Acetylated Peptide*, CFFCHAP), com a diana antigènica dels autoanticossos associats amb fenotips clínics greus d'AR (100).

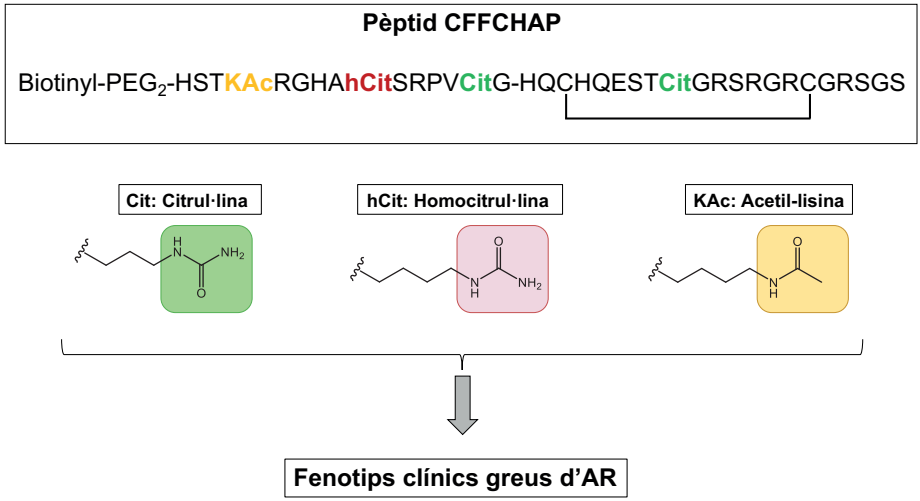


Figura 7. Pèptid amb tres PTMs com a diana antigènica dels autoanticossos associats amb fenotips clínics greus d'artritis reumatoide

Molt rellevant ha estat la utilització de pèptids sintètics, amb diverses PTMs a la seva estructura primària, en un assaig clínic multicèntric (PALABA trial: ClinicalTrials. gov Id: NCT03669367), on es va dur a terme un assaig obert i aleatoritzat de dos tractaments (*abatacept vs hidroxicloroquina)* per a la prevenció d'AR en pacients de reumatisme palindròmic. Els resultats han estat recentment publicats a la prestigiosa revista científica *Nature Medicine* (101).

En resum, l'ús d'antígens peptídics ben definits, que presenten múltiples PTMs a la seva estructura, ha demostrat ser clau per avançar en la detecció de biomarcadors serològics que podrien ser útils per estratificar els pacients d'AR, per tal d'establir una reumatologia personalitzada.

10. Avantatges, limitacions i reptes dels pèptids sintètics en el diagnòstic de malalties humanes

Tal i com ja ha quedat palès als apartats previs, els pèptids sintètics han adquirit una importància creixent com a nova eina pel desenvo-

lupament de mètodes de diagnòstic en biomedicina, especialment en immunodiagnòstic i en diagnòstic per la imatge. La seva capacitat per reproduir els epítops més rellevants de les proteïnes permet utilitzar-los com a sondes moleculars, altament selectives, per detectar biomarcadors o anticossos associats a diferents malalties. Tot i això, l'aplicació clínica dels pèptids sintètics comporta també diverses limitacions i reptes que han de ser abordats, per tal de millorar la seva utilitat diagnòstica.

