

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 882**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07765933 .2**

96 Fecha de presentación: **03.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2026830**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54

Título: **Péptidos moduladores de la activación de macrófagos, utilizables para el tratamiento de la artritis reumatoide**

30

Prioridad:

03.05.2006 FR 0603956

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73

Titular/es:

**UNIVERSITE PAUL SABATIER (100.0%)
118 ROUTE DE NARBONNE
31062 TOULOUSE CEDEX 9, FR**

72

Inventor/es:

**CLAVEL, CYRIL;
SEBBAG, MIREILLE;
NOGUEIRA, MARIA LEONOR y
SERRE, GUY**

74

Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 392 882 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos moduladores de la activación de macrófagos, utilizables para el tratamiento de la artritis reumatoide.

5 La presente invención se refiere a un modelo in vitro de activación de macrófagos, inducida por inmunocomplejos entre IgG específicas de la artritis reumatoide (en lo sucesivo abreviado "AR") y sus dianas citrulinadas, y a su uso para identificar moléculas que tienen propiedades de modulación de la inflamación.

10 La artritis reumatoide es el más frecuente de los reumatismos inflamatorios crónicos. Se trata de una enfermedad autoinmunitaria, y el suero de los pacientes que la padecen contiene autoanticuerpos algunos de los cuales son específicos, y pueden constituir un marcador de esta enfermedad que permite su diagnóstico incluso en estados precoces. Por lo tanto, se han realizado investigaciones con vistas a identificar antígenos reconocidos por estos anticuerpos, con el fin de obtener preparaciones purificadas que se puedan usar en técnicas clásicas de diagnóstico inmunológico.

15 Se ha mostrado que autoanticuerpos (IgG) específicos de la AR reconocen diferentes variantes isoeléctricas de la (pro)filagrina (para una revisión, véase por ejemplo SERRE y VINCENT, en: *Autoantibodies*, PETER y SHOENFELD Eds, Elsevier Science Publishers, 271 – 276, 1996). Por esta razón estos autoanticuerpos se han denominado: "autoanticuerpos dirigidos contra filagrina (AAF)". La solicitud EP 0511116 describe la purificación y caracterización de antígenos de la familia de las filagrinas reconocidos por estos anticuerpos, y su uso para el diagnóstico de la artritis reumatoide.

25 Posteriormente se han identificado los epítomos de la filagrina reconocidos por los AAF como regiones de la molécula de filagrina portadoras de restos citrulina, que resultan de la transformación de restos arginilo por una peptidilarginina desaminasa (Girbal-Neuhauser E. y col., *J. Immunol.*, 162, 585 – 94, 1999; Schellekens G.A. y col., *J. Clin. Invest.*, 101, 273 – 81, 1998). El análisis de diferentes péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la filagrina humana, ha mostrado que la desiminación (citrulinación) era necesaria para la constitución de los epítomos reconocidos por los AAF, que actualmente se llaman también autoanticuerpos dirigidos contra péptidos citrulinados (AAPC).

30 Se han obtenido numerosos péptidos citrulinados reconocidos específicamente por los AAPC, y que se pueden usar para el diagnóstico de la AR, a partir de la filagrina (solicitud EP 0929669, solicitud EP 1475438), así como de otras proteínas citrulinadas, entre las que se puede citar en particular la fibrina (Demande WO 01/02437) y la vimentina (Vossenaar ER y col., *Arthritis Res. Ther.* 2004; 6: R142 – R150).

35 En paralelo, se ha mostrado que los AAPC son secretados por los plasmocitos del tejido sinovial (Masson-Bessière C. y col., *Clin. Exp. Immunol.*, 119, 544 – 52, 2000) y se dirigen específicamente contra las formas citrulinadas de las cadenas α y β de fibrina presentes en este tejido (Masson-Bessière C. y col., *J. Immunol.*, 166, 4177 – 84, 2001; solicitud PCT WO 01/02437).

40 Se ha sugerido que la formación de inmunocomplejos (en lo sucesivo abreviado "IC") entre los AAPC y los epítomos citrulinados específicos de estos, presentes en el tejido sinovial, tendría una función en la patogénesis de la artritis reumatoide y en particular en el desencadenamiento y el mantenimiento de la reacción inflamatoria. Van Gaalen y col. (*Journal of Immunology*, 175, 5575, 2005) proponen un modelo para explicar la función de los AAPC in vivo en la AR, en el que los inmunocomplejos formados entre los AAPC y proteínas citrulinadas presentes en el tejido sinovial, activan el complemento. Esta activación del complemento provocaría la liberación de C5a (fragmento del complemento que se conoce como uno de los mediadores preponderantes en la inflamación). Además, la ruta del complemento permitiría atraer y activar granulocitos, monocitos, macrófagos y mastocitos en el sitio de la inflamación.

50 Fournier (*Joint Bone Spine*, 72, 527, 2005) describe la función de los linfocitos T en el desarrollo de la AR. Describe que en el caso de la artrosis inducida por colágeno (CIA), modelo de estudio experimental de la AR en ratones, las citoquinas proinflamatorias (en particular TNF- α e IL-1 β) son producidas por los macrófagos en presencia de linfocitos T activados que presentan un fenotipo Th1, y que la neutralización de estas citoquinas proinflamatorias es eficaz para reducir la gravedad de la CIA.

55 Los autores de la invención han puesto a punto un modelo in vitro de la activación de macrófagos inducida por la interacción entre los IC formados a partir de los AAPC y de sus epítomos citrulinados, y los macrófagos.

60 Este modelo que imita las condiciones fisiopatológicas del tejido sinovial reumatoide, lleva a cabo la evaluación de la activación de macrófagos, después de poner en contacto in vitro a estos con los IC formados por los AAPC y polipéptidos citrulinados reconocidos por dichos AAPC.

La activación de macrófagos, que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, se puede evaluar por la

determinación de una o más de estas citoquinas (por ejemplo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, IL-15...) en los líquidos sobrenadantes de cultivo de macrófagos, después de poner en contacto a estos con dichos IC.

5 Este modelo está adaptado en particular a la evaluación de las propiedades de modulación de la inflamación de una molécula, y en particular de sus propiedades antiinflamatorias.

10 Se puede usar en particular para identificar in vitro agentes farmacológicos susceptibles de tener un efecto antagonista de la activación de los macrófagos por los IC, sea oponiéndose a la formación de los inmunocomplejos entre los AAPC y los antígenos citrulinados reconocidos por dichos AAPC, o sea oponiéndose a la unión de dichos complejos a los macrófagos.

15 La evaluación de las propiedades de modulación de la inflamación de una molécula que se va a ensayar, se puede realizar simplemente comprando la producción de una o varias citoquinas proinflamatorias en los líquidos sobrenadantes de cultivo de macrófagos activados por los IC como se ha descrito antes, en ausencia de la molécula que se va a ensayar, y en presencia de la misma.

La presente invención tiene como objeto un procedimiento de evaluación in vitro de las propiedades de modulación de la inflamación de una molécula, caracterizada porque comprende:

20 a) poner en presencia de autoanticuerpos dirigidos contra péptidos citrulinados (AAPC) un antígeno peptídico citrulinado reactivo con dichos AAPC, en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos entre dichos AAPC y dicho antígeno citrulinado;

25 b) poner en presencia de los inmunocomplejos formados en a) macrófagos, en condiciones que permitan la activación de dichos macrófagos por dichos inmunocomplejos, y determinar la cantidad de al menos una citoquina proinflamatoria producida por dichos macrófagos;

30 c) repetir la etapa a) y la etapa b) repitiéndose una y/o la otra de dichas etapas en presencia de la molécula a ensayar;

d) comparar la cantidad de citoquina o citoquinas proinflamatorias producidas en ausencia de la molécula a ensayar y en presencia de esta.