10.1. Avantatges principals

Com ja ha estat descrit, un dels avantatges principals dels pèptids sintètics és la seva **alta especificitat molecular**. Mitjançant síntesi química és possible obtenir seqüències peptídiques que mimetitzen epítops antigènics de proteïnes que s'associen a determinades malalties. Aquesta aproximació permet reduir la presència d'epítops inespecífics, que es poden trobar als extractes proteics complets, millorant així l'especificitat dels assaigs diagnòstics. A més, la seva elevada puresa química i la possibilitat d'introduir modificacions específiques a l'estructura, permeten adaptar-los fàcilment a diferents formats analítics. Un altre avantatge important és la **reproductibilitat en la producció**. Els pèptids sintètics s'obtenen principalment per síntesi en fase sòlida i es purifiquen mitjançant tècniques cromatogràfiques d'alta resolució, fet que comporta que presentin una definició unívoca de la seva estructura química i una puresa molt elevada. Aquests processos de síntesi i purificació permeten obtenir pèptids altament estandarditzats i consistents entre diferents lots de producció, cosa que facilita la comparació de resultats entre laboratoris i el desenvolupament de kits diagnòstics a escala industrial. Els pèptids també presenten **propietats fisicoquímiques favorables** per a aplicacions diagnòstiques. Donada la seva mida relativament petita, solen mostrar una bona penetració en teixits i una ràpida eliminació de la circulació sanguínia, fet que pot generar relacions senyal/soroll favorables quan es fan servir en tècniques d'imatge molecular. A més, molts pèptids mostren una baixa immunogenicitat i toxicitat, cosa que facilita el seu ús com a sondes diagnòstiques *in vivo*. Finalment, el disseny de pèptids sintètics pot també beneficiar-se de **metodologies bioinformàtiques**, incloent eines d'immunoinformàtica i predicció d'epítops.

Aquestes aproximacions tenen una gran utilitat en la identificació de les regions antigèniques més rellevants de les proteïnes, facilitant d'aquesta manera l'obtenció de pèptids sintètics més específics i eficients per a ser emprats en el diagnòstic de malalties humanes.

10.2. Limitacions tècniques

Malgrat els avantatges descrits, l'ús de pèptids sintètics en diagnòstic clínic presenta també diverses limitacions que són importants. Una de les principals és que molts pèptids representen únicament **epítops lineals**, mentre que una proporció significativa dels anticossos presents als pacients reconeix epítops conformacionals, els quals depenen de l'estructura tridimensional de la proteïna. Com a resultat, aquests pèptids no reprodueixen fidelment els determinants antigènics presents en la proteïna nativa, fet que pot reduir la sensibilitat dels assaigs diagnòstics basats en pèptids. Una altra limitació rellevant és la **variabilitat en el reconeixement immunològic entre poblacions**. En malalties infeccioses o parasitàries, els epítops immunodominants poden variar segons l'espècie del patogen, la regió geogràfica o l'estat immunològic del pacient. Aquest fenomen pot limitar l'eficàcia d'un únic pèptid com a antigen de diagnòstic universal. Per aquest motiu, es necessari l'ús de panells o combinacions de pèptids per tal de millorar el balanç sensibilitat/especificitat dels sistemes diagnòstics. D'altra banda, els pèptids presenten una **estabilitat metabòlica limitada** quan es fan servir *in vivo*, doncs són susceptibles a la degradació per proteases, cosa que pot reduir la seva vida mitjana i afectar la seva aplicabilitat com a eina de diagnòstic. Per tal de superar aquest handicap, s'han desenvolupat diverses estratègies químiques, ja descrites en apartats anteriors, com són entre d'altres la ciclació del pèptid o la incorporació d'aminoàcids no naturals. Finalment, la **identificació d'epítops diagnòstics òptims** continua sent un repte important. Tot i els avenços en bioinformàtica, la predicció d'epítops no sempre reflecteix el comportament immunològic real en pacients, de manera que la validació experimental continua sent essencial pel desenvolupament de nous sistemes de diagnòstic basats en pèptids sintètics.

10.3. Reptes clínics i translacionals

Finalment, cal demostrar la **validació clínica del test** mitjançant estudis amb mostres clíniques que evidenciïn que els resultats obtinguts són rellevants i útils pel diagnòstic clínic de la malaltia. Aquesta validació requereix l'estudi fent servir cohorts de pacients ben caracteritzades. Tot i que nombrosos pèptids han mostrat resultats prometedors en els estudis preliminars, només una fracció molt reduïda dels mateixos arriba a formar part de tests diagnòstics aprovats pel seu ús en clínica. En aquest context, els estudis multicèntrics són essencials per avaluar el balanç sensibilitat/especificitat dels tests basats en pèptids, en diferents poblacions i entorns clínics, així com per a confirmar la robustesa i la translació d'aquests en condicions reals de la pràctica clínica.