35 Ventajosamente, a la etapa a) le sigue una etapa de eliminación de las IgG que no están implicadas en la formación de inmunocomplejos con el antígeno citrulinado. Se trata, por ejemplo, de las IgG libres (que no han reaccionado con el antígeno citrulinado después de la etapa a)), o si procede, de las IgG probablemente implicadas en la formación de inmunocomplejos con la molécula a ensayar.

40 En este caso, el antígeno citrulinado se inmovilizará sobre un soporte sólido, tal como placas de microvaloración o perlas magnéticas, con el fin de permitir realizar fácilmente esta eliminación mediante lavado.

45 Los AAPC que se pueden usar para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención son, por ejemplo, IgG obtenidas a partir de un suero, o ventajosamente de una mezcla de sueros de pacientes que padecen artritis reumatoide, y presentan una reacción positiva en uno o preferiblemente en varios ensayos de referencia de detección de AAPC (por ejemplo, el ensayo de inmunofluorescencia indirecta en criosecciones de esófago de rata, descrito por Vincent C. y col., *Ann. Rheum. Dis.* 48, 712 – 22, (1989) o el ensayo ELISA en fibrinógeno humano citrulinado, descrito por Chapuy-Regaud S. y col., *Clin. Exp. Immunol.*, 139: 542 – 50, 2005). Ventajosamente, dichas IgG pueden purificarse además por cromatografía mediante un antígeno citrulinado tal como fibrinógeno citrulinado, filagrina citrulinada, vimentina citrulinada, etc. También se pueden usar cuando proceda los AAPC monoclonales o producidos por recombinación genética.

55 El antígeno citrulinado usado para la formación de los IC con los AAPC, puede ser cualquier polipéptido o mezcla de polipéptidos citrulinados (naturales u obtenidos por recombinación genética o síntesis química y después citrulinación in vitro) capaz de reaccionar con dichos AAPC. Puede tratarse en particular de la filagrina citrulinada (solicitud EP 0511116, solicitud EP 0929669, solicitud EP 1475438), fibrina o fibrinógeno citrulinado (solicitud WO 01/02437), vimentina citrulinada (Hill A. y col., *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 538 – 541; Vossenaar E.R. y col., *Arthritis Res.* 2000, 2: 429 – 432), o fragmentos citrulinados de estas proteínas capaces de reaccionar con la preparación de AAPC usada. El experto en la materia puede verificar fácilmente, mediante ensayos inmunológicos básicos, la reactividad del antígeno citrulinado, cualquiera que sea, con una preparación de AAPC.

60 Ventajosamente, dicho antígeno citrulinado comprende un polipéptido citrulinado derivado de la fibrina, elegido entre los que se definen a continuación, o una mezcla de dos o más de estos polipéptidos.

Preferiblemente, los macrófagos usados son macrófagos de mamífero, en particular macrófagos de origen humano,

que se pueden obtener, por ejemplo, a partir de monocitos aislados mediante un anticuerpo dirigido contra CD14, y diferenciar en macrófagos por cultivo en presencia de M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos).

5 Para medir la activación de los macrófagos se puede determinar una (u opcionalmente varias) citoquina proinflamatoria, seleccionada preferiblemente entre el TNF- α (factor de necrosis tumoral α), interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8), GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), e interleuquina 15 (IL-15). Una citoquina proinflamatoria preferida es el TNF- α , producido en abundancia por los macrófagos del tejido sinovial reumatoide y que tiene una función principal en la inflamación y la destrucción articular (Feldmann M. y col., *Annu. Rev. Immunol.* 14: 397 – 440, 1996).

10 Las concentraciones de AAPC y de antígeno peptídico citrulinado que permiten una formación óptima del inmunocomplejo y una activación óptima de los macrófagos, pueden depender en particular de la preparación de los AAPC, y de la de los antígenos peptídicos usados. El experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones de reacción óptimas mediante ensayos sencillos de calibración rutinarios, como los descritos en los ejemplos más adelante.

15 La invención tiene además por objeto un estuche (o bolsa o kit) para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende un antígeno peptídico citrulinado opcionalmente inmovilizado sobre un soporte sólido, y autoanticuerpos dirigidos contra péptidos citrulinados (AAPC) capaces de formar un inmunocomplejo con dicho antígeno.

Dicho estuche puede comprender además medios para administrar una o varias citoquinas proinflamatorias.

20 Opcionalmente dicho estuche comprende además M-CSF y un medio de selección de monocitos, tal como un soporte revestido de anticuerpos dirigidos contra CD-14.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de selección de moléculas moduladoras de la inflamación, caracterizado porque comprende:

30 - llevar a cabo con cada una de las moléculas a ensayar un procedimiento de evaluación de las propiedades de modulación de la inflamación de dicha molécula, como se ha definido antes,

35 - seleccionar las moléculas capaces de modificar la cantidad de la o las citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos.

Según un modo preferido de llevar a cabo un procedimiento de selección de acuerdo con la invención, se trata de un procedimiento de selección de moléculas antiinflamatorias, y comprende la selección de moléculas capaces de disminuir la cantidad de citoquina o citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos.

40 Las moléculas antiinflamatorias capaces de disminuir la cantidad de citoquina o citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos, cuando se lleva a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención, se pueden usar en particular para preparar medicamentos dirigidos al tratamiento de enfermedades inflamatorias que implican inmunocomplejos que asocian AAPC y antígenos citrulinados, y en particular de la artritis reumatoide.

45 En este contexto, la presente invención tiene también por objeto un péptido citrulinado, capaz de disminuir la cantidad de TNF- α producida por los macrófagos cuando se lleva a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención, para usar como medicamento, en particular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, y en particular de la artritis reumatoide.

50 Dicho péptido se selecciona del grupo que comprende los siguientes péptidos:

55 - un péptido definido por la secuencia $X_1PAPPPISGGGYX_2AX_3$ (SEQ ID NO: 1) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulinilo o un resto arginilo, y X_3 es un resto citrulinilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 20 aminoácidos, que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulinilo X_3 ;

60 - un péptido definido por la secuencia $GPX_1VVEX_2HQSACKDS$ (SEQ ID NO: 2) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulinilo o un resto arginilo, y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulinilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 20 aminoácidos, que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho o dichos restos citrulinilo.

Ventajosamente, dicho péptido se selecciona del grupo que comprende los siguientes péptidos:

- un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 y X_2 son restos arginilo y X_3 es un resto citrulinilo, o un péptido

de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrullilo;

5 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 es un resto arginilo y X_2 y X_3 son restos citrullilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrullilo;

10 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_2 es un resto arginilo y X_1 y X_3 son restos citrullilo, o un péptido de 16 a 25 aminoácidos que comprende dichos restos citrullilo;

- un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrullilo, o un péptido de 16 a 25 aminoácidos que comprende dichos restos citrullilo;

15 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 es un resto arginilo y X_2 es un resto citrullilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrullilo;

20 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 es un resto citrullilo y X_2 es un resto arginilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrullilo;

25 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 y X_2 son restos citrullilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrullilo.

30 Los péptidos citrulinados que se pueden usar como medicamento de acuerdo con la invención abarcan también derivados de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 5, o fragmentos de estos como se ha definido antes, llevando dichos derivados modificaciones dirigidas a mejorar su reconocimiento por los AAPC: a modo de ejemplo de dichos derivados, se pueden citar: péptidos cíclicos; péptidos de tipo *retro* en los que los L-aminoácidos están encadenados según una secuencia inversa a la del péptido que se va a reproducir; péptidos de tipo *retro-inverso*, constituidos por aminoácidos de la serie D (en lugar de aminoácidos de la serie L de los péptidos naturales) encadenados según una secuencia inversa a la del péptido que se va a reproducir.

35 Muy ventajosamente, se trata de péptidos en los que la función carboxilo terminal (COOH) se sustituye por una función carboxamida (CONH₂). En este contexto, son péptidos particularmente preferidos aquellos en los que el resto C-terminal es un resto citrullilo cuya función carboxilo se ha sustituido por una función carboxamida, por ejemplo, en el caso del péptido definido por la SEQ ID NO: 1, cuando al menos X_3 es un resto citrullilo.

40 Los péptidos citrulinados que se pueden usar como medicamento de acuerdo con la invención, abarcan también derivados de péptidos de SEQ ID NO: 1 a 5, o fragmentos de estos tal como se ha definido antes, llevando dichos derivados modificaciones dirigidas a facilitar su síntesis y/o a mejorar su estabilidad. A modo de ejemplo de dichos derivados, se pueden citar los péptidos que incluyen aminoácidos cuyos grupos carboxilo están esterificados o transformados en grupos amida y/o aminoácidos cuyo grupo amina está alquilado, por ejemplo metilado o acetilado. Los grupos amina y carboxilo de los péptidos se pueden presentar en forma de la sal correspondiente a la base o al ácido.

50 A partir de los péptidos citrulinados descritos antes, se pueden obtener péptidos mimótopos que comprenden al menos un resto citrullilo (péptido mimótopo citrulinado), que se pueden usar también como medicamentos de acuerdo con la invención.

55 Estos péptidos mimótopos se pueden obtener por síntesis de bibliotecas de péptidos citrulinados cuyas secuencias se definen a partir de las de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 5, utilizados en este contexto como "péptidos modelo" y llevando a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, para evaluar las propiedades antiinflamatorias de estos péptidos.

60 Preferiblemente, estas bibliotecas de péptidos se realizan por síntesis de diferentes péptidos de tamaños comprendidos entre 10 y 20, preferiblemente entre 12 y 17 aminoácidos, en particular 15 aminoácidos. Cada uno de estos péptidos conserva al menos 2, preferiblemente al menos 4, ventajosamente al menos 6, de forma particularmente preferidos al menos 8, y de forma muy ventajosa al menos 10 aminoácidos, con al menos un resto citrullilo de la secuencia del péptido modelo elegido, en las mismas posiciones que en dicho péptido modelo, siendo las otras posiciones variables.

Los procedimientos de síntesis de péptidos mimótopos son bien conocidos. Se puede hacer referencia, por ejemplo, al capítulo 6 de "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins", Paul Lloyd-Williams, Fernando

Albericio and Ernest Giralt, CRC Press New York, 1997, "Peptides libraries", páginas 237 – 270.

De acuerdo con la invención, los péptidos citrulinados definidos anteriormente se pueden usar solos, en combinación entre ellos, o, si procede, con otros péptidos citrulinados.

5 La presente invención tiene así por objeto composiciones farmacéuticas caracterizadas porque comprenden como principio activo, al menos un péptido citrulinado, como se ha definido antes.

10 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden asociar entre sí, por ejemplo, diferentes péptidos citrulinados elegidos entre los definidos antes, o pueden asociar uno o varios de dichos péptidos, con uno o varios péptidos citrulinados derivados en particular de la filagrina.

15 Según un modo de realización preferido de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, comprende al menos un péptido de SEQ ID NO: 1, y al menos un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2, tal como se ha definido antes, y cuando proceda puede comprender además un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3 y/o un péptido de secuencia SEQ ID NO: 4 y/o un péptido de secuencia SEQ ID NO: 5, como se han definido antes.

20 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender además excipientes o aditivos usados habitualmente en farmacia.

La invención se comprenderá mejor mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes y que se presentan aquí con fin ilustrativo.

FIGURAS

25 **Figura 1:** Medida de la tasa de TNF- α (pg/ml) secretada por los macrófagos en presencia de fibrinógeno citrulinado o no citrulinado, y de diferentes concentraciones de AAPC (0; 0,28; 0,56; 1,13; 2,25; 4,50 y 9,00 mg/ml) (IgG AAPC+), o de IgG de control. La tasa de TNF- α se mide también con los macrófagos en presencia de IgG agregadas por calor (IgG agregadas), lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o dejados solo en medio de macrófagos-SFM (medio).

30 **Figura 2:** Efecto de concentraciones crecientes (de 0,006 a 1,56 mg/ml) de fibrinógeno citrulinado (cruces) o no citrulinado (trazo), péptido α 36-50Cit_{38,42} (rombo), péptido α 36-50 (cruces de 6 ramas), péptido β 60-74Cit_{60,72,74} (cuadrado), péptido β 60-74 (círculo), mezclas de péptidos α 36-50Cit_{38,42} y β 60-74Cit_{60,72,74} (triángulo) o de péptidos α 36-50 y β 60-74 (guión vertical) en el porcentaje de inhibición de la reactividad de los AAPC+ frente al fibrinógeno citrulinado.

35 **Figura 3:** Medida de la tasa de TNF- α (pg/ml) secretada por los macrófagos en presencia de fibrinógeno citrulinado o no citrulinado (control) y de IgG AAPCC+ 1,13 mg/ml, y en presencia o ausencia de los siguientes competidores: fibrinógeno citrulinado o no citrulinado (4,0 mg/ml), péptido β 60-74Cit_{60,72,74} o péptido β 60-74 (0,8 ó 4,0 mg/ml).

EJEMPLO 1: EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LOS INMUNOCOMPLEJOS QUE ASOCIAN FIBRINÓGENO CITRULINADO Y AAPC.

45 El presente ejemplo se refiere a la realización del modelo de estimulación in vitro de macrófagos por inmunocomplejos formados a partir de AAPC y de epítomos citrulinados reactivos con dichos AAPC.

50 Se purifican monocitos a partir de células mononucleares sanguíneas de individuos sanos mediante un anticuerpo dirigido contra CD14 acoplado a perlas magnéticas. Estos monocitos se diferencian en macrófagos por cultivo durante 7 días en presencia de M-CSF y después se estimulan con los IC inmovilizados.

Estos últimos se reconstituyen haciendo reaccionar los AAPC purificados a partir de sueros de pacientes que padecen AR, con fibrinógeno humano citrulinado adsorbido en el fondo de la placa de cultivo. La activación de los macrófagos se aprecia por su secreción de TNF α , determinada en los líquidos sobrenadantes de cultivo después de 24 h de contacto.

Los detalles técnicos que han permitido realizar este modelo de estimulación de macrófagos se describen a continuación.

60 Preparación de macrófagos:

A partir de muestras de sangre o de concentrados leucocitarios de individuos sanos (Établissement Français du Sang, Toulouse, Francia) se separan las células mononucleares de restos y de otras células sanguíneas por centrifugación durante 20 min a 1200 g sobre Ficoll (Ficoll 400®, disolución de separación isoton Biocoll, 1,077 g/ml,

Biochrom AG, Berlín, Alemania) en una cantidad de 15 ml de Ficoll por 30 ml de suspensión celular diluida a 1/2 en PBS (disolución salina tamponada con fosfato) a pH 7,4, que contiene albúmina sérica al 0,1 % (BSA, Sigma-Aldrich Chimie, St Quentin Fallavier, Francia) y citrato sódico al 0,6 % (esta disolución se denominará en lo sucesivo PBNaCit). Después de 2 lavados con 25 ml de PBNaCit, se cuentan las células viables mediante una cámara de recuento después de coloración con azul de Trypan al 0,4 %. Se lleva a cabo una selección positiva de las células de la línea de monocitos (que expresan el marcador CD14) mediante un anticuerpo dirigido contra CD14 humano acoplado a perlas magnéticas (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Paris, Francia). Se incuba una mezcla respetando una proporción de 140 µl de anticuerpo dirigido contra CD14 y 1200 µl de PBNaCit para 140x10⁶ células mononucleares, durante 15 minutos a 4 °C. Después de lavado con 25 ml de PBNaCit, la suspensión celular se carga en una columna que contiene perlas ferromagnéticas (columna MS, Miltenyi Biotec) acondicionada con 1 ml de PBNaCit y se pone en un campo magnético. Después de 3 lavados con 500 µl de PBNaCit que permiten eliminar las células que no expresan CD14, la columna se separa del campo magnético y las células marcadas por el anticuerpo dirigido contra CD14 son capturadas mediante 500 µl de PBNaCit. Se cuentan las células viables mediante una cámara de recuento después de coloración con azul de Trypan al 0,4 %. Después, los monocitos se cultivan con una relación de 10⁶ células viables/ml en medio de macrófagos-SFM (medio desprovisto de suero diseñado para el cultivo de monocitos y macrófagos periféricos humanos, Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) con adición de suero de ternero fetal (al 10 %, v/v, Biowest, Nuailié, Francia) y de M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos) 100 ng/ml (Peprotech, Levallois-Perret, Francia) en pocillos de teflón, durante 7 días a 37 °C, en atmósfera que contiene 5 % de CO₂. Al final de esta incubación, se obtienen los macrófagos. Estos se lavan con medio de macrófagos-SFM y después se cuentan las células viables mediante una cámara de recuento después de coloración con azul de Trypan al 0,4 %.