D'altra banda, el desenvolupament de tests diagnòstics basats en pèptids sintètics ha de complir amb els **requisits reguladors** aplicables als dispositius de diagnòstic. A la Unió Europea, els sistemes de diagnòstic *in vitro* estan regulats pel *Reglament (UE) 2017/746* i els dispositius utilitzats *in vivo* es regulen sota el *Reglament (UE) 2017/745*; reglaments que estableixen els criteris necessaris per garantir la qualitat, la seguretat i el rendiment dels tests o dispositius abans de la seva comercialització. En aquest context, és també imprescindible demostrar la validesa analítica del test, incloent-hi la definició de paràmetres com són la sensibilitat, l'especificitat, la precisió, la reproductibilitat i el límit de detecció. Paral·lelament, s'ha de dur a terme una avaluació sistemàtica dels riscos associats i assegurar el compliment de sistemes de gestió de qualitat, com són els establerts per la *Norma ISO 13485*.

11. Conclusions i perspectives futures

Tal com s'ha exposat en seccions prèvies, l'àmbit dels pèptids sintètics com a eina diagnòstica ha experimentat un progrés notable en els darrers anys, impulsat per la integració de tècniques experimentals avançades i eines computacionals sofisticades. La integració de dades òmiques i el desenvolupament de noves plataformes analítiques ha obert noves oportunitats per dissenyar biomarcadors basats en pèptids més específics, sensibles i adaptats al diagnòstic de diferents malalties humanes.

De cara a les perspectives futures, les principals línies d'evolució en l'àmbit dels pèptids sintètics com a eina diagnòstica es preveuen en el disseny computacional, el desenvolupament de plataformes multiplexades i la seva efectiva translació clínica.

En aquest context, és esperable que els avenços en intel·ligència artificial (IA) continuïn redefinint profundament les estratègies de descoberta i optimització de pèptids, ampliant de manera significativa la capacitat per identificar biomarcadors amb alt valor diagnòstic (102). Les aproximacions basades en models d'IA permetran explorar espais de seqüències cada vegada més extensos i complexos, així com predir amb major precisió les interaccions amb dianes biològiques. Aquest progrés facilitarà el disseny racional de pèptids amb propietats optimitzades, com ara una elevada afinitat d'unió, estabilitat estructural i especificitat, mitjançant la integració de dades que inclouen informació de seqüència i estructura tridimensional. Així mateix, es preveu una creixent consolidació dels estudis *in silico* com a etapa clau prèvia a la validació experimental, contribuint a reduir costos i temps en el procés de desenvolupament dels pèptids com a eina diagnòstica (103).

Paral·lelament, les plataformes diagnòstiques multiplexades evolucionaran cap a sistemes més sensibles, miniaturitzats i automatitzats, capaços d'analitzar simultàniament múltiples biomarcadors en mostres biològiques complexes. En particular, els microarrays de pèptids i altres tecnologies afins permetran aprofundir en la caracterització de respostes immunològiques i en la identificació d'epítops d'alt interès diagnòstic. La integració d'aquests sistemes en biosensors portàtils i dispositius microfluídics afavorirà la generalització del diagnòstic en el punt d'atenció, mentre que el desenvolupament de dispositius portables (*wearables*) obrirà noves possibilitats per al monitoratge continu i personalitzat de biomarcadors, especialment en el context de malalties cròniques.