Citrulinación (desiminación) de fibrinógeno humano

Se eliminan las IgG contaminantes residuales de una preparación comercial de fibrinógeno humano purificado (Calbiochem, Meudon, Francia) por cromatografía de afinidad en columna de proteína G (HiTrap Protein G, GE Healthcare, Orsay, Francia) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Después, el fibrinógeno se incuba durante 2 h a 37 °C en un tampón de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, CaCl₂ 10 mM, ditiotreitilo 5 mM y en presencia o ausencia de peptidilarginina desiminasa de músculo esquelético de conejo (Sigma-Aldrich) en una relación de 7 U de enzima/mg de fibrinógeno. Las diferentes cadenas constitutivas del fibrinógeno, disociadas tras la incubación en este tampón reductor de los enlaces disulfuro, después se reasocian por diálisis frente a PBS que se continua hasta la reasociación completa de las diferentes cadenas, controlado por PAGE-SDS en condiciones no reductoras. Se obtienen así dos preparaciones de fibrinógeno: citrulinado (incubado en presencia de enzima) y no citrulinado (incubado en ausencia de enzima).

Preparación de IgG humanas agregadas por calor

Las IgG humanas agregadas solubles (denominadas en lo sucesivo IgG agregadas) se preparan por incubación a 63 °C durante 20 min de una disolución de IgG humanas purificadas de individuos sanos (Sigma-Aldrich) con 2 mg/ml de PBS. Después de centrifugación a 12000 g, se recupera el líquido sobrenadante que contiene las IgG humanas agregadas solubles y se usa extemporáneamente.

Preparación de una mezcla de IgG AAPC-positiva

Se prepara una mezcla de IgG AAPC-positiva (denominada en lo sucesivo IgG AAPC+) aislando la fracción de IgG de una mezcla a partes iguales de 38 sueros de pacientes que padecen AR que presentan una valoración sérica elevada de AAPC, por cromatografía de afinidad en columna de proteína G de 5 ml (HiTrap Protein G, GE Healthcare, Orsay, Francia). Después de equilibrar la columna con tampón de KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 M, pH 7,0, se cargan en la columna 40 ml de mezcla de sueros diluidos a 1/4 en el mismo tampón y pasados por un filtro de 0,22 µm, en una cantidad de 2 ml por min. Después de lavado de la columna con 5 volúmenes de KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 M, pH 7,0, que contiene NaCl 1 M, las IgG totales AAPC+ se eluyen en tampón de glicina-HCl 0,2 M, pH 2,7. Las fracciones de las eluciones se ponen inmediatamente a pH neutro por adición de Tris 2 M. Las fracciones más ricas en IgG se localizan por seguimiento de la densidad óptica a 280 nm (Biophotomètre Eppendorf, Eppendorf, Dominique Dutscher, Brumath, Francia), se reagrupan y se dializan frente a KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 M pH 7,0, que contiene NaCl 0,5 M, se pasan a través de un filtro de 0,22 µm y después se distribuyen en partes alícuotas y se almacenan a -20 °C hasta su uso. La calidad de la purificación es controlada por la coloración con azul de Coomassie después de electroforesis en un sistema PHAST automático (GE Healthcare, Orsay, Francia) en gel de PAGE-SDS al 12,5 %.

Preparación de una mezcla de IgG AAPC-negativa

Se prepara una mezcla de IgG AAPC-negativa (denominada en lo sucesivo IgG de control) aislando la fracción de IgG de una mezcla a partes iguales de 20 sueros humanos que presentan una valoración nula después de dosificación de los AAPC, por dos ensayos de referencia, inmunofluorescencia indirecta en criosecciones de

esófagos de rata (Vincent C. y col., *Ann. Rheum. Dis.* 48, 712 – 22, (1989) y ELISA en fibrinógeno humano citrulinado (Chapuy-Regaud S. y col., *Clin. Exp. Immunol.*, 139: 542 – 50, 2005). El aislamiento de la fracción de IgG se realiza por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G exactamente según el protocolo usado para la preparación de las IgG AAPC+.

5

Reconstitución de inmunocomplejos (IC) que asocian AAPC y fibrinógeno citrulinado:

La reconstitución de los IC que asocian AAPC y fibrinógeno citrulinado se realiza por revestimiento en condiciones estériles de placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Nuncclon delta, Nunc, Roskilde Danemark) con fibrinógeno humano citrulinado 10 µg/ml, añadiéndose en una cantidad de 50 µl/pocillo e incubando durante una noche a 4 °C. Después las placas se saturan en PBS pH 7,4 con BSA al 2 %, durante 1 h a 4 °C (180 µl/pocillo). Después de 3 lavados con PBS pH 7,4 con Tween-20 al 0,1 %, los pocillos se incuban durante 2 h a 4 °C con 100 µl de IgG AAPC+ en diferentes concentraciones (que varían de 9 a 0,28 mg/ml) diluidas en PBS que contiene BSA al 2 % y NaCl 2 M. Los controles negativos se constituyen de la misma forma usando fibrinógeno humano no citrulinado como antígeno de revestimiento en el fondo de la placa, o bien IgG de control como anticuerpos. Se utilizan también pocillos revestidos solo de fibrinógeno humano citrulinado o no citrulinado y saturados con PBS pH 7,4 con BSA al 2 %, como controles negativos.

Estimulación de macrófagos:

Después de 3 lavados con PBS pH 7,4 con Tween-20 al 0,1 %, y después 3 lavados con PBS, se añaden los macrófagos en una cantidad de 50.000 células viables/pocillo en un volumen de 200 µl. Después de incubación durante 24 h a 37 °C en atmósfera que contiene 5 % de CO₂, se recuperan los líquidos sobrenadantes (160 µl/pocillo) que se congelan rápidamente a -20 °C hasta su análisis. El control negativo de activación se realiza mediante macrófagos en medio de macrófagos-SFM solo. Los macrófagos puestos en IgG agregadas inmovilizadas en el fondo de las placas de cultivo por adsorción pasiva (en una cantidad de 100 µl de una disolución de 5 µg/ml por pocillo), o puestos en presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS, *Escherichia coli* 055: B5 0,5 µg/ml final; Sigma-Aldrich Chimie) se usan como controles de la capacidad de los macrófagos para responder a un estímulo inductor de la síntesis de TNF-α.

30

Determinación del TNF-α en los líquidos sobrenadantes de cultivo

Se ha usado un estuche de determinación del TNF-α humano por ELISA, que comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección y TNF-α humano recombinante para constituir un intervalo de calibración de 7,8 a 500 pg/ml para la determinación de esta citoquina en los líquidos sobrenadantes de cultivo (Human TNF-alpha BD OptEIA™ ELISA Set, BD Biosciences Pharmingen, Pont-de-Claix, Francia).

Resultados:

Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 1. Estos datos son representativos del resultado de 7 experimentos diferentes de un total de 10 experimentos llevados a cabo con macrófagos de individuos diferentes.

La unión no específica de las IgG de control al fibrinógeno citrulinado o no y de las IgG AAPC+ al fibrinógeno no citrulinado permite deducir un nivel base de síntesis de TNF-α inferior a 40 pg/ml. Esta estimulación mejora claramente cuando los IC específicos se reconstituyen después de la interacción de las IgG AAPC+ con el fibrinógeno citrulinado, cuando se usan concentraciones de IgG AAPC+ superiores a 1,13 mg/ml. Se observa un máximo de estimulación para una concentración de IgG AAPC+ de 2,25 mg/ml y la tasa de TNF-α alcanza un valor próximo a 120 pg/ml.

Hay que indicar que cualquiera que sean las IgG usadas, la inducción del TNF-α aumenta cuando se usan concentraciones crecientes de IgG, para después disminuir de forma igualmente dependiente de la dosis (efecto de "curva campana"). Esto permite suponer que más allá de una determinada concentración de IgG inmovilizadas, se activan rutas que ejercen un efecto regulador negativo sobre la producción de TNF-α.

Como se esperaba, la estimulación por los sustitutos de los IC que constituyen las IgG humanas agregadas por el calor, induce una producción importante de TNF-α. Se producen igualmente cantidades muy importantes de TNF-α en respuesta al LPS.

Este modelo celular y molecular de origen totalmente humano permite demostrar el efecto proinflamatorio de la interacción entre macrófagos y el IC que asocia fibrinógeno citrulinado y AAPC, ya que estos complejos reconstituidos in vitro inducen específicamente la producción de TNF-α por estas células (figura 1). Esta producción es claramente mayor con respecto a la que se obtiene después de poner en contacto con las IgG de cualquier especificidad, probablemente inmovilizadas en las placas de cultivo después de una unión no específica al

fibrinógeno citrulinado o no. Igualmente depende de la cantidad de IgG AAPC+ añadido, lo que permite definir una concentración óptima que favorece la formación de los IC activadores.

EJEMPLO 2: INHIBICIÓN DE LA REACTIVIDAD DE LA IgG AAPC+ FRENTE AL FIBRINÓGENO CITRULINADO POR PÉPTIDOS CITRULINADOS DERIVADOS DEL FIBRINÓGENO Y PORTADORES DE EPÍTOPOS RECONOCIDOS POR LOS AAPC

Los autores de la invención han identificado varios péptidos citrulinados derivados de la fibrina portadores de epítopos reconocidos específicamente por los AAPC.

Estos péptidos están listados en la tabla 1.

Se usa el código estándar de una letra de los restos de aminoácidos. X indica un resto citrulilo.

La nomenclatura usada es la siguiente: nombre original de la cadena polipeptídica (α o β) del fibrinógeno del que deriva la secuencia, después posición en esta secuencia del resto amino terminal del péptido - posición del resto carboxi terminal del péptido. Estas posiciones están numeradas con respecto al extremo N-terminal de las cadenas de fibrinógeno (incluido el péptido señal). La designación cit indica que se trata de una forma citrulinada del péptido. La posición del resto arginilo que está sustituido por un resto citrulilo se indica en el índice. La nomenclatura para las formas no citrulinadas de los péptidos es la misma, salvo que se omite la designación cit y la posición de los restos arginilo. El péptido β 60-74cit_{60,72,74} tiene una función C-terminal amidada (función carboxamida: CONH₂).

TABLA 1

NOMBRE DEL PÉPTIDO	SECUENCIA
α 36-50cit _{38,42}	GPXVVEXHQSAACKDS (SEQ ID NO: 6)
α 171-185cit _{178,181}	VDIDIKIXSCXGSCS (SEQ ID NO: 7)
α 183-197cit _{186,190}	SCSXALAXEVDLKDY (SEQ ID NO: 8)
α 246-260cit ₂₅₈	PEWKALTDMPQMXME (SEQ ID NO: 9)
α 259-273cit _{263,271}	MELEXPGGNEITXGG (SEQ ID NO: 10)
α 366-380cit ₃₆₇	EXGSAGHWTSSESVS (SEQ ID NO: 11)
α 396-410cit ₄₀₄	DSPGSGNAXPNPDW (SEQ ID NO: 12)
α 411-425cit ₄₂₅	GTFEEVSGNVSPGTX (SEQ ID NO: 13)
α 501-515cit _{510,512}	SGIGTLDGFXHXHPD (SEQ ID NO: 14)
α 546-560cit ₅₄₇	SXGSESGIFTNTKES (SEQ ID NO: 15)
α 561-575cit ₅₇₃	SSHHPGIAEFPSXGK (SEQ ID NO: 16)
α 588-602cit ₅₉₁	SYNXGDSTFESKSYK (SEQ ID NO: 17)
α 621-635cit _{621,627,630}	XGHAKSXPVXGIHTS (SEQ ID NO: 18)
β 60-74cit _{60,72,74}	XPAPPPISGGGYXAX (SEQ ID NO: 19)
β 210-224cit ₂₂₄	QKLESDVSAQMEYCX (SEQ ID NO: 20)
β 281-295cit _{285,294}	VIQNXQDGSVDFGKX (SEQ ID NO: 21)
β 420-434cit ₄₂₁	PXKQCSKEDGGGWY (SEQ ID NO: 22)
β 433-447cit _{436,445}	WYNXCHAANPNGXYY (SEQ ID NO: 23)

Entre estos péptidos, los que son portadores de epítopos inmunodominantes (reconocidos por un gran número de sueros de pacientes que padecen AR) se presentan en la tabla 2. Los 20 sueros ensayados que corresponden a una serie procedente de pacientes que padecen AR que presentan AAPC detectables por múltiples ensayos de detección de estos autoanticuerpos y que, considerados en su conjunto, permiten representar la heterogeneidad de los perfiles de especificidad encontrados en los pacientes.

TABLA 2

NOMBRE DEL PÉPTIDO	NÚMERO DE SUEROS REACTIVOS RESPECTO A 20 ENSAYOS
β 60-74cit _{60,72,74}	14
α 36-50cit _{38,42}	12
α 621-635cit _{621,627,630}	10
α 501-515cit _{510,512}	9
α 171-185cit _{178,181}	9

El presente ejemplo muestra la capacidad de dos de estos péptidos inmunodominantes (α 36-50cit_{38,42} y β 60-74cit_{60,72,74}) de inhibir la inmunorreactividad de los AAPC frente al fibrinógeno humano citrulinado, medida por ELISA.

Los detalles técnicos de este ensayo competitivo por el método ELISA se indican a continuación.

Placas de microvaloración de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, VWR International, Fontenay sous Bois, Francia) se

revisten de fibrinógeno humano citrulinado (preparado como se indica en el ejemplo 1) en una cantidad de 100 μ l/pocillo de una disolución de 5 μ g/ml en PBS pH 7,4, durante una noche a 4 °C. Después, las placas se saturan con una disolución de PBS que contiene BSA al 2 % (PBS-BSA al 2 %) (180 μ l/pocillo). Después de esta etapa, se añaden las IgG AAPC+ (preparadas como se indica en el ejemplo 1), previamente diluidas hasta 16 μ g/ml en PBS-BSA al 2 % en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los péptidos competidores α 36-50cit_{38,42} y/o β 60-74cit_{60,72,74} (cada uno con una concentración que varía de 0,006 a 1,56 mg/ml) añadidos 2 h antes del ensayo ELISA. La concentración usada para las IgG AAPC+ se elige de forma que permita obtener una DO entre 1 y 1,5 en ausencia del péptido competidor. Se usan como controles fibrinógeno citrulinado o no citrulinado (de 0,0002 a 1,56 mg/m) así como formas no citrulinadas de los péptidos α 36-50cit_{38,42} y β 60-74cit_{60,72,74} (denominadas respectivamente α 36-50 y β 60-74). Después se detecta la fijación de los AAPC con IgG de cabra dirigidas contra IgG humana marcada con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama) diluidas a 1/9000 en PBS-BSA al 2 %. Todas las incubaciones se llevan a cabo durante 1 h a 4 °C y les siguen lavados con PBS-Tween-20 al 0,1 %. La actividad de la peroxidasa se pone de manifiesto con una disolución de orto-fenilendiamina (2 mg/ml - Sigma-Aldrich) en peróxido de hidrógeno (al 0,03 % - Sigma-Aldrich) y la DO a 492 nm se mide mediante un lector de placas (Multiskan plate reader, Thermo Labsystem, Cergy-Pontoise, Francia).

Resultados:

Los resultados de este ensayo competitivo en ELISA se ilustran en la figura 2. Los datos son representativos de 3 experimentos realizados con dos preparaciones diferentes de IgG AAPC+. Los resultados se expresan como la tasa de inhibición de la reactividad obtenida en ausencia del péptido competidor.

El porcentaje de inhibición de la unión de los AAPC al fibrinógeno citrulinado fijado en la placa ELISA alcanza un valor meseta de aproximadamente 80 % con el fibrinógeno citrulinado, aproximadamente 70 % con la mezcla de α 36-50cit_{38,42} + β 60-74cit_{60,72,74}, aproximadamente 60 % con β 60-74cit_{60,72,74} y aproximadamente 15 % con α 36-50cit_{38,42}. El porcentaje de inhibición es nulo con las mismas moléculas no citrulinadas.

Estos resultados confirman que los péptidos citrulinados derivados de la fibrina α 36-50cit_{38,42} y β 60-74cit_{60,72,74} son portadores de epítopos principales reconocidos por los AAPC, ya que son susceptibles de inducir una inhibición significativa de la reactividad de una mezcla heterogénea de AAPC frente a fibrinógeno citrulinado inmovilizado en el fondo de las placas de ELISA. Esta inhibición aumenta cuando se usa la mezcla de estos dos péptidos, confirmando que uno y otros son reconocidos por dos subfamilias diferentes de AAPC.

EJEMPLO 3: INHIBICIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR IC QUE ASOCIAN AAPC Y FIBRINÓGENO CITRULINADO, MEDIANTE PÉPTIDOS CITRULINADOS DERIVADOS DEL FIBRINÓGENO Y PORTADORES DE EPÍTOPOS RECONOCIDOS POR LOS AAPC

La preparación y estimulación de los macrófagos se realizan exactamente en las mismas condiciones que las descritas para el ejemplo 1, excepto que la reconstitución del IC se realiza con las IgG AAPC+ diluidas a 1,13 mg/ml en PBS que contiene NaCl 2 M y BSA al 2 %, en ausencia o presencia del péptido competidor β 60-74cit_{60,72,74} en dos concentraciones (0,8 y 4 mg/ml) añadido 2 h antes de la incubación con el fibrinógeno citrulinado inmovilizado en el fondo de las placas de cultivo. Se llevan a cabo igualmente como control competiciones con fibrinógeno citrulinado o no (0,4 mg/ml), así como con el péptido β 60-74 no citrulinado (0,8 y 4 mg/ml).

Resultados:

Los resultados de este ensayo de inhibición se ilustran en la figura 3. Estos datos son representativos del resultado de 2 experimentos diferentes llevados a cabo con los macrófagos de 2 individuos diferentes.

La incubación de las placas revestidas de fibrinógeno no citrulinado con las IgG AAPC+ solas o en presencia de moléculas citrulinadas o no citrulinadas, seguida de la estimulación de los macrófagos, permite definir una tasa base de TNF α inferior a 10 pg/ml. Esta estimulación aumenta cuando las placas revestidas de fibrinógeno citrulinado se incuban con las IgG AAPC+ solas o en presencia de moléculas no citrulinadas, y la tasa de TNF α alcanza valores superiores a 80 pg/ml. Esta estimulación es más reducida cuando los AAPC+ se ponen en presencia de fibrinógeno citrulinado (aproximadamente 20 pg/ml) o del péptido β 60-74cit_{60,72,74} (inferior a 20 pg/ml para una concentración de péptido citrulinado de 4 mg/ml y aproximadamente 40 pg/ml para una concentración de péptido citrulinado de 0,8 mg/ml).

Estos resultados muestran que el péptido β 60-74cit_{60,72,74} induce una inhibición dependiente de la dosis de la producción de TNF- α en respuesta a los IC. Se observa el mismo resultado cuando el fibrinógeno citrulinado se usa como competidor. En cambio, las formas no citrulinadas del péptido y del fibrinógeno no tienen efecto inhibitorio.

Estos resultados indican que el péptido citrulinado derivado de la fibrina β 60-74cit_{60,72,74} es susceptible de impedir la

formación de IC inmovilizados que asocian AAPC y fibrinógeno citrulinado. Se produce una inhibición de la producción del TNF- α en respuesta a estos IC.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSITE PAUL SABATIER
 CLAVEL, Cyril
 SEBBAG, Mireille
 NOGUEIRA, Maria
 10 Leonor SERRE, Guy
 <120> Péptidos moduladores de la activación de macrófagos, utilizables para el tratamiento de la artritis reumatoide.
 <130> MJP/mad-F1249/4-WO
 <150> FR 06/03956
 15 <151> 2006-05-03
 <160> 23
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (13) .. (13)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 35 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <400> 1

 Xaa Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Xaa Ala Xaa
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (7) .. (7)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <400> 2

 Gly Pro Xaa Val Val Glu Xaa His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10) .. (10)

<223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12) .. (12)
 5 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <400> 3

	Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Leu	Asp	Gly	Phe	Xaa	His	Xaa	His	Pro	Asp
	1				5					10					15

<210> 4
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (11) .. (11)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <400> 4

	Val	Asp	Ile	Asp	Ile	Lys	Ile	Xaa	Ser	Cys	Xaa	Gly	Ser	Cys	Ser
		1				5					10				15

<210> 5
 25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (10) .. (10)
 <223> X = resto citrulilo o arginilo
 <400> 5

	Xaa	Gly	His	Ala	Lys	Ser	Xaa	Pro	Val	Xaa	Gly	Ile	His	Thr	Ser
	1				5					10					15

<210> 6
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X = resto citrulilo
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> X = resto citrulilo
 <400> 6

ES 2 392 882 T3

```

          Gly Pro Xaa Val Val Glu Xaa His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser
          1           5           10           15
<210> 7
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (10) .. (10)
<223> X = resto citrulilo
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12) .. (12)
15 <223> X = resto citrulilo
<400> 7
          Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Xaa His Xaa His Pro Asp
          1           5           10           15
<210> 8
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> X = resto citrulilo
<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (11) .. (11)
<223> X = resto citrulilo
<400> 8
          Val Asp Ile Asp Ile Lys Ile Xaa Ser Cys Xaa Gly Ser Cys Ser
          1           5           10           15
<210> 9
<211> 15
35 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> X = resto citrulilo
<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (7) .. (7)
<223> X = resto citrulilo
<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (10) .. (10)
<223> X = resto citrulilo
<400> 9
          Xaa Gly His Ala Lys Ser Xaa Pro Val Xaa Gly Ile His Thr Ser
          1           5           10           15
<210> 10
<211> 15
55 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
60 <220>

```

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4) .. (4)
 <223> X = resto citrulilo
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> X = resto citrulilo
 <400> 10
 Ser Cys Ser Xaa Ala Leu Ala Xaa Glu Val Asp Leu Lys Asp Tyr
 1 5 10 15
 10 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> péptido citrulinado
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13) .. (13)
 <223> X = resto citrulilo
 20 <400> 11
 Pro Glu Trp Lys Ala Leu Thr Asp Met Pro Gln Met Xaa Met Glu
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (5) .. (5)
 <223> X = resto citrulilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13) .. (13)
 35 <223> X = resto citrulilo
 <400> 12
 Met Glu Leu Glu Xaa Pro Gly Gly Asn Glu Ile Thr Xaa Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido citrulinado
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> X = resto citrulilo
 <400> 13
 Glu Xaa Gly Ser Ala Gly His Trp Thr Ser Glu Ser Ser Val Ser
 1 5 10 15
 50 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> péptido citrulinado
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. (9)
 <223> X = resto citrulilo
 60 <400> 14

ES 2 392 882 T3

```

        Asp Ser Pro Gly Ser Gly Asn Ala Xaa Pro Asn Asn Pro Asp Trp
        1           5           10           15
<210> 15
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (15) .. (15)
<223> X = resto citrulilo
<400> 15
        Gly Thr Phe Glu Glu Val Ser Gly Asn Val Ser Pro Gly Thr Xaa
        1           5           10           15
<210> 16
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> X = resto citrulilo
<400> 16
        Ser Xaa Gly Ser Glu Ser Gly Ile Phe Thr Asn Thr Lys Glu Ser
25 1           5           10           15
<210> 17
<211> 15
<212> PRT
30 <213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13) .. (13)
35 <223> X = resto citrulilo
<400> 17
        Ser Ser His His Pro Gly Ile Ala Glu Phe Pro Ser Xaa Gly Lys
        1           5           10           15
<210> 18
40 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> X = resto citrulilo
<400> 18
        Ser Tyr Asn Xaa Gly Asp Ser Thr Phe Glu Ser Lys Ser Tyr Lys
50 1           5           10           15
<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
55 <223> péptido citrulinado
<220>

```

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> X = resto citrulilo
<220>
5 <221> MISC_FEATURE
<222> (13) .. (13)
<223> X = resto citrulilo
<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> X = resto citrulilo
<400> 19
      Xaa Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Xaa Ala Xaa
      1           5           10           15
<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> X = resto citrulilo
<400> 20
      Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Xaa
      1           5           10           15
<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> péptido citrulinado
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
35 <223> X = resto citrulilo
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14) .. (14)
<223> X = resto citrulilo
40 <400> 21
      Val Ile Gln Asn Xaa Gln Asp Gly Ser Val Asp Phe Gly Xaa Lys
      1           5           10           15
<210> 22
<211> 15
<212> PRT
45 <213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado
<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (2) .. (2)
<223> X = resto citrulilo
<400> 22
      Pro Xaa Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp Trp Tyr
      1           5           10           15
<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido citrulinado

```


ES 2 392 882 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> X = resto citrulilo

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> X = resto citrulilo

<400> 23

10

Trp Tyr Asn Xaa Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Xaa Tyr Tyr
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Péptido citrulinado para usar como medicamento, estando **caracterizado** dicho péptido **porque** es capaz de disminuir la cantidad de TNF- α producida por macrófagos activados *in vitro* por inmunocomplejos entre AAPC y un antígeno citrulinado reconocido por dichos AAPC, cuando se lleva a cabo un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, y **porque** se elige entre los siguientes péptidos:
- 5 a) un péptido definido por la secuencia $X_1PAPPPISGGGYX_2AX_3$ (SEQ ID NO: 1) en la que X_1 X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo, y X_3 es un resto citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos, que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo X_3 ;
- 10 b) un péptido definido por la secuencia $GPX_1VVEX_2HQSACKDS$ (SEQ ID NO: 2) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo, y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos, que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho o dichos restos citrulilo.
- 15 2. Péptido citrulinado para usar como medicamento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** se elige del grupo constituido por:
- 20 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 y X_2 son restos arginilo y X_3 es un resto citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 25 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 es un resto arginilo y X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;
- 30 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_2 es un resto arginilo y X_1 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido de 16 a 25 aminoácidos que comprende dichos restos citrulilo;
- un péptido definido por la SEQ ID NO: 1 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido de 16 a 25 aminoácidos que comprende dichos restos citrulilo;
- 35 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 es un resto arginilo y X_2 es un resto citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 40 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 es un resto citrulilo y X_2 es un resto arginilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 45 - un péptido definido por la SEQ ID NO: 2 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido de 5 a 25 aminoácidos que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo.
- 50 3. Péptido citrulinado para usar como medicamento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** la función carboxilo terminal (COOH) de dicho péptido es sustituida por una función carboxamida (CONH₂).
- 55 4. Péptido citrulinado para usar como medicamento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** está dirigido al tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
5. Péptido citrulinado para usar como medicamento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** dicha enfermedad inflamatoria es la artritis reumatoide.
6. Procedimiento de evaluación *in vitro*, de las propiedades de modulación de la inflamación de una molécula, **caracterizado porque** comprende:
- 60 a) poner en presencia de autoanticuerpos dirigidos contra péptidos citrulinados (AAPC) un antígeno peptídico citrulinado reactivo con dichos AAPC, en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos entre dichos AAPC y dicho antígeno citrulinado;
- b) poner en presencia de los inmunocomplejos formados en a) macrófagos, en condiciones que permitan la

activación de dichos macrófagos por dichos inmunocomplejos, y determinar la cantidad de al menos una citoquina proinflamatoria producida por dichos macrófagos;

5 c) repetir la etapa a) y la etapa b) repitiéndose una y/o la otra de dichas etapas en presencia de la molécula a ensayar;

d) comparar la cantidad de citoquina o citoquinas proinflamatorias producidas en ausencia de la molécula a ensayar y en presencia de esta.

10 7. Procedimiento de selección de moléculas moduladoras de la inflamación, **caracterizado porque** comprende:

- llevar a cabo, con cada una de las moléculas a ensayar, un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6;

15 - seleccionar las moléculas capaces de modificar la cantidad de citoquina o de citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos.

20 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** se trata de un procedimiento de selección de moléculas antiinflamatorias, y **porque** comprende seleccionar moléculas capaces de disminuir la cantidad de citoquina o de citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos.

9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado porque** dicho antígeno peptídico citrulinado se selecciona del grupo que comprende fibrinógeno citrulinado, filagrina citrulinada, vimentina citrulinada, fragmentos citrulinados de los mismos, y sus mezclas.

25 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado porque** la citoquina proinflamatoria cuantificada en dicho procedimiento es el TNF- α .

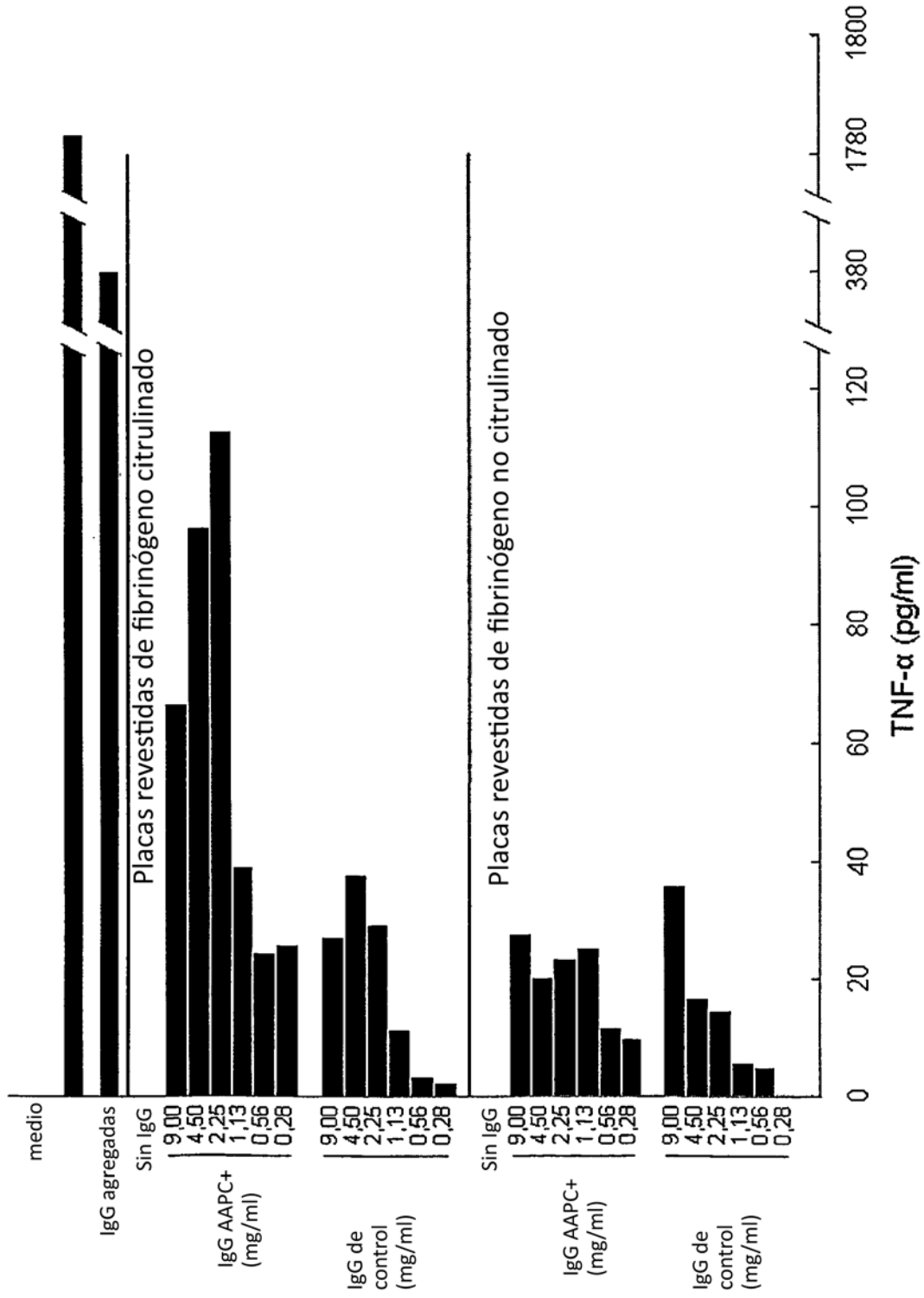


Figura 1

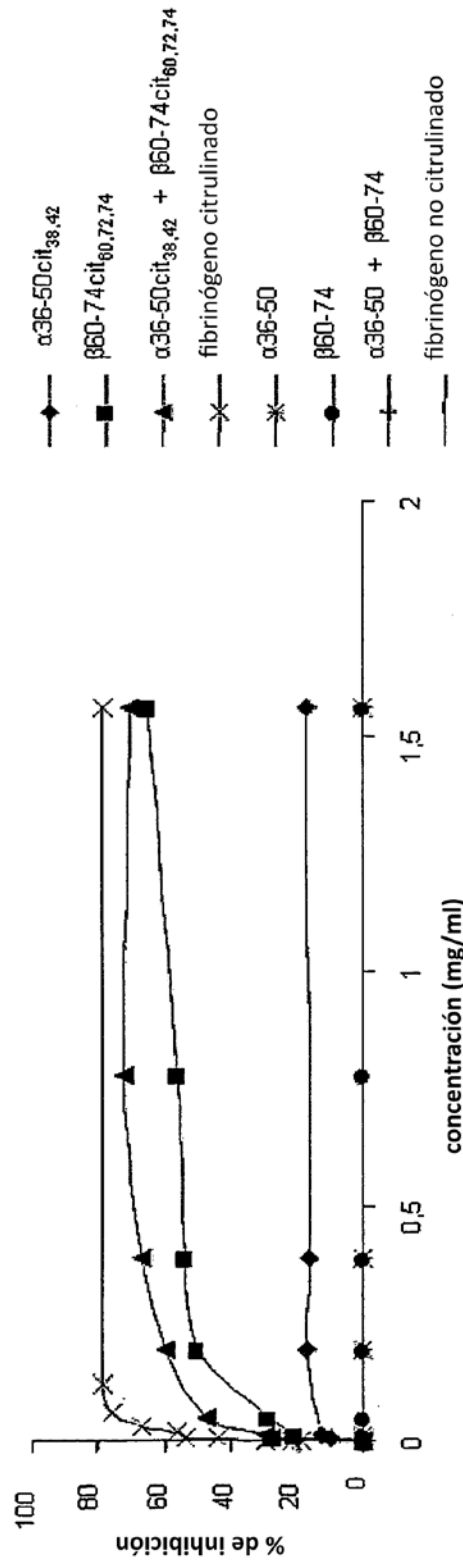


Figura 2

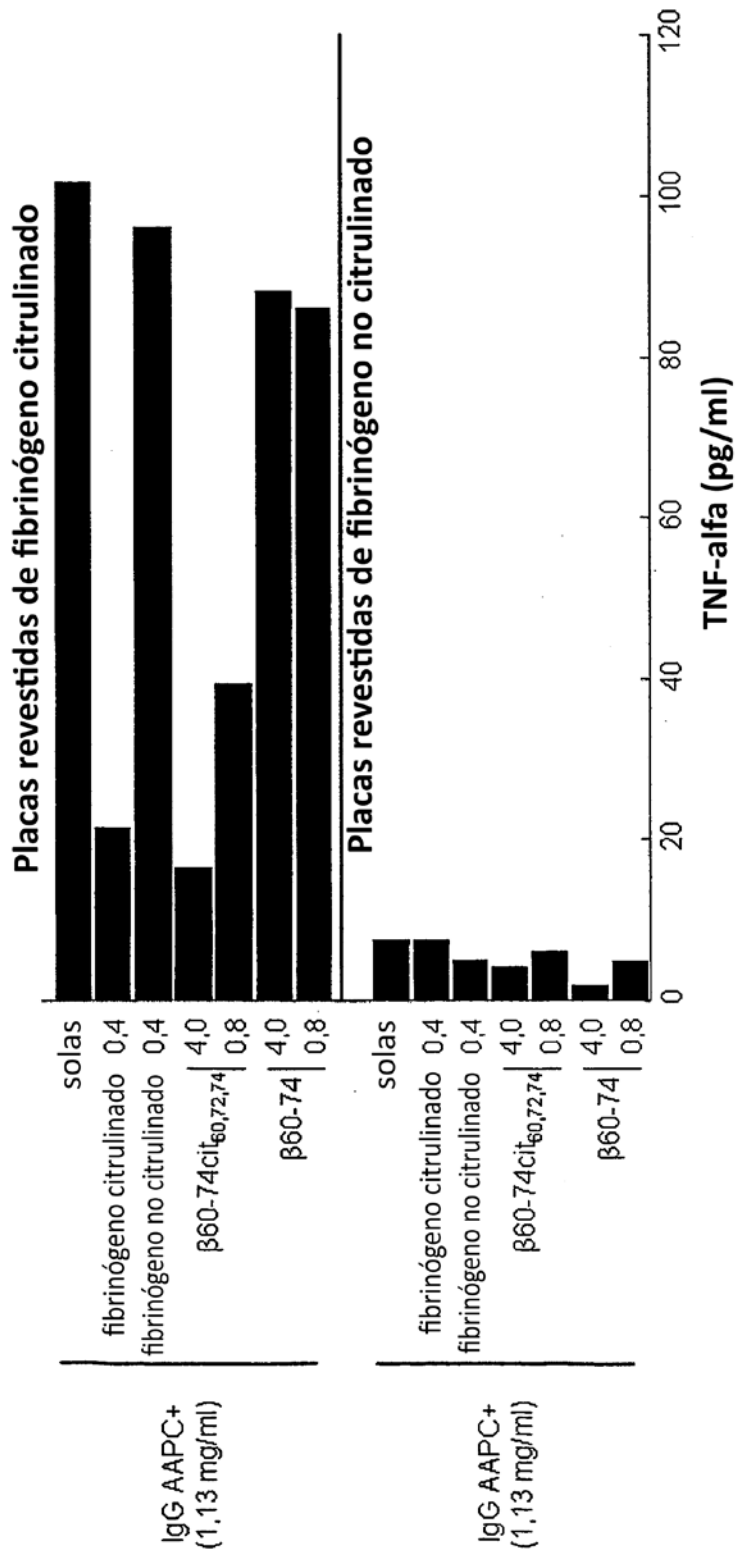


Figura 3