Tanmateix, la translació clínica d'aquestes innovacions continuarà requerint superar diversos reptes rellevants. En particular, serà imprescindible dur a terme estudis de validació en cohorts àmplies i ben definides per garantir la robustesa, la reproductibilitat i la utilitat clínica dels biomarcadors identificats. A més, els requisits reguladors,

juntament amb la necessitat de demostrar un clar benefici clínic i cost-efectivitat, constituiran factors determinants per a la seva implementació en la pràctica clínica habitual.

En conjunt, la convergència entre intel·ligència artificial, disseny computacional, síntesi peptídica avançada i tecnologies multiplexades configura un escenari altament prometedor. Aquestes sinergies no només acceleraran la descoberta de nous biomarcadors, sinó que també facilitaran el desenvolupament de proves diagnòstiques més precises, específiques i adaptables, consolidant el paper dels pèptids sintètics en la medicina de precisió del futur.

12. Referències

1. Becatti M, Cho WC. Editorial: Insights in molecular diagnostics and therapeutics: 2022. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1209844.

2. NIH Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints in clinical research: definitions and conceptual model. In: Downing GJ, editor. *Biomarkers and surrogate endpoints: clinical research and applications*. Amsterdam: Elsevier; 2000. p. 1-9.

3. Jackson H, Oler E, Torres-Calzada C, Kruger R, Hira AS, López-Hernández Y, Pandir D, Wang J, Yang K, Fatokun O, Berjanskii M, MacKay S, Sajed T, Han S, Woudstra R, Sykes G, Poelzer J, Sivakumaran A, Gautam V, Womg G, Wishart D. Marker DB 2.0: a comprehensive molecular biomarker database for 2025. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D1415-D1425.

4. Ashley EA. Towards precision medicine. *Nat Rev Genet*. 2016;17(9):507-522.

5. Shin S, Kim J, Song E, Han S, Hohng S. Analytical techniques for nucleic acid and protein detection with single-molecule sensitivity. *Exp Mol Med*. 2025;57:938-949.

6. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression

in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172.

7. Borrebaeck CA. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol Today*. 2000;21(8):379-382.

8. Papaneri A, Cui G, Chen SH. Next-generation nucleic acid-based diagnostics for viral pathogens: lessons learned from the SARS-CoV-2 pandemic. *Microorganisms*. 2025;13(8):1905.

9. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc*. 1963;85(14):2149-2154.

10. Chavda VP. Vaccines reimagined: the peptide revolution in disease prevention. In: *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2025;212:329-354.

11. Jahantigh HR, Gheshlagh SR, Mafakher L, Ahmadi N, Shahbazi B, Ahmadi K. Advancing peptide-based vaccines against viral pathogens: a narrative review. *Ther Adv Infect Dis*. 2026;13:20499361251411188.

12. Carroll M, Rosenbaum E, Viswanathan R. Computational methods to predict conformational B-cell epitopes. *Biomolecules*. 2024;14:983.

13. Lombardi L, Genio VD, Albericio F, Williams DR. Advances in peptidomimetics for next-generation therapeutics: strategies, modifications, and applications. *Chem Rev*. 2025;125(15):7099-7166.

14. Fischer E, Fourneau E. Über einige Derivate des Glykokolls und die Synthese von Polypeptiden. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1901;34:2868-2877.

15. Bergmann M, Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1932;65:1192-1201.

16. du Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, Roberts CW, Katsoyannis PG. The synthesis of oxytocin. *J Am Chem Soc*. 1953;75:4879-488.

17. Carpino LA, Han GY. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J Org Chem*. 1972;37:3404-3409.

18. Atherton E, Sheppard RC. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. Vol. 53 Practical Approach Series ISBN: 1852211334, 1989.

19. Kates SA, Albericio F. *Solid-Phase Synthesis: A practical guide*. CRC Press ISBN: 978-0367398712, 2019

20. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(15):5409-5413.

21. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990;249(4967):386-390.

22. Palomo JM. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv*. 2014;4:32658-32672.

23. Al Musaimi O, de la Torre BG, Albericio F. Greening Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis. *Green Chem*. 2020;22:996-1018.

24. Aguilar MI. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods Mol Biol*. 2004;251:3-16.

25. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016;537(7620):347-355.

26. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 2015;20(1):122-128.

27. Jois SD, Ed. *Peptide therapeutics: fundamentals of design, development, and delivery*. Springer International Publishing, ISBN: 3031045459; 2022.

28. Lee MF, Poh CL. Strategies to improve the physicochemical properties of peptide-based drugs. *Pharm Res*. 2023;40(3):617-632.

29. Al Musaimi O. Unlocking the potential of retro-inverso peptides as future drug candidates. *Int J Pept Res Ther*. 2024;30:56.

30. White CJ, Yudin AK. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat Chem*. 2011;3:509-524.

31. Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*. 2005;10(21):1451-1458.

32. Irby D, Du C, Li F. Lipid-drug conjugate for enhancing drug delivery. *Mol Pharm*. 2017;14(5):1325-1338.

33. Weerasinghe L, Selvaraj S. Peptides for drug delivery with nanomaterials. In: *Peptides in nanotechnology*. Boca Raton: CRC Press; ISBN: 9781003617686; 2025.

34. Gómara MJ, Haro I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14:531-546.

35. Pandey S, Malviya G, Chottova Dvorakova M. Role of peptides in diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8828.

36. Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Wegrzyn G. Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiol Rev*. 2022;46(2):1-25.

37. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8:871-874.

38. Cretich M, Gori A, *Peptide microarrays*. Methods Mol Biol. Humana Press, ISBN: 978-1-10716-27631-0; 2023.

39. Wasilewski T, Neubauer D, Pereira M, Kamysz W, Fernandes E. Unlocking the diagnostic potential of peptides in lateral flow assays. *TrAC Trends Anal Chem*. 2026;195:118561.

40. Shabsigh M, Solomon LA. Peptide PET imaging: a review of recent developments and a look at the future of radiometal-labeled

peptides in medicine. *Chem Biomed Imaging*. 2024;2(9):615-630.

41. Varnier OE, Närvänen A, Korkolainen M, Lillo F, Kontio S, Elm J, Suni J, Vaheri A, Huhtala ML. Synthetic peptides in HIV antibody screening and typing. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;626:502-515.

42. Richalet-Sécordel PM, Van Regenmortel MH. A new capture test using conjugated peptides for the detection of HIV antibodies. *FEMS Microbiol Immunol*. 1991;4(1):57-64.

43. Alcaro MC, Peroni E, Rovero P, Papini AM. Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(4):285-290.

44. Woo J, Orozco E, Thota SS, Chabi M, Kourentzi K, Willson R, Kay BK. Isolation of peptide ligands for the HIV capsid protein p24 by phage-display. *Int J Pept Res Ther*. 2025;31:32.

45. Gauna A, Losada S, Lorenzo M, Bermudez H, Toledo M, Pérez H, Chacon E, Noya O. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods*. 2015;427:1-5.

46. Gómara MJ, Riedemann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods*. 2000;234(1-2):23-34.

47. Wu Y, Ding Y, Shen C. A systematic review of T cell epitopes defined from the proteome of hepatitis B virus. *Vaccines*. 2022;10(2):257.

48. Meng Z, Song R, Chen Y, Zhu Y, Tian Y, Li D, Cui D. Rapid screening and identification of dominant B cell epitopes of HBV surface antigen by quantum dot-based fluorescence polarization assay. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):118.

49. Gu S, Liu Z, Lin L, Zhong S, Ma Y, Li X, Ye G, Wen C, Li Y, Tang L. Identification and mapping of HBsAg loss-related B-cell

linear epitopes in chronic HBV patients by peptide array. *Front Immunol*. 2021;12:767000.

50. Berasain C, García-Granero M, Riezu-Boj JI, Civeira MP, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Detection of anti-hepatitis C virus antibodies by ELISA using synthetic peptides. *J Hepatol*. 1993;18(1):80-84.

51. Jackson P, Petrik J, Alexander GJ, Pearson G, Allain JP. Reactivity of synthetic peptides representing selected sections of hepatitis C virus core and envelope proteins with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma. *J Med Virol*. 1997;51(1):67-79.

52. Zilouchian H, Faqah O, Kabir MA, Gross D, Pan R, Shaifman S, Younas MA, Haseeb MA, Thomas E, Asghar W. Current and future diagnostics for hepatitis C virus infection. *Chemosensors*. 2025;13(2):31.

53. Xavier SR, dos Santos Barcelos IC, Gandra IB, Pereira SP, Ribeiro AJ, Silva KA, Resende CAA, da Silva Lopez L, Machado RRC, Silva SLM, Silva SL, Ferreira CL, de Souza ALF, Souza BR, Passos-Silva AM, da Paz CM, Fumagalli CMA, Coelho FEA, Gluchetti CR, Machado MJ, Gonçalves AAM, dos Santos Pereira S, da Matta DA, Vieiras DS, Galdino AS. Proteins and peptides as antigen candidates for the immunodiagnosis of hepatitis D. *Amino Acids*. 2025;57:35.

54. Khudyakov YE, Lopareva EN, Jue DL, Crews TK, Thyagarajan SP, Fields HA. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):2863-2871.

55. Fernández L, Bleda MJ, Gómara MJ, Haro I. Design and application of GB virus C (GBV-C) peptide microarrays for diagnosis of GBV-C/HIV-1 co-infection. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(12):3973-3982.

56. Jiang HW, Li Y, Tao SC. SARS-CoV-2 peptides/epitopes for specific and sensitive diagnosis. *Cell Mol Immunol*. 2023;20:540-542.

57. Scarpellini P, Tasca S, Galli L, Beretta A, Lazzarin A, Fortis C. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3469-3474.

58. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149(3):177-184.

59. Mustafa AS. In silico analysis and experimental validation of Mycobacterium tuberculosis-specific proteins and peptides for immunological diagnosis and vaccine development. *Med Princ Pract*. 2013;22 Suppl 1:43-51.

60. Borghezan LA, Sousa Machado LC, Neves Oliveira IB, Fangudes MI, Apolidorio NS, da Siva RCD, Freire VC, Schafer AA, Scussel R, Machado-de-Avila RA. Design of epitopes from Treponema pallidum lipoprotein antigens for syphilis diagnosis and treatment prognosis. *ACS Infect Dis*. 2025;11(6):1606-1622.

61. Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(4):299-308.

62. Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*. 1994;32(4):971-974.

63. Kusi KA, Amoah LE, Acquah FK, Emuson NA, Frempong AF, Ofori EA, Akyra-Mensahk K, Kyei-Baafoor E, Osei F, Frimpong A, Sihgh SK, Theisen M, Remarque EJ, Faber BW, Belmonte M, Ganeshan H, Huang J, Villasante E, Sedegah M. Plasmodium falciparum AMA1 and CSP antigen diversity in parasite isolates from southern Ghana. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1375249.

64. Vahidfar N, Farzanehfar S, Abbasi M, Mirzaei S, Delpassand ES, Abbaspour F, Salehi Y, Biersack HJ, Ahmadzadehfar H. Di-

agnostic value of radiolabelled somatostatin analogues for neuroendocrine tumour diagnosis: the benefits and drawbacks of [64Cu]Cu-DOTA-TOC. *Cancers (Basel)*. 2022;14(8):1914.

65. Ma Y, Gao F. Advances of radiolabeled GRPR ligands for PET/CT imaging of cancers. *Cancer Imaging*. 2024;24:19.

66. Jin W, Qin B, Chen Z, Liu H, Barve A, Cheng K. Discovery of PSMA-specific peptide ligands for targeted drug delivery. *Int J Pharm*. 2016;513(1-2):138-147.

67. Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, Wu APW, Sahbaie P, Crawford JM, Lowe AW, Contag CH, Wang TD. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med*. 2008;14(4):454-458.

68. Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Molecular biosensors for electrochemical detection of infectious pathogens in liquid biopsies: current trends and challenges. *Sensors*. 2017;17:2533.

69. Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL, Senekowitsh-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M. Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res*. 2001;61(5):1781-1785.

70. Rezvani K, Yong AS, Savani BN, Mielke S, Keywanfar K, Gostik E, Price BA, Douek DC, Barrett J. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1-specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;110(1):1924-1932.

71. Montero-Calle, A, Garranzo-Asensio M, Moreno-Casbas MT, Campuzano S, Barderas R. Autoantibodies in cancer: a systematic review of their clinical role in the most prevalent cancers. *Front. Immunol*. 2024;15:1455602.

72. Sim KY, Park SH, Choi KY, Park JE, Lee JS, Kim BC, Gwak J,

Song WK, Lee KM, Park SG. High-throughput epitope profiling of antibodies in the plasma of Alzheimer's disease patients using random peptide microarrays. *Sci Rep*. 2019;9(1):4587.

73. Wiesehan K, Stöhr J, Nagel-Steger L, van Groen T, Riesner D, Willbold D. Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Eng Des Sel*. 2008;21(4):241-246.

74. Yanamandra K, Gruden MA, Casaite V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA. α-Synuclein Reactive Antibodies as Diagnostic Biomarkers in Blood Sera of Parkinson's Disease Patients. *PLOS ONE* 2011;6(4):e18513.

75. Teniou A, Rhouati A, Marty JL. Recent advances in biosensors for diagnosis of autoimmune diseases. *Sensors (Basel)*. 2024;24(5):1510.

76. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van der Hougen FHJ, Hazes JMW, Breesueld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing citrullinated peptides. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):155-163.

77. van Venrooij WJ, van Beers JJ, Pruijn GJ. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(7):391-398.

78. Li X, Li H, Hu Q, Lin J, Zhang Q, Li Y, Li J, Chen T, Zhang Q, Qiu Y. Detection of epitopes in systemic lupus erythematosus using peptide microarray. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6533-6541.

79. Mothes T. Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. *Adv Clin Chem*. 2007;44:35-63.

80. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2007;148:1-16.

81. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.

82. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol*. 2009;8(5):475-490.

83. Haro I, Sanmartí R, editors. Rheumatoid arthritis: current advances in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(6):697.

84. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580-1588.

85. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101:273-278.

86. Perez ML, Gomara MJ, Kasi D, Alonso A, Viñas O, Ercilla G, Sanmartí R, Haro I. Synthesis of overlapping fibrin citrullinated peptides and their use for diagnosing rheumatoid arthritis. *Chem Biol Drug Des*. 2006;68:194-200.

87. Perez ML, Gomara MJ, Ercilla G, Sanmartí R, Haro I. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis. *J Med Chem*. 2007;50:3573-3584.

88. Malakoutikhah M, Gomara MJ, Gomez-Puerta JA, Sanmartí R, Haro I. The use of chimeric vimentin citrullinated peptides for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Med Chem*. 2011;54:7486-7492.

89. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum*. 2008;58:3009-3019.

90. Sebbag M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J, Serre G. Epitopes of human fibrin recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol*. 2006;36:2250-2263.

91. Sanmartí R, Graell E, Perez ML, Ercilla G, Viñas O, Gómez-Puerta JA, Gratacos J, Balsa A, Gómara MJ, Larrosa M, Cañete JD, Haro I. Diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric fibrin/filaggrin citrullinated synthetic peptides in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R135.

92. Gomara MJ, Rodríguez J, Bleda MJ, Salvador JP, Sanmartí R, Haro I. Comparative study of the diagnostic and prognostic value of antibodies against chimeric citrullinated synthetic peptides and CCP3/CCP3.1 assays. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:285-293.

93. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, Sonderstrup G, Monach P, Drijfhout JW, van Venrooij WJ, Utz PJ, Genovese MC, Robinson WH. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2645-2655.

94. Wagner CA, Sokolove J, Lahey LJ, Bengtsson C, Saevarsdottir S, Alfredsson L, Delanoy M, Lindstrom TM, Walker RP, Bromberg R, Chandra PE, Binder SR, Klareskog L, Robinson WH. Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP-negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 “shared epitope” alleles. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:579-586.

95. Rönnelid J, Hansson M, Mathsson-Alm L, Cornillet M, Reed E, Jakobsson PJ, Alfredsson L, Holmdahl R, Skriner K, Serre G, Lundberg K, Klareskog L. Anticitrullinated protein/peptide antibody multiplexing defines an extended group of ACPA-positive

rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2018;77:203-211.

96. García-Moreno C, Gomara MJ, Bleda MJ, Sanmartí R, Haro I. Development of a multiplex assay based on chimeric citrullinated peptides as proof of concept for diagnosis of rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2019;14:e0215927.

97. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen PA, Levarht NEW, van der Helm-van Mil AHM, Cerami A, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw, LA. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:7372-7377.

98. Verheul MK, van Erp SJH, van der Woude D, Levarht EWN, Mallat MJK, Verspaget HW, Stolk J, Toes REM, van der Meulen-de Jong AE, Hiemstra PS, van Kooten C, Trouw LA. Anti-carbamylated protein antibodies: a specific hallmark for rheumatoid arthritis. Comparison to conditions known for enhanced carbamylation; renal failure, smoking and chronic inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:1575-1576.

99. Castellanos-Moreira R, Rodríguez-García SC, Gomara MJ, Ruiz-Esquide V, Cuervo A, Casafont-Sole I, Ramirez J, Holgado S, Gómez-Puerta JA, Cañete JD, Haro I, Sanmartí R. Anti-carbamylated proteins antibody repertoire in rheumatoid arthritis: evidence of a new autoantibody linked to interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis*. 2020;79:587-594.

100. García-Moreno C, Gómara MJ, Castellanos-Moreira R, Sanmartí R, Haro I. Peptides bearing multiple post-translational modifications as antigenic targets for severe rheumatoid arthritis patients. *Int J Mol Sci*. 2021;22:13290.

101. Sanmarti R, Pérez-García C, de Toro FJ, Salvador G, Escudero-Contreras A, Cuervo A, Graell E, Reina D, Kanterewicz E, Corominas H, Urionaguena-Onaindia I, López-Lasanta M, Olivé A, Sala-Gómez M, Frade-Sosa B, Morlà-Novell RM, Polino L, Meraz-Ostiz JA, Oreiro N, Blanco FJ, Pérez-Nadales I, Ortega-

Castro R, Busquets-Pérez N, Gómez-Centeno AD, Camacho O, Rodríguez-Cros JR, Millan-Arciniegas AM, García-Llorente JF, Borrell H, Prior-Español A, Castell-Quiñones S, Cruceta A, Bonfill E, Domenech-Gómez G, Roca-Fàbregas A, Ríos J, Tobalina-Maestre L, Gómara MJ, Haro I. Abatacept vs hydroxychloroquine for prevention of rheumatoid arthritis in individuals with palindromic rheumatism: a randomized open-label trial. *Nat Med*. 2026;32:2610-2618.

102. Zhai S, Liu T, Lin S, eLi D, Liu H, Yao X, Hou T. Artificial intelligence in peptide-based drug design. *Drug Discov Today*. 2025;30(2):104300.

103. Choudhury PR, Mishra SK, Yadav S, Singh S, Mathur P. In silico peptide design: methods, resources, and role of AI. *J Pept Sci*. 2025;31(12):e70063.



REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA