

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 013**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2009 E 09788195 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2288616**

54 Título: **Inhibidores de peptidilarginina desiminasa (PAD)**

30 Prioridad:

16.06.2008 EP 08158330
16.06.2008 US 61754 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2013

73 Titular/es:

CHIRALIX B.V. (33.3%)
Toernooiveld 100
6525 EC Nijmegen, NL;
MODIQUEST B.V. (33.3%) y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LEIDS UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM
(33.3%)

72 Inventor/es:

BLAAUW, RICHARD HENDRIK;
PRUIJN, GERARDUS JOZEF MARIA;
RAATS, JOZEF MARIA HENDRIK;
RUTJES, FLORIS PETRUS JOHANNES
THEODORUS y
DRIJFHOUT, JAN WOUTER

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 400 013 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

Inhibidores de peptidilarginina desiminasa (PAD)

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular a la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes y más específicamente a la artritis reumatoide (RA). La presente invención también se refiere al campo de la enzimología. La invención se refiere a un método para desarrollar inhibidores enzimáticos y divulga potentes inhibidores de la enzima peptidil arginina desiminasa (EC 3.5.3.15). Estos inhibidores de PAD se pueden utilizar para preparar medicamentos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular para el tratamiento de RA, psoriasis y esclerosis múltiple (MS).

15 Antecedentes de la invención

[0002] La RA es una enfermedad común autoinmune predominante en aproximadamente el 1% de la población mundial. Es de origen multifactorial y está caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones, causando hinchazón de las articulaciones y dolor. El proceso inflamatorio frecuentemente conduce a la destrucción del cartílago y a la erosión irreversible del hueso.

[0003] Los autoanticuerpos anti-CCP desempeñan una función importante en la aparición y la perpetuación de la RA. Primero, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CCP son altamente específicos para la RA. Los resultados de diferentes estudios muestran que los individuos que son seropositivos para estos anticuerpos bien ya tienen RA bien desarrollarán esta enfermedad en el futuro. La presencia de anticuerpos anti-CCP (especialmente cuando hay títulos altos) es un factor predictivo de evolución de la enfermedad erosiva {Nijenhuis *et al.*, 2004}. Por último, se ha demostrado que los anticuerpos anti-CCP se producen localmente en el sitio de la inflamación. La proporción de anticuerpos anti-CCP con respecto al IgG total encontrado en el material sinovial de pacientes con RA pareció ser significativamente superior al del suero de los mismos pacientes {Masson-Bessière *et al.*, 2000, Reparon-Schuijt *et al.*, 2001}. La presencia de células de plasma que producen anti-CCP en la membrana sinovial es indicativa de una maduración dirigida por antígeno de células B específicas de CCP en el sitio de la inflamación. La defensa de la función de los anticuerpos anti-CCP en la generación de la artritis viene de estudios en ratones *knockout* FcγR11B. Se demostró que las inmunoglobulinas de plasma o suero de pacientes con RA activa inducían la inflamación y las lesiones histológicas en estos ratones {Petkova *et al.*, 2006}. En un modelo de artritis inducida por colágeno, se informó de que los anticuerpos contra las proteínas citrulinadas mejoraron los daños en los tejidos, fundamentando la función directa de estos anticuerpos en la patogénesis de la artritis autoinmune {Kuhn *et al.*, 2006}. En un documento reciente, Hill y colaboradores informaron de que el fibrinógeno citrulinado es capaz de inducir artritis, caracterizada por hiperplasia sinovial seguida de anquilosis, en ratones transgénicos DR4-IE. El barrido de epítomos de células T y el análisis de micromatriz de anticuerpos identificaron un único modelo de reactividad específica de citrulina que se encontró en los ratones transgénicos DR4-IE inmunizados con fibrinógeno inmodificado o en ratones C57BL/6 tipo salvaje inmunizados con fibrinógeno citrulinado. Estas observaciones implican directamente al fibrinógeno citrulinado como artritogénico en el contexto de las moléculas de clase II MHC asociadas a la RA {Hill *et al.*, 2008}.

[0004] De acuerdo con este mecanismo dirigido por antígeno, se ha demostrado la presencia de proteínas citrulinadas en la sinovial inflamada de la RA. Se ha informado de que las formas citrulinadas de las cadenas α y β de fibrina no sólo se producen en la sinovial de pacientes con RA {Masson-Bessière *et al.*, 2001}. La caracterización molecular del antígeno Sa identificó Sa como vimentina citrulinada. Se ha informado de que antígeno Sa, al que se dirigen específicamente los anticuerpos de RA, está presente en la membrana sinovial inflamada. El influjo de calcio en los macrófagos derivados de monocitos, que están abundantemente presentes en la membrana sinovial inflamada, conduce a la citrulinación de la vimentina, y el hecho de que la vimentina se pueda segregar por macrófagos en respuesta a vías de señalización proinflamatorias es acorde con una función de la vimentina citrulinada en el desarrollo de RA {Vossenaar y camioneta Venrooij, 2004}. Además de la fibrina y la vimentina, se pueden producir otros autoantígenos citrulinados en una articulación inflamada. Usando un método proteómico se identificaron 13 proteínas autoantigénicas citrulinadas, incluyendo fibrinógenas, en el tejido sinovial de un paciente con RA {Matsuo *et al.*, 2006}. Se ha informado de que la enzima PAD4 de citrulinación (véase más adelante) se activa en granulocitos moribundos, y esto conduce a la citrulinación de proteínas nucleares {Nakashima *et al.*, 2002}. Es posible que en los granulocitos apoptóticos de la membrana sinovial inflamada no se eliminen debidamente, un fenómeno previamente observado en los pacientes con lupus eritematoso sistémico {Ren *et al.*, 2003}, y como resultado las proteínas citrulinadas pueden quedar expuestas al sistema inmunológico.

[0005] La citrulinación es la conversión postraduccional de residuos de arginina en residuos de citrulina, que se cataliza por peptidil arginina desiminasa (PAD). Las enzimas peptidil arginina desiminasa (PAD; EC 3.5.3.15) catalizan la conversión de residuos de arginina en residuos de citrulina en las proteínas. No existe ningún ARNt para la citrulina, la presencia de residuos de citrulina en las proteínas es el resultado exclusivamente de la modificación postraduccional. En mamíferos (seres humanos, ratones y ratas) se han identificado cinco isotipos de PAD (PAD1 - PAD6; 'PAD4' y 'PAD5' se usan para el mismo isotipo), cada uno codificado por un gen diferente {Vossenaar *et al.*, 2003b}. Todas estas enzimas se basan fuertemente en la presencia de Ca²⁺ para actividad y son incapaces de convertir L-arginina libre en L-

citrulina libre. La L-arginina libre se puede convertir en L-citrulina libre por sintasa de óxido nítrico (EC 1.14.13.39) en eucariotas o por arginina desiminasa (EC 3.5.3.6) en bacterias. Estas enzimas no son dependientes de Ca^{2+} .

[0006] La diferencia más pronunciada entre las enzimas PAD altamente homólogas es su expresión tisular específica. En la epidermis, PAD1 (sinónimos: PAD I, PAD tipo I) está relacionada con la citrulinación de los filamentos de queratina durante las fases finales de la diferenciación de queratinocito, que es importante para la reorganización del revestimiento cornificado. Otro sitio de citrulinación en la epidermis es el folículo capilar, que contiene PAD3 (sinónimos PAD III, PAD tipo III) y su sustrato natural tricohialina (THH). THH es una proteína estructural importante de las células de la vaina de la raíz y de la capa de médula del folículo capilar y, en menor medida, de otros epitelios especializados. El isotipo PAD identificado más recientemente, PAD6 (sinónimo: ePAD), se encontró en láminas citoplásmicas de ovocitos de ratón, que tienen una función importante en la embriogénesis temprana. La expresión de su ortólogo humano resultó estar restringida a leucocitos de ovarios, de testículos y de sangre periférica {Chavanas *et al.*, 2004}. Originalmente, este isotipo PAD se designó ePAD, pero según la numeración sistemática de otras PAD, este isotipo se redenomino PAD6 {Vossenaar *et al.*, 2003b}. El isotipo más ampliamente expresado, PAD2 (sinónimos: PAD II, PAD tipo II, PAD-H19), está presente en tejidos muy diferentes, tales como músculo esquelético, cerebro, bazo, glándulas secretoras y macrófagos. A pesar de este amplio modelo de expresión, sólo la proteína básica de la mielina (MBP) y la vimentina se han identificado como sustratos naturales. Los pacientes con MS desarrollan una respuesta autoinmune contra la MBP. La MBP es una proteína abundante de la vaina de mielina, y su citrulinación ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se observó citrulinación de vimentina durante la apoptosis inducida por ionóforo de calcio de los macrófagos de humano y de ratón y, como se ha descrito anteriormente, se mostró que la vimentina citrulinada es el objetivo de los autoanticuerpos anti-Sa específicos de la RA. A diferencia de las PADs mencionadas anteriormente, que se localizan todas principalmente en el citoplasma de las células, el isotipo PAD4 (sinónimos: PAD IV, PAD tipo IV, PAD HL-60, PAD V, PAD tipo V, PADI4) se localiza en el núcleo. La señal de localización nuclear de PAD4 fue encontrada en la región N-terminal de la proteína. PAD4 se expresa principalmente en los granulocitos y monocitos de la sangre periférica. Los sustratos de PAD4 en el núcleo son proteínas de histona nucleares (H2A, H3 y H4) y nucleofosmina/B23, una proteína nucleolar que funciona en el ensamblaje de los ribosomas, el transporte nucleocitoplásmico y la duplicación de centrosomas.

[0007] Según estos perfiles de expresión, dos isotipos de PAD, PAD2 y PAD4, son los candidatos para ser las enzimas de citrulinación que desempeñan un papel en la citrulinación de proteínas asociada a la respuesta inmune en la RA. PAD2 y PAD4 están presentes en monocitos, macrófagos y granulocitos, células abundantemente presentes en la membrana sinovial inflamada {Chapuy-Regaud *et al.*, 2003}.

[0008] Las PADs suelen estar presentes en el citosol o el nucleoplasma como enzimas inactivas debido a que la concentración de iones de calcio local es inferior a la necesaria para su activación. Durante la muerte celular, no obstante, la integridad de la membrana plasmática se pierde, dando como resultado un influjo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (la concentración extracelular de Ca^{2+} es $\sim 10^{-3}$ M, suficiente para la actividad de PAD) y la posterior activación de PAD intracelular. Alternativa o simultáneamente, las enzimas PAD activadas pueden escaparse de las células moribundas y catalizar la citrulinación de proteínas extracelulares.

[0009] Hace algunos años, se describió la estructura cristalina de la proteína humana de PAD4 {Arita *et al.*, 2004}. Una comparación de las estructuras cristalinas de PAD4 en presencia y en ausencia de iones de calcio y de un mutante catalíticamente inactivo con y sin sustrato ligado reveló cinco sitios de unión a Ca^{2+} e indicó que la unión a Ca^{2+} induce cambios conformacionales que generan la hendidura del sitio activo. Los datos estructurales confirmaron el posicionamiento de una tríada catalítica, Cys-His-Glu/Asp, que previamente se propuso para representar el núcleo del sitio catalítico parcialmente basado en información estructural de otras enzimas modificadoras de arginina, en la hendidura del sitio activo. Según este modelo de conservación y la suposición de que el modo de unión al sustrato es similar al de otras enzimas convertidoras de arginina, tales como dimetil arginina dimetilaminohidrolasa y L-arginina desiminasa, se propuso el mecanismo catalítico {Shirai *et al.*, 2001}. Los actores principales son Cys-645, que promueve el ataque nucleofílico en el átomo de carbono del grupo de guanidinio de arginina, y His-471, que sirven como base general.

[0010] Como se ilustra más arriba, la creciente evidencia defiende una función de los anticuerpos anti-CCP y sus objetivos antigénicos en la fisiopatología de la RA. La función de las proteínas citrulinadas en la etiología de la RA está además respaldada por la interacción dependiente de la citrulina de los péptidos citrulinados con haplotipos de HLA asociados a la RA {Hill *et al.*, 2003}. Como se ha indicado anteriormente, datos recientes del mismo grupo indican que la artritis es inducida de hecho por el fibrinógeno citrulinado en los ratones transgénicos DR4-IE {Hill *et al.*, 2008}. En conjunto, estos datos indican que la generación específica de anticuerpos anti-CCP en la RA está condicionada por el nivel de exposición de los antígenos citrulinados en el sistema inmunológico y/o el reconocimiento de antígenos citrulinados por el sistema inmunológico. Una vez se han producido anticuerpos anti-CCP, la formación de complejos inmunológicos con proteínas citrulinadas en la sinovia puede desencadenar la progresión del proceso inflamatorio. Un papel de los anticuerpos anti-CCP en la patogénesis de la RA se basa en los resultados de experimentos de depleción del linfocito B en pacientes con RA {Cambridge *et al.*, 2003}.

[0011] Las enzimas PAD y sus productos, proteínas citrulinadas, se sabe que desempeñan una función en otras enfermedades humanas, en particular enfermedades autoinmunes tales como psoriasis, MS y lupus eritematoso sistémico.

5 [0012] En la psoriasis, los queratinocitos proliferan muy rápidamente y viajan de la capa basal hasta la superficie en sólo unos cuatro días. La piel puede no mudar estas células lo suficientemente rápido de modo que éstas se acumulan en parches o placas gruesas y secas. En los queratinocitos normales, la queratina K1 se citrulina por PAD1 durante la diferenciación terminal. Este proceso hace que los filamentos de queratina se hagan más compactos, algo esencial para el proceso de cornificación normal de la epidermis. Los queratinocitos de las placas psoriáticas hiperproliferativas no
10 contienen queratina citrulinada K1 {Ishida-Yamamoto *et al.*, 2000}. No está claro si la proliferación celular aumentada impide la citrulinación adecuada por PAD o si la inactividad de PAD permite la hiperproliferación y la acumulación de queratinocitos. Aunque el mecanismo es desconocido, la citrulinación aberrante en la epidermis psoriática está obviamente relacionada con PAD1.

15 [0013] La MS es un trastorno crónico inflamatorio del SNC, caracterizado por la destrucción mediada por autoinmunidad de la vaina de mielina. Las células de la vaina de mielina forman una estructura multicapa alrededor de los axones que consiste en complejos de lípido-proteína en una proporción de aproximadamente 3:1. Dos proteínas principales, MBP y proteína proteolípídica, representan el 85% de la fracción de proteína. La MBP es una proteína altamente catiónica, capaz de formar fuertes interacciones con fosfolípidos cargados negativamente, tal como fosfatidilserina. En
20 aproximadamente el 18% de las moléculas de MBP de seres humanos adultos sanos 6 (de cada 19) argininas son citrulinadas {Wood *et al.*, 1989, Wood *et al.*, 1996}. Las moléculas de MBP restantes no contienen citrulina. En pacientes con MS la proporción de MBP-cit6 aumenta al 45% de las MBP totales. La carga positiva neta disminuida de MBP-cit6 causa el desplegado parcial de moléculas de MBP y debilita su interacción con los fosfolípidos {Boggs *et al.*, 1999, Pritzker *et al.*, 2000}. Aunque MBP-cit6 es capaz de formar complejos lipídicos más rápidamente que la MBP no citrulinada, los complejos que se forman no están tan densamente comprimidos como los formados con MBP no citrulinada {Boggs *et al.*, 1999, Beniac *et al.*, 2000}. La MBP-cit6 se degrada 4 veces más rápido por catepsina D que la MBP no citrulinada {Cao *et al.*, 1999}. En un caso raro de MS fulminante aguda (tipo Marburg), el 80% de las moléculas de MBP están fuertemente citrulinadas (MBPcit18) {Wood *et al.*, 1996}. La MBP-cit18 severamente desplegada se
25 degrada 45 veces más rápidamente por catepsina D que la MBP normal {Cao *et al.*, 1999}. Se están llevando a cabo ensayos clínicos con paclitaxel, el componente activo del medicamento contra el cáncer Taxol {O'Connor *et al.*, 1999}. Pequeñas dosis de paclitaxel pueden inhibir la citrulinación de MBP por PAD2 *in vitro* {Pritzker *et al.*, 1998}. El tratamiento con paclitaxel atenúa los síntomas clínicos e induce la remielinización de las vainas dañadas {Moscarello *et al.*, 2002}, destacando la posible importancia de PAD como factor candidato en la enfermedad desmielinizante {Moscarello *et al.*, 2002 2x}.

35 Descripción detallada de la invención

[0014] Un objetivo potencial para la intervención en enfermedades autoinmunes asociadas a las (alteraciones en el nivel de) proteínas citrulinadas es PAD. El bloqueo de la producción de proteínas citrulinadas en el sitio de la inflamación, por
40 ejemplo en la membrana sinovial inflamada de la RA, impedirá la formación de complejos inmunológicos y de este modo se espera que se inhiba la progresión del proceso inflamatorio en la articulación afectada. Debido a que las proteínas citrulinadas no tienen un papel fisiológico obvio en la membrana sinovial, no se espera que la interferencia en su producción produzca efectos secundarios severos.

45 [0015] Así, la intervención terapéutica dirigida a la inhibición específica de la actividad de PAD, preferiblemente en el sitio de la reacción autoinmune indeseada, por ejemplo en la membrana sinovial inflamada, será altamente específico para los procesos de destrucción de las articulaciones en pacientes con RA.

[0016] De forma similar a la RA, también en pacientes que sufren de MS la citrulinación excesiva o aberrante de
50 proteína básica de la mielina (MBP) se pueden evitar mediante la administración de inhibidores de PAD, lo que dará como resultado complejos lipídicos compactados más densamente en las vainas de mielina, un mejor pliegue de MBP y MBP menos susceptibles a la degradación por catepsina D. Actualmente se utilizan dosis bajas de paclitaxel para inhibir la citrulinación de MBP por PAD2 en ensayos clínicos. El tratamiento con paclitaxel atenúa los síntomas clínicos e induce la remielinización de las vainas dañadas {Moscarello *et al.*, 2002}. El paclitaxel, no obstante, es un medicamento altamente tóxico, con muchos efectos secundarios adversos, incluso en dosis bajas. El paclitaxel y los compuestos de taxol no son moléculas inhibitoras de PAD específicas.

[0017] La EP1717224 A1 se refiere a un inhibidor de PAD 4 que es adecuado para el tratamiento de otros trastornos autoinmunes, tales como RA, MS, SLE o psoriasis. Es un objeto de la presente invención proporcionar moléculas
60 alternativas capaces de inhibición reversible o preferiblemente irreversible de la enzima PAD, en particular las enzimas humanas PAD2 y PAD4.

[0018] El éster etílico de benzoil-L-arginina (BAEE) se ha usado ampliamente como sustrato para determinar la actividad de PAD. Se usó un compuesto relacionado, amida de benzoil-L-arginina, como sustrato para determinar la estructura
65 cristalina del complejo PAD4-sustrato. Esto sugirió que, aunque las PADs no convierten L-arginina libre en L-citrulina libre, los compuestos químicamente relacionados con BAEE pueden encajar en la hendidura del sitio activo y competir

para unirse a las moléculas de sustrato. En este aspecto, es de interés particular la cisteína, que forma parte de la tríada catalítica, y se propone para desempeñar un papel esencial en la catálisis nucleofílica. Mediante la estabilización del aducto tetraédrico en la hendidura catalítica, se puede evitar la formación de producto citrulinado. Por lo tanto, la presente invención proporciona inhibidores de PAD que se basan en la modificación covalente de la cisteína del sitio activo para alcanzar con éxito la inhibición, preferiblemente con dosis bajas del inhibidor. Los inhibidores descritos pueden inhibir PAD de una manera reversible, pero preferiblemente se enlazarán de forma irreversible y/o covalente con la enzima PAD, de la forma más preferible con el residuo de cisteína catalítica del sitio activo.

Compuesto

[0019] En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula o compuesto capaz de inhibir una peptidil arginina desiminasa (PAD) de acuerdo con la reivindicación 1. La inhibición de PADs se define aquí como la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad de una PAD *in vitro* usando el ensayo tal y como se proporciona en cualquiera de los ejemplos 4, 5, 6, y/o 7. El término "inhibición" se reconoce en la técnica y se refiere a la infrarregulación o supresión de una actividad de PAD (actividades de PAD2 y/o PAD4) ya sea ambas combinadas o por separado. Esta inhibición se refiere preferiblemente a una inhibición de al menos el 5% de la actividad inicial de dicha enzima en ausencia de dicho compuesto usando una concentración mínima de preferiblemente al menos 0,0000001 mM o 0,000001, 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2,5 o 10 mM de dicho compuesto. La actividad de una enzima PAD se mide como se describe en el ejemplo 6. Más preferiblemente, una inhibición se refiere a una inhibición de al menos el 10%, incluso más preferiblemente al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 70%, al menos el 90%, al menos el 95% o más. De la forma más preferible, ni la actividad de PAD2 y/o ni la de PAD4 es detectable. Cualquier compuesto de la invención tal y como se define aquí, que sea capaz de inhibir la actividad de una PAD tal y como se define aquí, está previsto que sea funcional como medicamento para utilizarse para prevenir, tratar y/o retrasar un trastorno autoinmune tal como RA.

[0020] Un compuesto de la invención preferiblemente es capaz de inhibir la actividad de una PAD, más preferiblemente de PAD2 y/o PAD4. Este compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 está formado por una parte peptídica y un grupo electrofílico reactivo al tiol portado por un aminoácido Ω donde:

(a) el péptido incluye al menos 5 aminoácidos y no más de 20 aminoácidos,

(b) la parte peptídica comprende el motivo (b2):

(b2) H/K/I/F/L/W - S/D/H - Ω - D/E - H/Y/F/W

en el que Ω representa un aminoácido que porta un grupo electrofílico reactivo al tiol, donde el grupo reactivo al tiol es un grupo halógeno-amidina.

(c) opcionalmente el N-término y/o C-término de la secuencia peptídica se modifican.

[0021] La parte peptídica está representada por una secuencia peptídica. Las secuencias peptídicas abarcadas por la presente invención pueden, por lo tanto, consistir en o comprender una secuencia con un motivo (b2) tal y como se ha definido anteriormente. Una secuencia peptídica abarcada por la presente invención puede, por lo tanto, ser una yuxtaposición de dos o tres o más motivos (b2). No obstante, las secuencias peptídicas preferidas comprenden o consisten en un único motivo (b2).

[0022] Un compuesto preferido comprende o consiste en la SEQ ID n°: 107-125, 129-141, preferiblemente 120, 122, 129-141, más preferiblemente 136-141, incluso más preferiblemente 138, 141.

[0023] Las secuencias peptídicas preferidas que comprenden o consisten en un motivo (b2) se identifican en la tabla 5 y se prevé que formen un compuesto que específicamente inhibirá al menos PAD4: véanse todas las secuencias peptídicas de la tabla 5 (SEQ ID n°: 47-71). En cada secuencia peptídica de la tabla, para obtener el inhibidor correspondiente de la invención tal y como se ha definido anteriormente, R debería sustituirse por Ω . Por lo tanto, las secuencias peptídicas preferidas comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 47-71, donde R se sustituye por Ω . Los inhibidores preferidos comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 107-125, 129-141. Los inhibidores más preferidos comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 120, 122, 129-141. Los inhibidores incluso más preferidos comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 136, 137, 138, 139, 140. Muchos inhibidores preferidos comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 138.

[0024] Otros compuestos preferidos de la invención tienen en su motivo (b2) dos residuos D. Las secuencias peptídicas correspondientes consisten en o comprenden H/K/I/F/L/W-D- Ω -D-H/Y/F/W. Los compuestos incluso más preferidos son aquellos en los que la secuencia peptídica es como se identifica en cualquiera de las tablas 4, 5 SEQ ID n°: 72-78, 82, 84, 85 (véanse todas las secuencias peptídicas de estas tablas excepto la de L1 o L2 que se usan como control). En cada secuencia peptídica de la tabla, para obtener el inhibidor correspondiente de la invención tal y como se ha definido anteriormente, R debería sustituirse por Ω). Los compuestos incluso más preferidos son aquellos en los que el compuesto se identifica como en cualquiera de las tablas 11, 12 o 15 (excepto el derivado de L2, que se usa como control, y excepto SEQ ID n°: 126-128, 142, 143). Los inhibidores de la tabla 15 están representados por la SEQ ID n°: 107-111. Los inhibidores preferidos comprenden o consisten en la SEQ ID n°: 107-111. Cada uno de estos compuestos se ha caracterizado sin ambigüedad como un inhibidor de PAD2 y/o PAD4.

[0025] Un compuesto según la invención que comprende una parte peptídica de al menos aproximadamente 5 y no más de aproximadamente 35, preferiblemente no más de aproximadamente, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7 aminoácidos, es capaz de interactuar con una enzima PAD, y puede tener una afinidad (K_m) de entre 1 nM y 1 mM, preferiblemente de entre 1 nM y 100 μ M, preferiblemente de entre 1 nM y 10 μ M. En la invención, hemos demostrado sin ambigüedad que una longitud de 7 aminoácidos fue suficiente para conferir especificidad al compuesto (sólo una enzima PAD, preferiblemente una PAD2 y/o PAD4 será inhibida y ninguna otra clase de enzima) y son potentes inhibidores de PAD2 y/o PAD4. Tal longitud es bastante atractiva dado que tales compuestos son fáciles de sintetizar químicamente. Por consiguiente, un compuesto según la invención comprende una parte peptídica de al menos 5 y no más de 35, preferiblemente no más de 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 aminoácidos y es capaz de interactuar con una enzima PAD tal y como se define aquí. Los compuestos preferidos comprenden una parte peptídica, dicha parte peptídica comprende una longitud de 7 aminoácidos. En la presente se describen secuencias peptídicas que se leen de izquierda a derecha, con el término amino (N) localizado en el lado izquierdo y el término carboxi (C) localizado en el lado derecho.

15 Grupo electrofílico

[0026] Un compuesto según la invención comprende un grupo electrofílico reactivo al tiol, opcionalmente conectado vía una fracción espaciadora a la parte peptídica. Un grupo electrofílico es una fracción con densidad de electrones baja (también llamada electrófilo) que es capaz de reaccionar con otra fracción de densidad de electrones alta (también llamada nucleófilo). En este contexto, una fracción con una densidad de electrones baja puede significar que esta fracción tiene una densidad de electrones inferior a la de la fracción con una densidad de electrones alta. Por lo tanto, una fracción con una densidad de electrones alta puede significar que es una fracción con una densidad de electrones más alta que la de la fracción con una densidad de electrones baja. La estructura y la naturaleza de los grupos electrofílicos reactivos al tiol de esta solicitud, preferiblemente fluoroamidina o cloroamidina, es tal que a temperatura ambiente (a 37 °C) se puede dar una reacción química entre el grupo electrofílico reactivo al tiol del inhibidor y el grupo tiol del centro activo de una enzima PAD, produciendo un complejo enzima-inhibidor acoplado de manera covalente.

[0027] El grupo electrofílico reactivo al tiol es portado preferiblemente por un aminoácido Ω tal y como se identifica en el compuesto de la invención. Ω puede ser cualquier aminoácido. Ω puede ser un aminoácido modificado. Está previsto que un compuesto según la invención sea capaz de interactuar con una enzima PAD, preferiblemente una PAD2 y/o PAD4 y sea capaz de inhibir su actividad, preferiblemente, pero que no esté limitado a, por interacción con o unión a la fracción de tiol de un residuo de cisteína en el sitio catalítico (o hendidura) en una enzima PAD. La inhibición se ha demostrado de forma extensiva en los ejemplos de la solicitud.

[0028] El grupo electrofílico reactivo al tiol está conectado a la parte peptídica de la molécula, opcionalmente mediante un grupo espaciador o fracción, y puede ser cualquier reactivo al tiol, grupo electrofílico conocido en la técnica que pueda seleccionar fácilmente el experto en la materia. Aquí, grupo electrofílico reactivo al tiol se refiere a cualquier grupo que en condiciones acuosas con pH fisiológico sea capaz de formar un enlace covalente con un grupo tiol (SH), en particular el grupo tiol de una cisteína. El grupo electrofílico reactivo al tiol según la presente invención es un grupo halógeno-amidina. El término halógeno-amidina se refiere aquí a un grupo que posee el elemento estructural $\text{-NH-C(=NH)-CH}_2\text{-X}$ en el que X es halógeno. Consecuentemente, O(FA) o fluoroamidina se refiere a un aminoácido con la siguiente cadena lateral: $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(=NH)-CH}_2\text{-F}$ y O(CA) o cloroamidina se refiere a un aminoácido con la siguiente cadena lateral: $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(=NH)-CH}_2\text{-Cl}$. El grupo halógeno-amidina puede ser una fluoroamidina, una cloroamidina, una yodoamidina o una bromoamidina. Los mejores resultados se obtuvieron con una fluoroamidina. Según la presente invención, el grupo electrofílico reactivo al tiol es portado por un aminoácido Ω como se identifica aquí. De la forma más preferible, Ω es ornitina. Por lo tanto, en un compuesto más preferido, ornitina porta un grupo electrofílico o trampa que es un grupo halógeno-amidina, el grupo halógeno-amidina es una fluoroamidina, una cloroamidina, una yodoamidina o una bromoamidina. Incluso más preferido es un compuesto donde dicha ornitina porta una fluoroamidina o una cloroamidina. El más preferido es un compuesto en el que dicha ornitina porta una fluoroamidina.

[0029] Es bien conocido en el ámbito del experto en la materia adjuntar un espaciador a un péptido, por ejemplo acoplando un espaciador a un ácido carboxílico, hidróxilo, grupo tiol y amina que comúnmente se encuentran en péptidos, es trabajo de rutina. Normalmente, los grupos de amina libre son muy adecuados para adjuntar espaciadores. También el acoplamiento de espaciadores a grupos electrofílicos, preferiblemente espaciadores para grupos electrofílicos reactivos al tiol que reaccionan con grupos tiol implica sólo experimentación rutinaria y no requiere que se haga mayor especificación aquí.

[0030] El espaciador que conecta la parte peptídica de una molécula inhibitoria de PAD según la invención al grupo electrofílico, preferiblemente al grupo electrofílico reactivo al tiol puede representar un grupo de conexión que consiste en una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada (múltiple) que contiene 1-12 átomos de carbono; en la que opcionalmente 4-6 de los átomos juntos pueden formar un anillo saturado o aromático; y/o en la que opcionalmente 1-6 de los átomos de carbono pueden haber sido sustituidos por 1-4 átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, el espaciador es un grupo que consiste en una cadena ramificada o lineal saturada o insaturada (múltiple) que contiene 3-8 átomos de carbono; en la que opcionalmente 4-6 de los átomos juntos pueden formar un

anillo saturado o aromático; y/o en la que opcionalmente 1-3 de los átomos de carbono pueden haber sido sustituidos por 1-3 átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos.

5 [0031] En una forma de realización preferida, el espaciador entre el esqueleto peptídico y la trampa electrofílica o el grupo electrofílico o el grupo electrofílico reactivo al tiol es una cadena lineal saturada alifática que comprende de 3 a 6 átomos de carbono.

10 [0032] Para asegurar una vida media suficiente de las moléculas según la invención capaces de inhibir la actividad de PAD *in vitro* e *in vivo*, la parte peptídica de la molécula se modifica preferiblemente para asegurar una biodegradabilidad reducida y una biodisponibilidad suficiente. Alternativamente, el péptido puede estar circularizado, para evitar la degradación de peptidasa en los términos, por ejemplo. También los aminoácidos producidos de forma no natural y/o los aminoácidos que normalmente no están presentes en el cuerpo humano, o miméticos de péptidos, se pueden utilizar en la parte peptídica de la molécula para prevenir la degradación y/o mejorar la estabilidad química o biológica y la biodisponibilidad. La parte peptídica de la molécula inhibidora de PAD puede comprender D-aminoácidos, α -aminoácidos, α -metil aminoácidos y/o α -alquenil aminoácidos para prevenir, retrasar o inhibir la biodegradación después de administrar el compuesto a un sujeto que debe ser tratado.

Modificación del C- y/o N-término de la parte peptídica

20 [0033] En un compuesto de la invención, el término carboxi del péptido se puede modificar o extender con un grupo protector, que prevendrá la degradación enzimática y/o aumentará la estabilidad química y/o solubilidad en soluciones acuosas. Un compuesto según la invención puede comprender un grupo protector C-terminal que es un grupo alquilo, arilo o alquilarilo, ramificado o lineal, opcionalmente conteniendo N, O, S o fracciones sustituidas de halógeno, comprendiendo en total 3 a aproximadamente 25 átomos.

25 [0034] Preferiblemente un grupo protector C-terminal es elegido del grupo que consiste en NH₂, NH-NH₂, NHR₁₋₈, NH-NHR₁₋₈, CH₂ CN, R₁₋₈, O-R₁₋₈, CHR₁₋₈ R₁₋₈, CR₁₋₈ R₁₋₈ R₁₋₈, NR₁₋₈ R₁₋₈ y CH₂ -NR₁₋₈ R₁₋₈, donde independientemente para cada R₁₋₈ un R₁ a R₈ como se describe abajo es elegido, y donde;

- 30 - R₁ representa una cadena lineal o ramificada saturada o insaturada (opcionalmente múltiple) que contiene 1-12 átomos de carbono;
- R₂ representa un grupo alquilo que contiene 1-12 átomos de carbono donde 4-8 de los átomos de carbono forman una fracción cíclica;
- 35 - R₃ representa R₁ o R₂ donde hasta 1-4 átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos;
- R₄ representa un grupo de arilo, bisarilo o arilo fusionado que contiene 6-12 anillos de átomos de carbono;
- R₅ representa R₄ donde 1-4 átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos;
- 40 - R₆ representa un grupo de alquilarilo en el que la parte de alquilo es lineal, cíclica o ramificada y consiste en 1-6 átomos de carbono y la parte de arilo consiste en 6 átomos de carbono;
- R₇ representa R₆ donde 1-3 átomos en la parte de alquilo y/o 1-4 átomos en la parte de arilo han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos; y,
- 45 - R₈ representa R₁ a R₇ que es sustituido con 1-4 sustituyentes adicionales, que son seleccionados del grupo que consiste en (C₁-C₆)alquilo, (C₃-C₆)cicloalquilo, (C₁-C₆)alquenilo, (C₁-C₆)alquinilo, (C₁-C₆)alcoxi, (C₁-C₆)tioalcoxi, nitro, halógeno y un grupo heterocíclico con 4-6 anillos de átomos de los cuales 1-5 son átomos de carbono y 1-3 son átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos.

[0035] La parte peptídica de un compuesto de la invención también se puede proteger en el término amino del péptido. El término amino se puede modificar o extender con un grupo protector, donde el grupo protector N-terminal puede ser un grupo ramificado o lineal de alquilo, arilo o alquilarilo, opcionalmente conteniendo N, O, S o fracciones sustituidas de halógeno, en total comprendiendo 3 a aproximadamente 25 átomos. Preferiblemente el grupo protector N es elegido del grupo que consiste en: R₁₋₈ C(O), R₁₋₈ O-C(O), R₁₋₈, R₁₋₈ -SO₂, o dos de tales grupos protectores que pueden ser iguales o diferentes pueden estar presentes, donde independientemente para cada R₁₋₈ uno de R₁ a R₈ como se describe abajo es elegido, en donde:

- 55 - R₁ representa una cadena lineal o ramificada saturada o insaturada (opcionalmente múltiple) que contiene 1-12 átomos de carbono;
- R₂ representa un grupo de alquilo que contiene 1-12 átomos de carbono en donde 4-8 de los átomos de carbono forman una fracción cíclica;
- R₃ representa R₁ o R₂ en donde hasta 1-4 átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos;
- 60 - R₄ representa un grupo de arilo, bisarilo o arilo fusionado que contiene 6-12 anillos de átomos de carbono; preferiblemente un grupo R₄-SO₂ o 2-naftilsulfonilo donde R₄ es un grupo de arilo con 10 átomos de carbono (es decir, un grupo naftilo);
- R₅ representa R₄ en donde 1-4 átomos de carbono han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos;
- 65 - R₆ representa un grupo de alquilarilo en donde la parte de alquilo es lineal, cíclica o ramificada y consiste en 1-6 átomos de carbono y la parte de arilo consiste en 6 átomos de carbono;

- R₇ representa R₆ en donde 1-3 átomos en la parte de alquilo y/o 1-4 átomos en la parte de arilo han sido sustituidos por átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos; y,
- R₈ representa R₇ que es sustituido con 1-4 sustituyentes adicionales, que son seleccionados del grupo que consiste en (C₁-C₆)alquilo, (C₃-C₆)cicloalquilo, (C₁-C₆)alqueno, (C₁-C₆)alquino, (C₁-C₆)alcoxi, (C₁-C₆)tioalcoxi, nitro, halógeno y un grupo heterocíclico con 4-6 anillos de átomos de los cuales 1 - 5 son átomos de carbono y 1 - 3 son átomos de N, O o S o combinaciones de los mismos.

5

10

Como una forma de realización preferida, un compuesto de la invención es tal que el N-término de la secuencia peptídica se modifica por un grupo acetilo y/o el C-término como una amida. Se descubrió que estos compuestos tienen una estabilidad aumentada como inhibidor.

15

[0036] Como otra forma de realización preferida, un compuesto de la invención es tal que el N-término de la secuencia peptídica se modifica por la adición de un grupo 2-naftilsulfonilo. Tales compuestos tienen propiedades atractivas puesto que tienen una estabilidad aumentada como inhibidor y sorprendentemente se ha descubierto que tienen actividad mejorada inhibitoria o eficacia mejorada como inhibidor de PAD2 y PAD4 (ver ejemplo 9). Compuestos preferidos de la invención comprenden una parte peptídica, dicha parte peptídica comprendiendo o consistiendo en las secuencias de la identidad SEQ ID NO: 115 o 119 según se identifica en la tabla 23 en el ejemplo 9.

20

[0037] Como otra forma de realización preferida, un compuesto de la invención es tal que el C-término de la secuencia peptídica se modifica por la adición de un D-aminoácido. Tales compuestos tienen propiedades atractivas puesto que tienen una estabilidad aumentada como inhibidor y sorprendentemente se ha descubierto que tienen actividad inhibitoria que no está afectada por esta modificación (ver ejemplo 9). Compuestos preferidos de la invención comprenden una parte peptídica, dicha parte peptídica comprendiendo o consistiendo en las secuencias SEQ ID NO: 120-125 según se identifica en la tabla 26 en el ejemplo 9.

25

30

[0038] Como una forma de realización más preferida, un compuesto de la invención es tal que el N-término de la secuencia peptídica se modifica por la adición de un grupo 2-naftilsulfonilo y el C-término de la secuencia peptídica se modifica por la adición de un D-aminoácido. Compuestos preferidos de la invención comprenden una parte peptídica, dicha parte peptídica comprendiendo o consistiendo en las de la secuencias SEQ ID NO: 129-135 según se identifica en la tabla 28 en el ejemplo 9.

35

[0039] Para aumentar la solubilidad de la parte peptídica, que puede ser insuficientemente soluble cuando están presentes varios aminoácidos apolares, la parte peptídica se puede modificar por adición de grupos polares de aumento de solubilidad, en particular en el N- y / o C-término de la parte peptídica. El grupo de solubilización preferiblemente es una fracción de espaciador localizada entre el N- y/o C-término de la parte peptídica y el grupo protector N- o C-terminal. En una forma de realización más preferida, el grupo de solubilización representa una fracción de espaciador polar con la estructura NH-(CH₂-CH₂O)_m-(CH₂)_n C(O) en donde m = 1-6 y n = 0,1 o 2.

40

45

50

[0040] Aunque la actividad de PAD se puede inhibir en el espacio extracelular, la inhibición de PAD también puede tener lugar intracelularmente, por ejemplo para inhibir la citrulinación de histonas y otros sustratos, por ejemplo para alterar la expresión génica. Para facilitar o mejorar la absorción celular de moléculas inhibitorias de PAD según la presente invención, en otra forma de realización las moléculas inhibitorias de péptidos se pueden fusionar con dominios de transducción de proteínas o a péptidos penetrantes en la célula. Diferentes proteínas y péptidos pequeños tienen la capacidad de transducir o desplazarse a través de membranas biológicas independientes de vías mediadas por endocitosis o por receptores tradicionales. Ejemplos de estas proteínas incluyen la proteína TAT de HIV-1, el virus del herpes simple 1 (HSV-1) la proteína VP22 de unión de ADN, y el factor de transcripción homeótica de Drosophila Antennapedia (Antp). Los pequeños dominios de transducción de proteínas (PTDs) de estas proteínas se pueden fusionar a otras macromoléculas, péptidos o proteínas para transportarlas exitosamente en una célula, incluyendo los polipéptidos y polipéptidos modificados según esta especificación. Alineamientos de secuencias de los dominios de transducción muestran un alto contenido de aminoácidos básicos (Lys y Arg) que pueden facilitar la interacción de estas regiones con lípidos cargados negativamente en la membrana. Los análisis de la estructura secundaria no muestran ninguna estructura consistente entre los tres dominios.

55

[0041] Un compuesto según la invención es capaz de inhibir una enzima PAD, *in vitro* y/o *in vivo*, intracelularmente y/o extracelularmente. PAD2 y/o PAD4 son las más preferidas puesto que estas enzimas son enzimas implicadas en un proceso de citrulinación relacionado con la autoinmunidad.

Composición

60

65

[0042] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto como se ha definido anteriormente aquí y al menos un excipiente, dicha composición preferiblemente es una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno autoinmunitario, preferiblemente en seres humanos. Dicha composición o compuesto también se puede usar para retrasar el desarrollo de tal trastorno. Trastornos autoinmunitarios son enfermedades en donde el sistema inmunológico se dirige a un antígeno endógeno, con daño consecuente en los tejidos. La citrulinación aberrante juega frecuentemente un papel en el reconocimiento de autoantígenos por el sistema inmunológico de un sujeto. Un compuesto o composición según la invención se puede

utilizar para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con PAD y/o relacionado con la citrulinación, o una enfermedad o trastorno exacerbado con PAD. En particular, un compuesto inhibitorio de PAD o una composición según la invención se puede utilizar para la producción de medicamentos para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, tal como, pero no limitado a RA, MS, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, esclerosis sistémica (escleroderma), síndromes de lupus neonatal, miopatías idiopáticas inflamatorias, artritis juvenil crónica, artritis psoriática, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad mixta del tejido conjuntivo (MCTD), síndrome de Sjögren y granulomatosis de Wegener.

[0043] Un compuesto según la invención se puede formular con excipientes aceptables farmacéuticamente. Por lo tanto una composición de la invención comprende un compuesto de la invención y al menos un excipiente. La formulación de composiciones farmacéuticas adecuadas para varias vías de administración, oral o parenteral, se conoce en la técnica y se describe en varios manuales tales como Remington Pharmaceutical Sciences, Mack publishing co., 1989. Una composición farmacéutica se puede adaptar adecuadamente por el experto en la materia para un compuesto dado según la invención, y/o para el trastorno autoinmunitario para ser tratado, y/o para la vía de administración / ubicación en el cuerpo. Puede ser preferible combinar un compuesto inhibitorio de PAD de la invención en una composición farmacéutica o formulación con otros compuestos activos, tales como agentes inmunosupresores y/o un agente supresor de inflamación. Un ejemplo preferido de compuestos inmunodepresivos que se pueden utilizar en combinación con moléculas inhibitorias de PAD de la invención son Azatioprina (Imuran), Ciclosporina (A), Mercaptopurina (Purineto; 6-Pf), ejemplos preferidos de agentes supresores de la inflamación son NSAIDs (fármacos no esteroides antiinflamatorios) o corticoesteroides tales como prednisolona.

[0044] En una forma de realización preferida una composición farmacéutica según la invención es una composición para el tratamiento de RA y es una composición para la administración parenteral, preferiblemente tópica tal como formulaciones de pomada o depositarias que se puede aplicar tópicamente en articulaciones inflamadas. De la forma más preferible tales composiciones comprenden excipientes que permiten la administración transdérmica de un compuesto inhibitorio de PAD, por ejemplo una formulación en liposomas. En otra forma de realización preferida, una composición según la invención es una composición para el tratamiento de RA y es una composición para la administración parenteral, administración preferiblemente tópica por inyección en la articulación inflamada y/o afectada por RA, preferiblemente directamente en el líquido sinovial de la articulación, u opcionalmente por sustitución del líquido sinovial en una articulación, a concentraciones entre 1 µg a 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg por inyección en una dosis individual, dependiendo de la afinidad y actividad de un compuesto, el tamaño de la articulación en el sujeto y de la gravedad de la inflamación. No obstante, dada la alta especificidad de una molécula inhibitoria o compuesto de la invención, los efectos secundarios leves son anticipados y la administración sistémica de los inhibidores de PAD por ingestión oral o inyecciones intramusculares o intravenosas son otras vías de administración posibles.

[0045] En particular, un medicamento según la invención se puede utilizar en métodos de tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmunitaria tal como se ha mencionado anteriormente, en un sujeto, preferiblemente un humano y de la forma más preferible para el tratamiento de RA y MS.

[0046] En el contexto de la invención, un organismo o un individuo o un sujeto para ser tratado puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, el organismo es un ser humano. Preferiblemente, un organismo tratado es sospechoso de tener un alto riesgo de desarrollar un trastorno autoinmunitario tal como RA, debido por ejemplo a la predisposición genética potencial, y/o a la edad del sujeto y/o al estilo de vida de un sujeto (por ejemplo hábito nutricional y/o a la ausencia de actividad física).

El término "prevención" debe ser entendido que incluye la prevención completa, profilaxis, al igual que para la reducción del riesgo del individuo de caer enfermo con dicha enfermedad o condición. El término también debe ser entendido que incluye alivio de síntomas ya desarrollados. El término "retrasar" usado aquí significa la administración del compuesto a un organismo, es decir un paciente que está en una pre-fase de la condición a tratar en donde los pacientes una pre-forma de la condición correspondiente se diagnostica por métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, la aparición de los síntomas de la enfermedad, son retrasados al menos varios meses hasta un año o más.

El término "tratar" o "tratamiento" se refiere al manejo y cuidado de un paciente para el propósito de combatir la enfermedad, condición, o trastorno. Cada compuesto de la invención tal y como se define aquí es conveniente para ser usado para prevenir el retraso y/o tratamiento de un trastorno autoinmunitario tal y como se define aquí.

[0047] Por consiguiente en una forma de realización preferida, un compuesto o una composición de la invención son para uso como un medicamento tal y como se ha definido antes aquí.

[0048] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que unidades después de la palabra son incluidas, pero unidades no específicamente mencionadas no son excluidas. Además, referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "uno" así normalmente significa "al menos uno". Además la palabra "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente de" que significa que un compuesto o una composición como se define aquí puede comprender componente(s) adicional(es) que los aquí identificados específicamente, dicho(s) componente(s) adicional(es) no alterando la única característica de la invención. En el contexto de la invención, la palabra "aproximadamente" cuando se usa en el contexto de un compuesto (es decir,

aproximadamente 5 aminoácidos) significa que hay 5 a 6 aminoácidos

[0049] Los siguientes ejemplos se ofrecen para uso ilustrativo sólo, y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

[0050] Los compuestos usados en los ejemplos que no están reivindicados se catalogan para fines comparativos y/o ilustrativos únicamente.

Breve descripción de los dibujos

[0051]

Figura 1. Lisados de células COS-1 que expresan cualquiera de las proteínas humanas PAD2 o PAD4 fueron incubados a 37 °C durante 30 minutos en presencia de 10 mM de CaCl₂. La citrulinación de proteínas en los lisados fue visualizada por SDS-PAGE/Western Blot, seguido de la modificación de residuos de citrulina y la incubación con anticuerpos de anticitrulina modificada (líneas 1 y 4). Las proteínas citrulinadas fueron aisladas de los lisados por purificación de inmunoafinidad usando el anticuerpo Ra3 scFv (líneas 3 y 6), y un scFv no relacionado (dirigido a GST) como un control negativo (líneas 2 y 5), y analizado en paralelo.

Figura 2. Blot desarrollado con estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Mezclas de varias cantidades de péptido inhibidor biotinilado (biotin-Ahx-D-S-K-K-H-D-O(FA)-D-F-L-Y-S-D-amida, O(FA) = fluoroamidina de ornitina, Ahx = ácido 6-aminohexanoico) y una cantidad fija de PAD4 marcado con His fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF y desarrolladas con conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, y seguidas de visualización mediante el uso de NBT/BCIP. En la tabla 18 se especifican las muestras.

Figura 3. Blot desarrollado con 1 fosfatasa alcalina de ratón anti-His, 2 fosfatasas alcalinas de oveja antirratón.

Mezclas de varias cantidades de péptido inhibidor biotinilado (biotin-Ahx-D-S-K-K-H-D-O(FA)-D-F-L-Y-S-D- amida, O(FA) = fluoroamidina de ornitina, Ahx = ácido 6-aminohexanoico) y una cantidad fija de PAD4 marcado con His fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y desarrolladas con anticuerpos antirratón de His seguido de conjugado de fosfatasa alcalina de oveja antirratón, seguidas de visualización mediante el uso de NBT/BCIP. En la tabla 18 se especifican las muestras.

Figura 4. La capacidad de varios compuestos para inhibir la conversión de éster etílico de benzoilarginina en éster etílico de benzoilcitrulina por una PAD, como se ha indicado, fue determinada por el ensayo colorimétrico usando DAMO y antipirina para modificar éster etílico de benzoilcitrulina. La conversión de BAEE en ausencia de cualquier compuesto inhibitorio fue fijada al 100%.

Figura 5. Esta figura ilustra los datos de espectrometría de masas observados para la conversión de péptido D-S- K-K-F-H-R-G-F-L-Y-S-D (0708-33; MH2²⁺_{calc} = 800.39; MH3³⁺_{alc} = 533.93) mediada por PAD en su variante de citrulina (ΔM = 0.98 Da).

A: espectro de masa de péptido de sustrato D-S-K-K-F-H-R-G-F-L-Y-S-D (parte superior) y péptido de producto D-S-K-K-F-H-Cit-G- F-L-Y-S-D (parte inferior) al 100 % de la conversión por PAD.

B: ampliación de señales ³⁺.

C: ampliación de señales ²⁺.

Figura 6. El modelo de artritis inducida por anticuerpo de colágeno (CAIA) (MQR; 18.101) fue usado para probar el efecto terapéutico del inhibidor de PAD CXP5.7-011 (SEQ ID NO:143). El día 0 se inyectó i.p. a los ratones con 2,8 mg de anticuerpos de anticolágeno. Se administró LPS (25 µg/ratón) en el día 3 vía inyección i.p. El inhibidor (0,5 mg CXP5.7-011 en 200 µl de PBS conteniendo 20 mM de fosfato sódico), o 200 µl de PBS conteniendo 20 mM de fosfato sódico como placebo, fue administrado a diario desde el día 3 hasta el día 11 (con excepción del día 9). Se marcó a los animales a diario hasta el día 14 para observar el grado de inflamación. El nivel de artritis medio por grupo experimental (5 ratones) se indica en cada punto de tiempo.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Inhibidores basados en sustratos naturales

[0052] Diferentes sustratos para PAD han sido identificados en el nivel de proteínas. Se ha demostrado que *in vivo*, en particular las argininas en proteínas, se pueden convertir en citrulina (Cit), mientras que otras argininas parecen ser completamente resistentes a la conversión en citrulina. De estas observaciones está claro que el medio químico de un residuo de arginina determina sus propiedades de sustrato. Para investigar la identidad de los aminoácidos flanqueantes que se encuentran más frecuentemente en el entorno de las argininas que se convierten por enzimas PAD, ADNc que codifica PAD2 y PAD4 humanas fueron clonados en el vector de expresión eucariótico pCI-NEO (Promega, Leiden, The Netherlands) en marco con una secuencia que codifica la etiqueta VSV-G. Las células COS-1 o HEK293 cultivadas

fueron modificadas con los constructos resultantes y la expresión de PAD en estas células fue verificada mediante inmunoblot, usando extractos de las células preparadas 48 horas después de la transfección y antisueros monoespecíficos anti-PAD cultivados en conejos. Los resultados mostraron que ambas PAD2 y PAD4 fueron expresadas eficazmente en estas células. El análisis de extractos de estas células con anticuerpos de anticitrulina modificada (AMC), después del tratamiento de Western Blot con los reactivos que modifican la peptidilcitrulina {Senshu et al., 1992} revelaron que, como se había previsto en base a las bajas concentraciones de calcio en la célula, no se podrían detectar proteínas citrulinadas. Para permitir la citrulinación de proteínas celulares, las células fueron lisadas en un tampón conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM de β -mercaptoetanol, 100 mM de NaCl, 10% glicerol e inhibidor de proteasa sin EDTA, y el lisado fue incubado posteriormente durante 30 minutos a 37 °C después de la adición de cloruro de calcio a una concentración final de 10 mM. Como un control, los lisados fueron incubados en paralelo en presencia de 5 mM de EDTA. Análisis de inmunoblot con los anticuerpos AMC, después del tratamiento de las proteínas electrotransferidas sobre las membranas de nitrocelulosa reforzadas con la mezcla de modificación química, revelaron que este procedimiento llevaba a una citrulinación dependiente de PAD y de calcio de proteínas múltiples celulares en el lisado (Figura 1).

De manera importante, se observaron diferencias en el modelo de proteínas citrulinadas obtenidas para las diferentes enzimas PAD, indicando que existen diferencias en la especificidad de sustrato de PAD2 y PAD4. Posteriormente, las proteínas citrulinadas fueron aisladas de los lisados celulares por purificación de inmunoafinidad usando el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla RA3 (scFv), que es específico para epítopos citrulinados {Raats et al., 2003}. Después de la digestión de las proteínas purificadas con tripsina, la secuencia de aminoácidos de los péptidos resultantes fue determinada por espectrometría de masas en serie. En base a los datos de la espectrometría de masas, los péptidos que contienen residuos citrulinados fueron identificados. En total 90 y 57 péptidos citrulinados fueron identificados en proteínas derivadas de las células COS-1 que expresan PAD2 y PAD4, respectivamente, y 107 y 38 péptidos citrulinados fueron obtenidos del material celular HEK-293 para PAD2 y PAD4, respectivamente. La frecuencia de los aminoácidos en cada una de las posiciones entre 5 residuos N-terminales y 5 residuos C-terminales de un residuo citrulinado fue derivada de las secuencias combinadas de estos sitios y se ilustra en la tabla 1. En base a estos datos específicos de PAD2 y PAD4, se sintetizaron péptidos 13-mero que contenían la arginina en la posición central (tabla 2). La eficiencia con la que estos péptidos fueron citrulinados por las enzimas humanas PAD2 y PAD4 fue investigada incubándolas con las enzimas recombinantes bacterianamente expresadas, marcadas con His₆ y purificadas con IMAC, seguido del análisis de los productos por ambas espectrometrías de masas MALDI-TOF y ESI-Q-TOF. La eficiencia de citrulinación de estos péptidos se cataloga en la tabla 2.

(En página siguiente)

Tabla 1

< 0.5
> 1.5
> 2.0
n/a

A. Células COS-1 expresando hPAD2; datos derivados de 90 secuencias peptídicas

	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
G	1,1	1,3	1,1	1,5	1,1	0,0	2,1	1,9	2,9	1,6	1,8
A	1,4	0,6	0,6	1,4	0,8	0,0	1,2	1,4	0,8	0,8	0,8
P	0,9	1,3	1,3	1,6	0,9	0,0	0,7	1,1	1,6	0,9	0,2
V	1,2	0,7	0,5	1,0	0,9	0,0	1,0	0,7	0,9	0,2	1,2
L	0,4	0,8	0,7	0,8	1,4	0,0	0,6	0,8	0,0	0,8	0,4
I	1,4	1,5	0,6	1,0	0,8	0,0	0,6	0,4	0,8	0,2	0,6
M	1,0	0,5	1,4	0,0	1,9	0,0	1,4	1,4	0,0	1,4	1,4
F	0,5	0,5	1,9	0,5	0,5	0,0	0,3	0,8	1,1	0,5	1,1
Y	0,7	0,7	0,3	1,7	0,3	0,0	0,3	0,7	2,4	1,4	0,3
W	0,0	0,8	0,8	0,8	2,5	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
S	1,7	1,7	1,2	0,6	1,5	0,0	1,5	1,5	0,8	0,9	0,8
T	0,9	0,6	0,8	1,1	0,4	0,0	0,8	0,8	1,1	0,6	0,8
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
N	1,0	1,2	0,2	1,2	0,2	0,0	0,7	0,2	0,2	1,0	0,2
Q	0,6	1,1	1,1	0,8	0,8	0,0	1,4	0,3	1,4	0,3	0,3
K	0,6	0,4	1,7	0,4	1,0	0,0	1,5	1,5	1,7	2,7	2,7
H	0,5	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	1,0	1,0	0,0	1,5	1,5
R	1,1	1,9	1,7	0,9	1,3	19,2	1,3	1,3	1,7	1,1	2,4
D	2,4	1,3	1,3	1,3	2,2	0,0	1,1	1,7	0,4	1,1	1,1
E	0,9	1,1	1,6	1,6	0,9	0,0	0,5	0,5	0,7	2,1	1,4

B. Células COS-1 expresando hPAD4; datos derivados de 57 secuencias peptídicas

	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
G	2,0	1,8	2,0	1,8	1,0	0,0	1,8	2,9	2,2	1,6	2,4
A	0,9	0,9	0,9	0,5	0,7	0,0	1,0	0,7	1,3	0,0	0,8
P	1,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,0	0,0	1,8	1,1	1,9	0,7
V	0,5	0,3	0,3	1,1	0,5	0,0	0,3	0,8	1,1	0,3	0,0
L	0,4	0,9	0,2	0,7	1,1	0,0	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2
I	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0
M	0,7	2,2	0,0	0,7	0,7	0,0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
F	0,8	1,3	2,1	0,8	0,8	0,0	0,9	0,9	0,0	1,3	0,4
Y	1,1	4,8	0,5	2,7	0,5	0,0	0,0	1,7	4,6	4,0	1,1
W	1,3	1,3	1,3	1,3	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
S	1,6	0,9	2,6	3,3	2,8	0,0	1,9	1,2	0,8	1,5	2,5
T	0,3	0,3	0,6	0,3	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	0,9
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
N	0,8	0,4	0,0	1,5	0,4	0,0	2,3	0,4	0,8	0,8	0,0
Q	0,4	0,4	0,9	0,9	0,0	0,0	0,4	0,9	0,0	1,4	0,0
K	0,6	1,2	2,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	1,0	0,3
H	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
R	2,7	2,3	2,3	1,3	2,3	19,2	1,7	1,4	3,6	1,4	1,8
D	1,3	0,0	1,0	0,7	2,7	0,0	4,5	2,1	1,4	1,8	1,4
E	1,4	0,8	0,6	0,3	1,7	0,0	2,0	1,5	0,6	1,2	3,3

< 0.5
> 1.5
> 2.0
n/a

C. Células HEK293 expresando hPAD2; datos derivados de 106 secuencias peptídicas.

	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
G	1,7	1,0	0,1	1,1	1,4	0,0	1,1	1,5	1,1	1,3	1,6
A	2,0	1,4	1,0	1,9	1,2	0,0	1,3	2,0	1,5	0,5	1,3
P	1,0	0,8	1,0	2,1	0,9	0,0	1,3	1,2	1,0	1,4	1,6
V	1,0	1,0	0,7	2,2	1,2	0,0	0,9	1,2	0,6	0,6	1,2
L	0,8	0,5	0,5	0,6	0,7	0,0	0,8	0,5	0,4	0,6	0,4
I	1,0	1,2	0,8	0,3	0,7	0,0	1,5	1,2	0,2	0,5	0,5
M	0,0	0,0	1,2	0,0	0,4	0,0	0,8	2,1	0,4	1,3	0,4
F	1,2	1,2	1,6	0,9	0,7	0,0	0,7	0,2	0,5	0,0	1,7
Y	0,9	1,2	1,8	1,2	1,5	0,0	1,2	0,9	2,1	1,5	0,6
W	0,7	2,2	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
S	0,1	1,4	1,2	0,6	0,5	0,0	0,8	0,7	1,3	0,9	0,7
T	0,5	0,5	0,5	0,2	1,0	0,0	0,8	1,2	1,3	1,5	0,5
C	0,5	1,1	0,0	1,1	1,1	0,0	1,1	1,1	0,0	1,1	1,1
N	0,6	0,6	0,6	0,4	0,8	0,0	1,0	0,6	0,8	0,6	0,9
Q	1,2	1,2	2,4	1,0	2,1	0,0	0,2	0,7	1,0	2,2	0,8
K	2,0	1,0	1,8	1,0	1,3	0,0	1,8	1,2	2,5	1,3	2,2
H	0,9	0,4	0,9	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0
R	1,1	1,5	1,1	0,9	1,3	19,2	1,3	0,9	1,9	1,9	1,9
D	0,8	1,5	1,7	1,3	1,5	0,0	0,9	0,9	0,8	0,2	0,8
E	0,8	0,6	0,9	1,1	0,8	0,0	0,8	0,9	0,6	1,6	0,5

D. Células HEK293 expresando hPAD4; datos derivados de 38 secuencias peptídicas

	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
G	5,7	3,4	3,8	2,7	1,9	0,0	3,1	3,5	5,2	3,4	1,9
A	1,8	1,1	0,4	0,7	1,1	0,0	0,4	0,8	0,4	0,5	0,5
P	1,1	0,5	0,5	1,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,6	1,3	0,7
V	0,0	0,4	1,2	0,4	0,8	0,0	0,8	0,0	0,0	1,0	0,5
L	0,0	1,1	0,0	0,6	0,3	0,0	0,3	0,3	0,7	0,4	0,4
I	0,5	0,0	0,5	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
M	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	2,3	1,3	0,0	0,0	2,9
F	0,0	3,2	1,9	0,6	0,6	0,0	2,0	1,5	0,8	0,0	0,8
Y	1,6	2,4	4,9	0,0	1,6	0,0	0,8	2,8	4,0	0,0	2,1
W	2,0	5,9	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0
S	1,4	1,4	1,8	2,9	3,6	0,0	1,8	4,5	2,2	2,7	2,7
T	0,0	0,4	0,9	0,4	0,4	0,0	0,0	1,0	1,1	0,6	0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
N	0,6	1,2	0,0	0,6	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,7
Q	2,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,8	0,8	1,7
K	0,0	0,5	0,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H	0,0	0,0	1,2	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R	1,0	0,0	0,5	1,0	2,0	19,2	2,1	0,6	1,2	1,9	3,2
D	0,5	0,0	0,0	1,5	3,1	0,0	2,6	0,6	0,6	1,3	0,0
E	0,4	0,4	0,0	0,4	0,8	0,0	0,4	0,5	0,0	1,6	0,5

[0053] La inmunofinidad de proteínas purificadas de lisados de células citrulinadas fue sometida a una espectrometría de masas para identificar los sitios de citrulinación. Las secuencias de los péptidos citrulinados fueron alineadas y la frecuencia de aminoácidos se encontró en las regiones que flanquean las citrulininas (de 5 residuos N-terminales a 5 residuos C-terminales de la citrulina) fue determinada y normalizada para el suceso natural de aminoácidos en proteínas humanas. Por lo tanto, los valores > 1 indican una representación mayor de los aminoácidos respectivos, mientras que valores < 1 indican que estos aminoácidos se encuentran menos frecuentemente en los sitios de citrulinación.

Tabla 2

Citruilación de péptidos sintéticos por proteínas recombinantes humanas PAD2 y PAD4 según se determina por MALDI-TOF y espectrometría de masas ESI-Q-TOF.								
SEQ ID NO:	Secuencia	Designado para	Conversión por PAD2			Conversión por PAD4		
			Arg	1 Cit	2 Cit	Arg	1 Cit	2 Cit
1	DDYSSSRDGYGGS	PAD4	88%	12%	-	97%	3%	-
2	GGYSGDRSGGGYG	PAD4	33%	67%	-	61%	39%	-
3	DGYGSRDSYSSS	PAD4	54%	46%	-	97%	3%	-
4	DSYRSWRDGYYS	PAD4	16%	30%	55%	1%	99%	0%
5	IEIMDRGSGKRR	PAD2	6%	34%	60%	37%	60%	3%
6	IGSRGDRSGFGKF	PAD2	1%	96%	4%	2%	69%	29%
7	IEIITDRQSGKRR	PAD2	5%	70%	25%	2%	88%	10%
8	DSEGTWRKGPEAD	PAD2	15%	85%	-	85%	15%	-
9	DSSEELRGGGKSD	PAD2	43%	57%	-	93%	7%	-
10	DSRFYWRGGGKSD	PAD2	14%	14%	73%	6%	69%	25%
11	DSQFAFRGASASD	PAD4 (L1)	68%	32%	-	98%	2%	-

5 [0054] La tabla 2 comprende péptidos representados por las secuencias siguientes SEQ ID NO:1-10. SEQ ID NO: 11 representa el control L1.

Las siguientes secuencias de aminoácidos fueron elegidas para la síntesis de inhibidores:

10 I-E-I-M-T-D-R-G-S-G-K-K-R (SEQ ID NO 5) y
I-G-S-R-G-D-R-S-G-F-G-K-F (SEQ ID NO 6) para PAD2
D-D-Y-S-S-S-R-D-G-Y-G-G-S (SEQ ID NO 1) y
G-G-Y-S-G-D-R-S-G-G-G-Y-G (SEQ ID NO 2) para PAD4

15 Inicialmente 8 inhibidores de pentapéptidos derivados de estas secuencias fueron evaluados:

20 T-D-O(FA)-G-S (SEQ ID NO:12)
G-D-O(FA)-S-G (SEQ ID NO:13)
S-S-O(FA)-D-G (SEQ ID NO:14)
G-S-O(FA)-D-G (SEQ ID NO:15)
T-D-O(CA)-G-S (SEQ ID NO:16)
G-D-O(CA)-S-G (SEQ ID NO:17)
S-S-O(CA)-D-G (SEQ ID NO:18)
G-S-O(CA)-D-G (SEQ ID NO:19)

25 [0055] Estos 8 inhibidores de pentapéptidos se representan por SEQ ID NO:12-19.

[0056] (O (FA) significa fluoroamidina de ornitina, O(CA) significa cloroamidina de ornitina).

30 [0057] Los IC₅₀'s para PAD2 y 4 humanas al igual que para PAD2 y 4 de ratón fueron determinados en un ensayo desarrollado por Zendman y otros {Zendman et al., 2007}. De esta serie, el inhibidor T-D-O(FA)-G-S (CXP5-101) fue el mejor inhibidor de PAD2 y PAD4. Posteriormente, diferentes modificaciones fueron llevadas a cabo en este compuesto de plomo. Una segunda ronda de selección mostró que G-D-O(CA)-G-S (CXP5.2-078) (SEQ ID NO:20) y Y-D-O(CA)-G-S (CXP5.2-081) (SEQ ID NO:21) eran más potentes que T-D-O(FA)-G-S. También Ac-G-D-O(CA)-G-S-amida (CXP5.7-012) (SEQ ID NO: 142) y Ac-Y-DO(CA)-G-S-amida (CXP5.7-011) (identidad SEC NO:143) fueron sintetizadas porque
35 se esperaba que éstas poseyeran una estabilidad más alta *in vivo* (ver ejemplo 10).
Para comparar los mejores inhibidores para la CI-amidina, se publicó un inactivador de PAD 4 recientemente {Luo et al., 2006}, un ensayo colorimétrico fue desarrollado (ver ejemplo 6).

40 Ejemplo 2: Inhibidores basados en sustratos no naturales

[0058] De estudios precedentes se conoce que D-S-Q-F-A-F-R-G-A-S-A-S-D (designado aquí como L1: SEQ ID NO: 11)

ES 2 400 013 T3

es un sustrato para PAD2 y PAD 4. Para obtener mejores sustratos, y posteriormente inhibidores potentes, intentamos identificar elementos estructurales que mejoren las propiedades del sustrato. Un conjunto de 152 péptidos individuales análogos fue generado, cada uno difiriendo de L1 por un aminoácido en una de las posiciones -4 a -1 o 1 a 4.

5 En la tabla 3, está representada la conversión de cada análogo (conversión R en Cit). Los valores de los análogos se refieren a la conversión del análogo en comparación con la conversión de L1 bajo condiciones estándar (100 significa una conversión igual a L1, 50 significa conversión del 50% de aquella de L1, 175 significa conversión del 175% de aquella de L1). Los números por encima de 100 se refieren a sustituciones de aminoácidos que mejoran las propiedades del sustrato.

10 Tabla 3, conversión de análogos de L1 por PAD4

	-6	-5	-4	-3	-2	-1		1	2	3	4	5	6
	D	S	Q	F	A	F	R	G	A	S	A	S	D
A			80	80	100	75		15	100	100	100		
C			0	100	150	100		50	115	150	125		
D			40	80	40	190		150	100	110	110		
E			60	60	70	90		115	100	140	125		
F			130	100	160	100		15	130	150	150		
G			80	100	80	75		100	100	100	100		
H			165	180	165	210		50	130	140	10		
I			80	80	90	0		15	0	150	100		
K			190	230	165	100		10	60	130	110		
L			120	100	150	75		0	100	175	100		
M			100	80	140	75		15	100	150	110		
N			80	60	120	100		60	65	100	100		
P			120	40	60	50		0	35	125	100		
Q			100	80	120	25		35	65	110	110		
R			265	180	160	100		25	110	10	175		
S			110	40	100	150		50	90	100	100		
T			90	40	100	90		25	85	100	110		
V			90	40	80	50		0	75	150	90		
W			160	120	150	75		50	140	125	150		
Y			100	40	120	100		25	130	110	150		

[0059] En base a los resultados anteriores, diseñamos 25 péptidos que contienen diversos aminoácidos que mejoran las propiedades del sustrato (ver tabla 4). Los péptidos indicados fueron sintetizados y evaluados para identificar el mejor sustrato de este grupo.

15

Tabla 4

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Conversión (%)
0608-21	22	D-S-K-H-H-S-R-D-H-L-E-S-D	n.t.
0608-22	23	D-S-K-H-K-D-R-E-Y-V-F-S-D	90%
0608-23	24	D-S-K-H-F-H-R-D-F-I-Y-S-D	n.t.
0608-24	25	D-S-K-H-L-S-R-E-W-M-W-S-D	90%
0608-25	26	D-S-K-H-W-D-R-D-H-F-E-S-D	n.t.
0608-26	27	D-S-K-H-H-H-R-E-Y-L-F-S-D	n.t.
0608-27	28	D-S-K-H-K-S-R-D-F-V-Y-S-D	n.t.
0608-28	29	D-S-K-H-F-D-R-E-W-I-W-S-D	n.t.
0608-29	30	D-S-K-K-L-H-R-D-H-M-E-S-D	n.t.
0608-30	31	D-S-K-K-W-S-R-E-Y-F-F-S-D	90%
0608-31	32	D-S-K-K-H-D-R-D-F-L-Y-S-D	100% (=L2)
0608-32	33	D-S-K-K-K-H-R-E-W-V-W-S-D	n.t.

ES 2 400 013 T3

0608-33	34	D-S-K-K-F-S-R-D-H-I-E-S-D	n.t.
0608-34	35	D-S-H-K-L-D-R-E-Y-M-F-S-D	90%
0608-35	36	D-S-H-K-W-H-R-D-F-F-Y-S-D	n.t.
0608-36	37	D-S-H-K-H-S-R-E-W-L-W-S-D	90%
0608-37	38	D-S-H-H-K-D-R-D-H-V-E-S-D	n.t.
0608-38	39	D-S-H-H-F-H-R-E-Y-I-F-S-D	90%
0608-39	40	D-S-H-H-L-S-R-D-F-M-Y-S-D	95%
0608-40	41	D-S-H-H-W-D-R-E-W-F-W-S-D	100%
0608-41	42	D-S-H-K-H-H-R-D-H-L-E-S-D	n.t.
0608-42	43	D-S-H-K-K-S-R-E-Y-V-F-S-D	n.t.
0608-43	44	D-S-H-K-F-D-R-D-F-I-Y-S-D	100%
0608-44	45	D-S-H-K-L-H-R-E-W-M-W-S-D	95%
0608-45	46	D-S-H-K-W-S-R-D-H-F-E-S-D	n.t.
0308-29	11	D-S-Q-F-A-F-R-G-A-S-A-S-D	30% (=L1)

5 [0060] Los péptidos de la tabla 4 se representan en las siguientes secuencias SEQ ID NO: 22-31 y 33-46. Los péptidos de control se representan por las siguientes secuencias SEQ ID NO: 11 como control L1 y SEQ ID NO: 32 como control L2. Desgraciadamente, un número sustancial de péptidos diseñados fueron demasiado polares para ser analizados en nuestro sistema LC-MS (indicado en la tabla 4 como n.t., no retenido en la columna). Por lo tanto, también generamos y evaluamos estos péptidos que contienen dos residuos de F N-terminales adicionales para aumentar la hidrofobicidad. De esta forma, los péptidos fueron retenidos en la columna y pudieron ser analizados (ver tabla 5).

Tabla 5			
Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Conversión (%)
0612-23	47	F-F-D-S-K-H-H-S-R-D-H-L-E-S-D	100
0612-24	48	F-F-D-S-K-H-K-D-R-E-Y-V-F-S-D	100
0612-25	49	F-F-D-S-K-H-F-H-R-D-F-I-Y-S-D	100
0612-26	50	F-F-D-S-K-H-L-S-R-E-W-M-W-S-D	100
0612-27	51	F-F-D-S-K-H-W-D-R-D-H-F-E-S-D	100
0612-28	52	F-F-D-S-K-H-H-H-R-E-Y-L-F-S-D	100
0612-29	53	F-F-D-S-K-H-K-S-R-D-F-V-Y-S-D	100
0612-30	54	F-F-D-S-K-H-F-D-R-E-W-I-W-S-D	100
0612-31	55	F-F-D-S-K-K-L-H-R-D-H-M-E-S-D	88
0612-32	56	F-F-D-S-K-K-W-S-R-E-Y-F-F-S-D	100
0612-33	57	F-F-D-S-K-K-H-D-R-D-F-L-Y-S-D	100
0612-34	58	F-F-D-S-K-K-K-H-R-E-W-V-W-S-D	100
0612-35	59	F-F-D-S-K-K-F-S-R-D-H-I-E-S-D	97
0612-36	60	F-F-D-S-H-K-L-D-R-E-Y-M-F-S-D	100
0612-37	61	F-F-D-S-H-K-W-H-R-D-F-F-Y-S-D	100
0612-38	62	F-F-D-S-H-K-H-S-R-E-W-L-W-S-D	100
0612-39	63	F-F-D-S-H-H-K-D-R-D-H-V-E-S-D	100
0612-40	64	F-F-D-S-H-H-F-H-R-E-Y-I-F-S-D	No evaluado
0612-41	65	F-F-D-S-H-H-L-S-R-D-F-M-Y-S-D	98
0612-42	66	F-F-D-S-H-H-W-D-R-E-W-F-W-S-D	100
0612-43	67	F-F-D-S-H-K-H-H-R-D-H-L-E-S-D	100

ES 2 400 013 T3

0612-44	68	F-F-D-S-H-K-K-S-R-E-Y-V-F-S-D	100
0612-45	69	F-F-D-S-H-K-F-D-R-D-F-I-Y-S-D	100
0612-46	70	F-F-D-S-H-K-L-H-R-E-W-M-W-S-D	100
0612-47	71	F-F-D-S-H-K-W-S-R-D-H-F-E-S-D	100

[0061] Los péptidos de la tabla 5 se representan por las siguientes secuencias SEQ ID NO:47-71.

5 [0062] De estos resultados es obvio que este conjunto de péptidos contiene sustratos de PAD4 con propiedades de sustrato mejoradas comparadas con L1 (0308-29). Además, la incorporación de los dos residuos de F pareció mejorar las propiedades del sustrato en casos particulares.

10 [0063] El péptido 0608-31 (designado como L2) fue elegido como compuesto de plomo para obtener incluso mejores sustratos para PAD4.

[0064] En una forma muy similar al método anteriormente descrito, L2 fue tomado como un péptido de plomo. Nuevamente 152 péptidos sustituidos por aminoácidos sencillos fueron generados y evaluados. Los resultados se representan en la tabla 6 (para explicación, ver tabla 3).

15 **Tabla 6, conversión de análogos de L2 por PAD4**

	-6	-5	-4	-3	-2	-1		1	2	3	4	5	6
	D	S	K	K	H	D	R	D	F	L	Y	S	D
A			45	65	75	60		95	80	65	125		
C			120	65	100	120		85	90	105	165		
D			60	50	80	100		100	75	95	145		
E			70	90	80	70		80	40	95	140		
F			85	100	215	125		0	100	115	175		
G			55	55	85	85		110	55	95	135		
H			125	110	100	160		60	210	100	145		
I			85	80	65	5		5	100	110	150		
K			100	100	110	130		45	175	70	110		
L			90	70	100	40		25	80	100	110		
M			80	75	150	100		30	85	110	130		
N			110	75	95	100		70	65	90	110		
P			70	75	25	10		25	20	85	140		
Q			70	85	90	40		45	75	75	125		
R			105	145	120	100		45	105	95	135		
S			75	80	95	15		55	45	100	105		
T			50	75	85	40		30	80	95	95		
V			75	45	85	50		5	60	90	95		
W			100	135	150	95		10	125	100	165		
Y			60	95	165	90		30	90	100	100		

20 [0065] En base a los resultados anteriores, diseñamos 20 péptidos que contienen varios aminoácidos que mejoran las propiedades del sustrato (ver tabla 7). Los péptidos indicados fueron sintetizados y evaluados para identificar el mejor sustrato de este grupo. Aquí usamos un sistema de prueba con menos enzimas (3 veces menos) en comparación con los experimentos anteriormente descritos.

ES 2 400 013 T3

Tabla 7

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Conversión
0708-15	72	D-S-K-K-F-D-R-D-H-L-Y-S-D	51
0708-16	73	D-S-K-W-F-D-R-D-H-L-Y-S-D	70
0708-17	74	D-S-N-K-H-H-R-D-H-L-Y-S-D	38
0708-18	75	D-S-K-W-H-H-R-D-H-L-Y-S-D	60
0708-19	76	D-S-N-W-H-H-R-D-H-L-Y-S-D	45
0708-20	77	D-S-K-K-H-D-R-D-H-L-W-S-D	62
0708-21	78	D-S-K-K-H-D-R-D-H-L-F-S-D	53
0708-22	79	D-S-K-K-H-F-R-D-K-L-Y-S-D	43
0708-23	80	D-S-W-W-H-K-R-D-K-L-Y-S-D	18
0708-24	81	D-S-K-K-H-D-R-D-K-L-F-S-D	35
0708-25	82	D-S-K-K-F-H-R-D-F-L-Y-S-D	56
0708-26	83	D-S-K-K-F-K-R-D-F-L-F-S-D	23
0708-27	84	D-S-K-K-F-D-R-D-F-L-F-S-D	51
0708-28	85	D-S-H-K-F-D-R-D-F-L-Y-S-D	53
0708-29	86	D-S-K-K-Y-D-R-D-F-L-W-S-D	61
0708-30	87	D-S-K-K-F-D-R-G-H-L-Y-S-D	63
0708-31	88	D-S-K-W-H-H-R-G-H-L-Y-S-D	52
0708-32	89	D-S-K-K-H-F-R-G-K-L-Y-S-D	24
0708-33	90	D-S-K-K-F-H-R-G-F-L-Y-S-D	60
0708-34	91	D-S-K-K-Y-D-R-G-F-L-W-S-D	64
0608-31	32	D-S-K-K-H-D-R-D-F-L-Y-S-D	45 (=L2)

5 [0066] Los péptidos de la tabla 7 se representan por las siguientes secuencias SEQ ID NO: 72-91 y SEQ ID NO: 32 como control (L2). Estos resultados indican que la segunda ronda de optimización no proporcionó sustratos peptídicos con propiedades de sustrato significativamente mejoradas.

10 [0067] En una forma similar a la de PAD4, identificamos sustratos de péptido mejorados para PAD2. Nuevamente L1 fue usado como un compuesto de plomo. Se usó el conjunto de 152 péptidos de la tabla 3 y se realizó una prueba como se describe anteriormente.

Tabla 8, Conversión de análogos de L1 por PAD2

	-6	-5	4	-3	-2	-1		1	2	3	4	5	6
	D	S	Q	F	A	F	R	G	A	S	A	S	D
A			145	50	100	25		140	100	145	100		
C			170	225	185	50		200	185	225	155		
D			125	30	95	15		140	80	50	115		
E			130	65	115	15		25	70	30	100		
F			190	100	185	100		175	200	260	200		
G			130	130	105	5		100	200	95	160		
H			200	195	210	150		225	200	210	200		
I			175	95	185	45		175	140	225	140		

ES 2 400 013 T3

K			215	210	220	100		190	220	240	215		
L			170	95	210	100		175	165	210	140		
M			190	115	185	100		150	185	175	150		
N			165	95	165	50		225	115	80	150		
P			170	30	115	5		15	70	130	140		
Q			100	80	185	25		125	140	65	150		
R			115	260	185	175		225	225	290	225		
s			150	30	150	25		165	165	100	140		
T			155	50	200	40		175	150	145	125		
V			170	50	185	50		190	115	225	125		
W			210	260	210	115		200	200	195	225		
Y			185	130	210	125		200	185	225	175		

[0068] En base a los resultados anteriores, diseñamos 15 péptidos que contienen varios aminoácidos que mejoran las propiedades del sustrato (ver tabla 9). Los péptidos indicados fueron sintetizados y evaluados para identificar el mejor sustrato de este grupo.

5

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Conversión (%)
0735-27	92	D-S-K-W-Y-H-R-N-K-F-W-S-D	98
0735-28	93	D-S-Q-F-A-H-R-N-A-S-A-S-D	35
0735-29	94	D-S-W-K-A-F-R-G-A-S-A-S-D	70
0735-30	95	D-S-Q-F-A-F-R-G-A-F-W-S-D	65
0735-31	96	D-S-M-C-A-F-R-G-A-K-K-S-D	59
0735-32	97	D-S-Q-F-A-F-R-H-F-S-A-S-D	85
0735-33	98	D-S-Q-W-A-F-R-G-A-F-A-S-D	82
0735-34	99	D-S-K-F-K-F-R-Y-A-Y-A-S-D	91
0735-35	100	D-S-K-F-H-F-R-Y-A-V-A-S-D	92
0735-36	101	D-S-Q-F-A-Y-R-N-A-K-A-S-D	74
0735-37	102	D-S-Q-W-A-F-R-H-A-L-F-S-D	95
0735-38	103	D-S-Q-W-A-F-R-N-A-F-A-S-D	82
0735-39	104	D-S-Q-F-K-F-R-G-A-F-A-S-D	80
0735-40	105	D-S-Q-C-L-F-R-G-A-F-A-S-D	73
0735-41	106	D-S-K-F-A-F-R-G-G-I-A-S-D	90
0308-29	11	D-S-Q-F-A-F-R-G-A-S-A-S-D	45 (=L1)

[0069] Los péptidos de la tabla 9 se representan por las siguientes secuencias SEQ ID NO: 92-106 y SEQ ID NO: 11 como control (L1).

10

[0070] De estos resultados es obvio que este conjunto de péptidos contiene sustratos de PAD2 con propiedades de sustrato mejoradas comparado con L1 (0308-29).

15

[0071] Para obtener sustratos de péptido optimizados para PAD2 y PAD4, 36 de los péptidos mencionados en las tablas 4, 5, 7 y 9 fueron seleccionados y evaluados como sustrato para PAD2 y PAD4. Posteriormente, los cinco péptidos indicados con ** fueron seleccionados para otra investigación.

ES 2 400 013 T3

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Tabla 10	
			Conversión por PAD4 (%)	Conversión por PAD2 (%)
0735-27	92	D-S-K-W-Y-H-R-N-K-F-W-S-D	45	98
0735-34	99	D-S-K-F-K-F-R-Y-A-Y-A-S-D	<20	91
0735-35	100	D-S-K-F-H-F-R-Y-A-V-A-S-D	<20	92
0735-37	102	D-S-Q-W-A-F-R-H-A-L-F-S-D	<20	95
0735-41	106	D-S-K-F-A-F-R-G-G-I-A-S-D	25	90
0608-23	24	D-S-K-H-F-H-R-D-F-I-Y-S-D	69	94
0608-24	25	D-S-K-H-L-S-R-E-W-M-W-S-D	54	95
0608-27	28	D-S-K-H-K-S-R-D-F-V-Y-S-D	69	94
0608-29	30	D-S-K-K-L-H-R-D-H-M-E-S-D	65	90
0608-32	33	D-S-K-K-K-H-R-E-W-V-W-S-D	72	100
0608-35	36	D-S-H-K-W-H-R-D-F-F-Y-S-D	73	92
0608-36	37	D-S-H-K-H-S-R-E-W-L-W-S-D	51	97
0608-43	44	D-S-H-K-F-D-R-D-F-I-Y-S-D	79	90 **
0708-15	72	D-S-K-K-F-D-R-D-H-L-Y-S-D	77	90
0708-18	75	D-S-K-W-H-H-R-D-H-L-Y-S-D	71	90
0708-20	77	D-S-K-K-H-D-R-D-H-L-W-S-D	80	95
0708-22	79	D-S-K-K-H-F-R-D-K-L-Y-S-D	37	92
0708-25	82	D-S-K-K-F-H-R-D-F-L-Y-S-D	64	97
0708-26	83	D-S-K-K-F-K-R-D-F-L-F-S-D	35	97
0708-29	86	D-S-K-K-Y-D-R-D-F-L-W-S-D	76	92
0708-30	87	D-S-K-K-F-D-R-G-H-L-Y-S-D	80	90
0708-31	88	D-S-K-W-H-H-R-G-H-L-Y-S-D	71	96
0708-32	89	D-S-K-K-H-F-R-G-K-L-Y-S-D	22	96
0708-33	90	D-S-K-K-F-H-R-G-F-L-Y-S-D	73	100

ES 2 400 013 T3

0708-34	91	D-S-K-K-Y-D-R-G-F-L-W- S- D	81	93
0612-26	50	F-F-D-S-K-H-L-S-R-E-W- M- W-S-D	73	97
0612-29	53	F-F-D-S-K-H-K-S-R-D-F- V- Y-S-D	77	92
0612-30	54	F-F-D-S-K-H-F-D-R-E-W- I- W-S-D	89	94 **
0612-32	56	F-F-D-S-K-K-W-S-R-E-Y- F- F-S-D	76	94
0612-34	58	F-F-D-S-K-K-K-H-R-E-W- V- W-S-D	76	99
0612-35	59	F-F-D-S-K-K-F-S-R-D-H-I- E-S-D	63	90
0612-37	61	F-F-D-S-H-K-W-H-R-D-F- F- Y-S-D	88	96 **
0612-38	62	F-F-D-S-H-K-H-S-R-E-W- L- W-S-D	72	96
0612-44	68	F-F-D-S-H-K-K-S-R-E-Y- V- F-S-D	58	100
0612-45	69	F-F-D-S-H-K-F-D-R-D-F-I- Y-S-D	94	97 **
0612-46	70	F-F-D-S-H-K-L-H-R-E-W- M- W-S-D	91	92 **
0308-29	11	D-S-Q-F-A-F-R-G-A-S-A- S- D	<20(=L1)	<20(=L1)
0608-31	32	D-S-K-K-H-D-R-D-F-L-Y- S- D	58 (=L2)	84 (=L2)

[0072] En base a la secuencia de los cinco péptidos indicados y el de L2, fueron generados y evaluados inhibidores de PAD. Los inhibidores fueron generados de manera que R en la secuencia de sustrato fue sustituida por ornitina que lleva una trampa electrofílica o grupo (bien una fluoroamidina o una cloroamidina). Además, modificamos el N-término con un grupo acetilo (Ac) y el C-término como una amida para aumentar la estabilidad de los inhibidores. Ver tablas 11 y 12.

5

Tabla 11

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Código de sustrato correspondiente
0741-01FA	107	Ac-F-F-D-S-K-H-F-D-O(FA)-E-M-1-W-S-D- amida	0612-30
0741-01FA	108	Ac-F-F-D-S-H-K-N-H-O(FA)-D-F-F-Y-S-D- amida	0612-37
0741-01FA	109	Ac-F-F-D-S-H-K-F-D-O(FA)-D-F-I-Y-S-D- amida	0612-45
0741-01FA	110	Ac-F-F-D-S-H-K-L-H-O(FA)-E-M-M-W-S-D- amida	0612-46
0741-01FA	111	Ac-D-S-H-K-F-D-O(FA)-D-F-I-Y-S-D- amida	0608-43
0741-01FA	112	Ac-D-S-K-K-H-D-O(FA)-D-F-L-Y-S-D- amida	0608-31 (=L2)

O(FA) = Orn(fluoro-amidina)

Tabla 12

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia	Código de sustrato correspondiente
0741-01CA	113	Ac-F-F-D-S-K-H-F-D-O(CA)-E-M-1-M-S-D- amida	0612-30

10

ES 2 400 013 T3

0741-01CA	114	Ac-F-F-D-S-H-K-N-H-O(CA)-D-F-F-Y-S-D-amida	0612-37
0741-01CA	115	Ac-F-F-D-S-H-K-F-D-O(CA)-D-F-I-Y-S-D-amida	0612-45
0741-01CA	116	Ac-F-F-D-S-H-K-L-H-O(CA)-E-W-M-W-S-D-amida	0612-46
0741-01 CA	117	Ac-D-S-H-K-F-D-O(CA)-D-F-I-Y-S-D-amida	0608-43
0741-01CA	118	Ac-D-S-K-K-H-D-O(CA)-D-F-L-Y-S-D-amida	0608-31 (=L2)
O(CA) = Orn(cloroamidina)			

5 [0073] Los inhibidores anteriores fueron evaluados para su capacidad inhibitoria en PAD2 y PAD4. En resumen, varias concentraciones del inhibidor fueron mezcladas con una concentración constante del sustrato (péptido 0708-30). Posteriormente, se añadió una PAD y tras la incubación la conversión del sustrato fue determinada. Así, cuanto más baja es la conversión, mejor es el inhibidor. Los resultados se representan en la tabla 13 y 14.

Tabla 13, Conversión de 0708-30 por PAD2 en presencia de varios inhibidores

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración de inhibidor		
		100 µM	50 µM	10 µM
0741-01FA	107	14	29	69
0741-02FA	108	7	17	52
0741-03FA	109	6	13	39
0741-04FA	110	14	24	62
0741-05FA	111	15	24	54
0741-06FA	112	25	42	73
0741-01CA	113	23	38	69
0741-02CA	114	18	32	67
0741-03CA	115	23	49	57
0741-04CA	116	50	47	69
0741-05CA	117	31	44	62
0741-06CA	118	48	45	63

Tabla 14, Conversión de 0708-30 por PAD4 en presencia de varios inhibidores

10

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración de inhibidor		
		100 µM	50 µM	10 µM
0741-01FA	107	15	24	63
0741-02FA	108	16	20	50
0741-03FA	109	9	12	45
0741-04FA	110	14	28	64
0741-05FA	111	14	22	55
0741-06FA	112	27	43	74
0741-01CA	113	17	31	63
0741-02CA	114	19	31	63
0741-03CA	115	14	24	62
0741-04CA	116	26	55	68
0741-05CA	117	25	34	74
0741-06CA	118	50	64	74

[0074] Los resultados de las tablas 13 y 14 indican que, en este grupo, los inhibidores que contienen O(FA) son más eficaces en la inhibición de PAD2 y PAD4 en comparación con sus equivalentes que contienen O(CA).

5 [0075] Para investigar si la longitud peptídica es crucial para la actividad inhibitoria de los péptidos, los péptidos también fueron generados y evaluados como el 7-mero correspondiente de la parte media de los inhibidores. Ver tabla 15.

Tabla 15

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
0748-01FA	119	Ac-H-F-D-O(FA)-E-W-I-amida
0748-09FA	120	Ac-K-W-H-O(FA)-D-F-F-amida
0748-17FA	121	Ac-K-L-H-O(FA)-E-W-M-amida
0743-58FA	122	Ac-K-F-D-O(FA)-D-F-I-amida
0748-25FA	123	Ac-K-H-D-O(FA)-D-F-L-amida

O(FA) = Orn(fluoro-amidina)

10 [0076] Estas variantes acortadas fueron evaluadas como inhibidores para PAD2 y PAD 4 como se ha descrito anteriormente. Los resultados se representan en tablas 16 y 17.

Tabla 16, Conversión de 0708-30 por PAD2 en presencia de varios inhibidores

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración del inhibidor			
		100 µM	50 µM	10 µM	0 µM
0748-01FA	119	21	36	67	68
0748-09FA	120	5	6	23	68
0748-17FA	121	24	35	58	68
0743-58FA	122	4	8	33	68
0748-25FA	123	11	20	47	68

15 [0077] Estos resultados indican que los inhibidores 7-meros pueden ser inhibidores igualmente eficaces para PAD2 y PAD4 en comparación con por ejemplo péptidos 13-meros y 15-meros.

Tabla 17, Conversión de 0708-30 por PAD4 en presencia de varios inhibidores

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración del inhibidor			
		100 µM	50 µM	10 µM	0 µM
0748-01F	119	12	25	50	81
0748-09FA	120	13	22	51	81
0748-17FA	121	18	32	64	81
0743-58FA	122	10	19	38	81
0748-25FA	123	12	18	45	81

20 [0077] Estos resultados indican que los inhibidores 7-meros pueden ser inhibidores igualmente eficaces para PAD2 y PAD4 en comparación con por ejemplo péptidos 13-meros y 15-meros.

Ejemplo 3: Mecanismo de unión de los inhibidores a PAD

25 [0078] En las siguientes mezclas de experimentos fueron analizadas varias cantidades de péptido inhibidor biotinilado (biotin-Ahx-D-S-K- K-H-D-O(FA)-D-F-L-Y-S-d-amida, O(FA) = ornitina fluoroamidina, Ahx = ácido 6-aminohexanoico) y una cantidad fija de PAD4 marcada con His. En resumen, 10 µl de solución de PAD4 fueron mezclados con 10 µl solución de inhibidor e incubados durante 3 h a 37 °C. Después de la adición de tampón de carga que contiene SDS, las muestras fueron o bien hervidas durante 5 minutos o mantenidas a temperatura ambiente. Las muestras fueron cargadas en un gel de 10% poliacrilamida y sometidas a electroforesis (aproximadamente 1 h). Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF y desarrolladas o bien con conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Figura 2) o con anticuerpo de ratón-anti-His seguido por conjugado de fosfatasa alcalina de cabra-antirratón (Figura 3), seguido de visualización usando NBT/BCIP. En la tabla 18 son especificadas las muestras.

Tabla 18

Línea	Cantidad de PAD4	Inhibidor de cantidad	Tratamiento
1,11	20 pmol PAD4	20,000 pmol	hervido
2,12	20 pmol PAD4	2,000 pmol	hervido
3,13	20 pmol PAD4	200 pmol	hervido

4,14	20 pmol PAD4	ningún inhibidor	hervido
5,15	20 pmol PAD4	20,000 pmol	no hervido
6,16	20 pmol PAD4	2,000 pmol	no hervido
7,17	20 pmol PAD4	200 pmol	no hervido
8,18	20 pmol PAD4	ningún inhibidor	no hervido
9,19		20,000 pmol	no hervido
M	mezcla de marcador		

[0079] En la figura 2 es visualizado el grupo de biotina del inhibidor. Sólo las líneas donde está presente el inhibidor biotinilado muestran una banda coloreada. La posición de las bandas está alrededor del peso molecular esperado de PAD4 (77 kDa). Esto indica la unión del péptido biotinilado a PAD4. Esta unión no se rompe por la ebullición de la muestra en presencia de SDS.

En la figura 3 está visualizada la etiqueta His de PAD4. Solo las líneas donde está presente PAD4 muestran una banda coloreada. La posición de las bandas está alrededor del peso molecular de PAD4 (77 kDa) y está en la misma posición que en la Figura 2, indicando que las bandas representan el mismo peso molecular en ambos análisis. En conclusión, el péptido inhibitorio biotinilado fue mostrado como unido a PAD4, y esta unión es resistente a la ebullición de la muestra en presencia de SDS, indicando unión covalente del inhibidor a PAD4.

Ejemplo 4: Ensayo de HPLC para determinar la actividad de inhibición PAD

[0080] Con este ensayo fue determinada la actividad de inhibición de PAD. Fue usado el sustrato fluorescente Dns-Gly-Arg, que se convierte en Dns-Gly-Cit por PAD2 o PAD4 (Dns = dansilo).

PAD2 o PAD4 fueron incubadas con una mezcla a una concentración fija de sustrato y varias concentraciones de inhibidor. La conversión anterior fue cuantificada usando HPLC e indica el efecto del inhibidor. En resumen, la mezcla reactiva (25 µl) que contiene PAD, el sustrato y el inhibidor fueron incubados a 37 °C. Después se añadieron 125 µl de ácido acético/agua 15/85 (v/v) para templar la conversión. De esta mezcla 75 µl fueron aplicados a una HPLC equipada con un detector de fluorescencia. Las condiciones cromatográficas fueron de la siguiente manera:

Columna: columna C₁₈ Vydac 218TP5415. Tampón A: 75 mM de acetato de sodio y 3.3 mM de octanosulfonato de sodio en agua/acetonitrílico 3/1 (v/v), pH 4.0. Tampón B: acetonitrilo. Gradiente: t = 0 min, 100% A; t = 13 min, 100 % A; t = 15 min, 0 % A; t = 17 min, 0 % A; t = 17.5 min, 100 % A, t = 23 min, 100 % A. Detección: fluorescencia Ex 333 nm, Em 533 nm. Flujo 0.8 ml/min.

Ejemplo 5: Ensayo ABAP para determinar la inhibición de actividad PAD

[0081] Para determinar la inhibición de la actividad de PAD2 y PAD4 fue usado el ensayo de actividad de la enzima PAD basado en el anticuerpo a partir de ModiQuest Research (cat no: MQ17,101) según las especificaciones de los fabricantes. Las enzimas PAD (cantidades que dan citrulinación máxima) fueron mezcladas con inhibidores de PAD en las siguientes concentraciones (4.9, 9.8, 19.5, 39, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500 y 5000 µM) y preincubadas durante 30 minutos a 37 °C. Después de la preincubación, las mezclas de enzimas PAD y los inhibidores fueron añadidos a los pocillos para una incubación adicional de 75 minutos. Después del lavado íntegro de placas de 96 pocillos con PBS, se midió la conversión de las argininas en citrulinas del recubrimiento con el uso de un anticuerpo anticitrulina de propiedad, seguido de un anticuerpo secundario marcado con HRP que reconoce el anticuerpo anti-citrulina. La incubación con ambos anticuerpos fue realizada durante 1h a 37°C. La inhibición de PAD podría entonces ser calculada como IC₅₀, la concentración del inhibidor que reduce la actividad de PAD un 50%.

Las tablas 19 y 20 que siguen resumen los resultados de la inhibición de PAD2 y PAD4 obtenida con los primeros 8 inhibidores pentapéptidos e inhibidores peptídicos de la segunda ronda de selección (ejemplo 1).

Tabla 19: primeros 8 inhibidores de pentapéptidos evaluados como inhibidores de PAD2 y PAD4

SEQ ID No:	Secuencia de aminoácidos de los inhibidores	Valores IC ₅₀ (µM)	
		PAD2	PAD4
12	T D O(FA) G S	19	58
13	G D O(FA) S G	17	178
14	S S O(FA) D G	14	177
15	G S O(FA) D G	18	443
16	T D O(CA) G S	34	153
17	G D O(CA) S G	76	189
18	S S O(CA) D G	55	203
19	G S O(CA) D G	172	816

Tabla 20: Secuencias de aminoácidos de los mejores inhibidores en la segunda ronda de selección

SEQ ID No:	Secuencia de aminoácidos de los inhibidores	Valores IC ₅₀ (µM)	
		PAD2	PAD4
12	T D O(FA) G S	49	129
20	G D O(FA) G S	38	60
21	Y D O(CA) G S	58	44
124	K F D O(FA) D F I	17	122
125	K W H O(FA) D F F	16	161

Ejemplo 6: Ensayo colorimétrico para determinar la inhibición de la actividad de PAD

5

[0082] Uno de los ensayos que fueron usados para indagar la inhibición de una PAD por los inhibidores, es el ensayo colorimétrico que ha sido descrito previamente {Sugawara et al. 1998}. En este ensayo ester etílico de benzoilarginina (BAEE) se incubaba con una enzima PAD purificada recombinante como indicado en un tampón que contiene 50 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM CaCl₂, 2 mM ditiotritol durante 3 horas a 37 °C. Para controlar la conversión de BAEE en el ester etílico de benzoilcitrulina, el producto de reacción se incubaba con 1.5 mg/ml de DAMO (diacetil monoxima) y 1.0 mg/ml de antipirina en presencia de 15% de ácido sulfúrico, 12% de ácido fosfórico y 0.16 mg/ml de FeCl₃ durante 10 minutos a 100 °C. Tras el enfriamiento hasta la temperatura ambiente, la absorbancia se mide a 450 nm.

10

Tabla 21 Inhibidores seleccionados evaluados en esta prueba

15

Código peptídico	SEQ ID nº:	Secuencia
CXP5.3-014	-	Bz-O(CA)-amida
CXP5.3-015	-	Bz-O(FA)-amida
CXP5-101	126	McO ₂ C-T-d-O(FA)-G-S-metilester
CXP5.2-078	127	Ac-G-D-O(CA)-G-S
CXP5.2-081	128	Ac-Y-D-O(CA)-G-S
CXP5.2-097	129	Ac-F-D-O(FA)-D-F
0743-58FA	122	Ac-K-F-d-O(FA)-d-F-I-amida
0741-03FA	109	Ac-F-F-D-S-H-K-F-D-O(FA)-D-F-I-Y-S-D-amida

Bz = benzoilo, ca = acetilo, O(CA) = Orn(cloroamidina), O(FA) = Orn(fluoroamidina)

[0083] Para evaluar la eficacia de los inhibidores (véase tabla 21) en este ensayo, fue preincubada una enzima PAD recombinante como indicado con varias concentraciones de compuestos inhibitorios durante 15 minutos a 37°C.

20

La capacidad de varios compuestos para inhibir PAD2 (0.12 µM) y PAD4 (0.2 µM) humanas en este ensayo colorimétrico se ilustra en la Figura 4.

Ejemplo 7 Ensayo para determinar la actividad de PAD usando la espectrometría de masas

25

[0084] La conversión de arginina en citrulina en los péptidos de sustrato por PAD2 o PAD4 usando la espectrometría de masas fue realizada de la siguiente manera. Un péptido de sustrato candidato fue incubado con una PAD como indicado durante varias horas a 37 °C. La reacción fue apagada por la adición de ácido acético. Una muestra fue analizada en un espectrómetro de masas Qtof (Micromass; Reino Unido) y el espectro de masa fue comparada con aquel del mismo péptido no tratado con PAD. Normalmente, son detectados iones 2⁺ y 3⁺. La conversión (ΔAM = 0.98 Da) fue calculada en los iones 2⁺ y 3⁺ individualmente, y posteriormente calculada según el promedio teniendo en cuenta el pico relativamente elevado de las señales 2⁺ y 3⁺ (véase Figura 5).

30

Ejemplo 8: Ensayos para determinar la especificidad de los inhibidores para PAD 2/4

35

[0085] Para controlar la especificidad de los inhibidores para enzimas PAD, los compuestos fueron también evaluados en cuanto a una serie de enzimas que tal como las enzimas PAD contienen una cisteína en el centro activo (o incluso una triada Cys-His-Asp).

40

Las enzimas seleccionadas incluían la proteasa de cisteína de la papaína de la familia peptidasa C1 (EC 3.4.22.2), la cisteína endopeptidasa caspasa-3 de mamífero (EC 3.4.22.56), la transglutaminasa o proteína-glutamina-γ-glutamilttransferasa dependiente de calcio de mamífero (TG) (EC 2.3.2.13), ATP de mamífero: creatina N-fosfotransferasa o creatina quinasa (CK) (EC 2.7.3.2) y finalmente a partir de las enzimas modificantes del grupo guanidino (GME) humano N(G), N(G)-dimetil-L-arginina dimetilaminohidrolasa isotipo I (hDDAH-1) (EC 3.5.3.18).

45

La superfamilia de GME consiste en enzimas que catalizan la modificación de grupos de guanidina (metilados). Los elementos de esta superfamilia se caracterizan por la conservación de residuos catalíticos clave y aunque los productos y sustratos particulares de estas enzimas difieren, se propone que sus mecanismos catalíticos procedan a través de productos intermedios covalentes similares S-alquilo-tionio formados por el ataque nucleofílico del residuo Cys del sitio activo {Shirai et al., 2006}. Las enzimas PAD y hDDAH-1 pertenecen a esta superfamilia. El DDAH-1 humano cataliza la hidrólisis de N(G)-metil-L-arginina (MMA) y asimétrica N(G), N(G)-dimetil-L-arginina (ADMA) a L-citrulina y

bien metilamina o dimetilamina respectivamente.

El procedimiento más frecuentemente usado para determinar la actividad de hDDAH-1 se basa en la derivatización de diacetil monoxima (DAMO) del grupo ureido en la L-citrulina para formar un producto coloreado. Este ensayo ha sido optimizado para controlar la actividad DDAH en un formato de 96 pocillos {Knipp et al., 2000}.

[0086] hDDAH-1 purificado recombinante marcado con His₆ fue incubado con su sustrato ADMA en el tampón de ensayo (100 mM de Na₂HPO₄, pH 8,0) a 37 °C durante 1 h. La reacción fue apagada por la adición de 0,3 M de ácido trifluoroacético. La L-citrulina formada fue modificada con 1.5 mg/ml DAMO (diacetil monoxima) y 1.0 mg/ml de antipirina en presencia de 15% de ácido sulfúrico, 12% de ácido fosfórico y 0.16 mg/ml de FeCl₃ durante 10 minutos a 100 °C. Tras el enfriamiento hasta temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 450 nm.

Después de incubación de caspasa-3 recombinante purificada con su sustrato disponible comercialmente: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p- nitroanilida (Ac-DEVDpNA) en tampon CFS (220 mM de manitol, 68 mM de sacarosa, 2mM de NaCl, 2.5 mM de KH₂PO₄, 10 mM de HEPES, pH 7.4 más un cóctel de inhibidores de proteasa), el sustrato es dividido, pNA es liberada y su absorbancia puede ser controlada a 405 nm.

La actividad de papaína fue evaluada usando un ajuste similar experimental, basado en su escisión de pGlu-Phe-Leu-pNA en el tampón de reacción (25 mM Tris-HCL, pH 7.6, 150 mM NaCl).

Las actividades de CK y TG (ambas adquiridas de Sigma-Aldrich (Schnelldorf; Alemania) fueron ensayadas con la ayuda de los kits comerciales liquiUV test activados con CK NAC de Human GmbH (Wiesbaden, Alemania) y el ensayo enzimático de transglutaminasa de Sigma-Aldrich (Schnelldorf; Alemania) según las instrucciones de los fabricantes.

[0087] Típicamente las propiedades inhibitorias de los compuestos fueron evaluadas por tratamiento de las enzimas con varias concentraciones de inhibidores (50 µM a 2,5 mM) durante 10 min a temperatura ambiente antes del ensayo de la actividad. Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 22.

Tabla 22 Inhibición de la actividad catalítica de varias enzimas por inhibidores de PAD

Inhibidor	Valores IC ₅₀ (µM)				
	CXP5-101	CXP5.2-078	CXP5.2-081	0748-09FA	0743-58FA
hPAD2*	35	> 500	200	nt**	35
hPAD4*	10	18	10	nt**	6
hDDAH-1	> 2000	1200	1330	nt**	> 2000
Caspasa-3	> 1000	1000	> 1000	> 1000	920
Creatina-quinasa	780	780	1000	1000	800
Transglutaminasa	600	730	> 1000	> 1000	1000
Papaína	> 2000	1050	> 2000	> 2000	> 2000

* Los valores fueron determinados con el ensayo colorimétrico descrito en el Ejemplo 6.
 ** La inhibición de hPAD2, hPAD4 y hDDAH-1 por 0748-09FA no pudo ser evaluada en el ensayo colorimétrico, porque este inhibidor no es compatible con los reactivos usados en este ensayo.

[0088] De la tabla 22 está claro que los inhibidores evaluados muestran alta especificidad alta para PAD2 y PAD4, en comparación con elementos de un grupo de enzimas que fueron seleccionadas en base a la similitud con enzimas PAD respecto a sus sitios activos.

Ejemplo 9: Inhibidores mejorados con un N-término modificado y/o D-aminoácidos seleccionados en el C-término

[0089] Los inhibidores descritos anteriormente en el ejemplo 2 contienen un grupo acetilo en el N-término y una amida C-terminal. Aunque estas modificaciones protegerán al inhibidor contra la proteólisis por algunas exopeptidasas, es conocido que exopeptidasas particulares son capaces de hidrolizar péptidos acetilados o amidados. Además, hemos supuesto que la adición del pequeño grupo espaciador hidrofílico ácido 2-(2-aminoetoxi)-etoxi-acético (AEEAc) al C-término de un inhibidor proporcionará protección contra la degradación por carboxipeptidasas.

En base a la secuencia de inhibidores 0743-58FA y 0748-09FA anteriormente descrita, así hemos sintetizado y evaluado inhibidores que contienen cualquiera de estas modificaciones o ambas. Véase la tabla 23.

Tabla 23, Secuencias de péptidos de inhibidores modificados N- y/o C-terminalmente

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
0743-58FA	122	Ac-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-amida
0837-13FA	130	Ac-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-X-amida
0837-27FA	131	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-X-amida
0837-29FA	132	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-amida
0798-09FA	120	Ac-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F-amida

ES 2 400 013 T3

0837-14FA	133	Ac-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F-X-amida
0837-28FA	134	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F-X-amida
0837-30FA	135	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F-amida
Ac = acetilo, Naf = 2-naftilsulfonilo, X = AEEAc		

[0090] Los inhibidores modificados fueron evaluados en su capacidad para inhibir PAD 2 (tabla 24) o PAD4 (tabla 25).

Tabla 24, Inhibición de PAD2

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración de inhibidor				
		80 µM	40 µM	20 µM	10 µM	0 µM
0743-58FA	122	9	15	26	39	74
0837-13FA	130	11	20	30	43	74
0837-27FA	131	4	7	14	24	74
0837-29FA	132	2	5	9	16	74
0748-09FA	120	4	8	14	25	76
0837-14FA	133	8	14	24	38	76
0837-28FA	134	2	4	8	17	76
0837-30FA	135	1	2	3	9	76

5

Tabla 25, Inhibición de PAD4

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración de inhibidor				
		80 µM	40 µM	20 µM	10 µM	0 µM
0743-58FA	122	13	18	36	46	71
0837-13FA	130	16	23	33	48	71
0837-27FA	131	7	12	20	35	71
0837-29FA	132	5	10	16	33	71
0748-09FA	120	18	27	38	51	67
0837-14FA	133	21	29	39	54	67
0837-28FA	134	9	17	23	37	67
0837-30FA	135	7	13	24	37	67

10

[0091] Sorprendentemente, se tomó nota de que algunos de los inhibidores, que fueron diseñados para poseer estabilidad mejorada contra la degradación enzimática, mostraron eficacia mejorada como un inhibidor de PAD2 y PAD4. Como se puede observar en la tabla 24 y tabla 25, la adición de un grupo 2-naftilsulfonilo al N-término aumenta la fuerza del inhibidor significativamente, mientras que la adición de un grupo AEEAc al C-término disminuye parcialmente este efecto.

15

[0092] Puesto que la adición de un grupo AEEAc al C-término de los inhibidores reduce la eficacia, evaluamos algunas otras modificaciones C-terminales que estaban basadas en la introducción de D-aminoácidos, también conocidos por prevenir la actividad de exopeptidasa. La tabla 26 contiene los péptidos que fueron usados para inhibición de PAD2, la tabla 27 contiene los resultados de estos experimentos. La tabla 28 contiene los péptidos que fueron usados para la inhibición de PAD4, la tabla 29 contiene los resultados de estos experimentos.

20

Tabla 26, Secuencias peptídicas usadas para evaluar el efecto de la introducción de D-aminoácidos en el C-término de los inhibidores para inhibir PAD2 (minúscula = D-aminoácido)

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
0743-58FA	122	Ac-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-amida
0838-91FA	136	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I- amida
0838-88FA	137	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-y- amida
0838-89FA	138	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-k- amida
0748-09FA	120	Ac-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F- amida
0838-90FA	139	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-f-amida
0838-86FA	140	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-f-y- amida
0838-87FA	141	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-f-k- amida
Ac = acetilo, Naf = 2-naftilsulfonilo		

Tabla 27, Inhibición de PAD2

Código de péptido	SEQ ID NO:	Concentración de inhibidor				
		80 µM	40 µM	20 µM	10 µM	0 µM
0743-58FA	122	9	15	24	37	72
0838-91FA	136	4	8	14	26	72
0838-88FA	137	6	11	21	38	72
0838-89FA	138	4	8	13	25	72
0748-09FA	120	4	8	12	22	73
0838-90FA	139	1	2	3	6	73
0838-86FA	140	2	3	7	11	73
0838-87FA	141	2	3	5	8	73

5 Tabla 28, Secuencias peptídicas usadas para evaluar el efecto de la introducción de D-aminoácidos en el C-término de los inhibidores para inhibir PAD4 (minúscula = D-aminoácido)

Código de péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
0837-29FA	132	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-I-amida
0838-91FA	136	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-i- amida
0838-88FA	137	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-i-y- amida
0838-89FA	138	Naf-K-F-D-Orn(FA)-D-F-i-k- amida
0837-30FA	135	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-F- amida
0838-90FA	139	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-f- amida
0838-86FA	140	Naf-K-M-H-Orn(FA)-D-F-f-y- amida
0838-87FA	141	Naf-K-W-H-Orn(FA)-D-F-f-k- amida

Naf = 2-naftilsulfonilo

Tabla 29, Inhibición de PAD4

Código de péptido	Código de péptido	Concentración de inhibidor				
		80 µM	40 µM	20 µM	10 µM	0 µM
0837-29FA	132	5	9	15	29	69
0838-91FA	136	5	8	14	25	69
0838-88FA	137	4	8	14	24	71
0838-89FA	138	8	13	19	31	71
0837-30FA	135	6	12	20	37	74
0838-90FA	139	6	11	18	31	74
0838-86FA	140	4	10	18	33	67
0838-87FA	141	10	14	23	40	67

10 [0093] De los resultados anteriores es obvio que la introducción de D-aminoácidos en el C-término de los inhibidores para proteger los inhibidores contra la degradación por carboxipeptidasas puede proporcionar inhibidores en los que la eficacia inhibitoria no está reducida en comparación con los inhibidores no modificados C-terminalmente.

15 [0094] Lo anterior proporciona inhibidores preferidos para PAD2 y PAD4 que contienen un grupo 2-naftilsulfonilo en el N-término y D-aminoácidos en el C-término.

Ejemplo 10: demostración de un efecto inhibitorio de dos inhibidores de PAD en un modelo de animal in vivo

20 [0095] Uno de los inhibidores humanos PAD 2 y PAD 3 humanas basados en péptidos fue evaluado en colágeno de anticuerpos inducidos por la artritis (CAIA) modelo de ratón (ModiQuest research B.V., número de producto 18,101). Procedimientos experimentales fueron realizados según las especificaciones de fabricantes para inducir artritis en ratones (<http://www.modiquestresearch.nl/shop/files/18.101-50MG%202007.08.22.pdf>). En resumen, el día 0 ratones DBA/J1 macho (5 ratones/grupo) de la edad de 8 semanas fueron inyectados i.p. con una mezcla de 8 anticuerpos de anti-colágeno (2,8mg/ratón). El día 3 los ratones recibieron i.p. otra inyección que contiene 25ug de LPS (para estimular y sincronizar la respuesta inflamatoria).

25 A partir del día 3 en adelante los ratones de un grupo recibieron diariamente inyecciones i.v. con inhibidor basado en péptido CXP5.7-011) (SEQ ID NO:143 hasta el día 11 con la excepción del día 9. Los ratones del grupo de placebo recibieron el placebo (20 mM de fosfato en PBS) según el mismo esquema.

A los animales se les dio una puntuación diariamente en cuanto al grado de inflamación en sus patas. La puntuación ha sido realizada por pata según la tabla 30. La puntuación de artritis para un animal es la suma de las cuatro puntuaciones para patas individuales, de modo que la puntuación de artritis máxima por animal puede ser 8.

Tabla 30

5

Hinchazón observada	Puntuación por pata
1-2 Dedos hinchados	0.25
3-4 Dedos hinchados	0.50
Almohadilla plantaria o tobillo ligeramente hinchado	0.50-0.75
Almohadilla plantaria o tobillo +/- dedos hinchados	1.00
Dedos hinchados + almohadilla plantaria ligeramente hinchada	1.25
Dedos hinchados + almohadilla plantaria hinchada	1.5
Almohadilla plantaria hinchada + tobillo hinchado	2.00

10 [0096] Aunque la administración de los inhibidores en esta dosificación y por medio de esta forma de administración no era capaz de proteger completamente a los animales de que se hincharan sus patas, este experimento demuestra claramente el potencial inhibitorio del inhibidor en este modelo (véase Figura 6).

Ejemplo 11: Procedimientos sintéticos para la generación de los péptidos

15 [0097] Todos los péptidos fueron preparados usando los siguientes procedimientos generales:

Procedimiento general I: Fijación de N-Fmoc-aminoácidos a resina Rink AM (si fuera necesario)

20 [0098] Después del hinchamiento con DMF seco (2 ml) durante 1 h, la resina Rink AM (150 mg, teóricamente 0,68 mmol/g, 0,10 mmol) fue lavada con DMF (2 x 2 ml) y tratada con 50% de piperidina en DMF (2 x 2 ml) durante 15 min. La resina fue lavada con DMF (4 x 2 ml) y tratada con una solución de aminoácido protegido con Fmoc (4 equiv, 0,4 mmol), PyBOP (4 equiv, 0,4 mmol) y NMM (4 equiv, 0,4 mmol) en DMF seco (2 ml) a temperatura ambiente durante 3 h. La resina fue lavada con DMF (5 x 2 ml). Finalmente, la resina fue secada al vacío para dar aminoácidos N-Fmoc unidos con resina.

25

Procedimiento general IIa: desprotección con Fmoc

[0099] La resina protegida con Fmoc fue suspendida en una solución con 20% de piperidina en DMF (3 x 2 ml) y agitada durante 3,10 y 10 min. La resina fue lavada con DMF (6 x 2 ml).

30

Procedimiento general IIb (sintetizador): Desprotección con Fmoc

35 [0100] Una resina Tentagel S Ac precargada que porta el aminoácido apropiado protegido con Fmoc (10 μ mol) o resina Tentagel S AM fue lavada con NMP (3 x 0,8 ml) y tratada con 20% de piperidina en NMP (3 x 3 min, 0,8 ml). La resina fue lavada con NMP (6 x 0,8 ml).

Procedimiento general IIIa: Acoplamiento con PyBOP/NMM

40 [0101] Fmoc-aminoácido (4 equiv), PyBOP (4 equiv), y NMM (4 equiv) fueron disueltos en DMF (2 ml) y añadidos a la resina. La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 90 min y lavada con DMF (5 x 2 ml).

Procedimiento general IIIb (sintetizador): Acoplamiento con PyBOP/NMM

45 [0102] A la resina se añadió Fmoc-aminoácido (6 equiv, 0,6 M en NMP), PyBOP (6 equiv, 0,67 M en NMP) y NMM (12 equiv, 33 % solución en NMP). La reacción de acoplamiento fue realizada durante 90 min con agitación ocasional y al final del acoplamiento la resina fue lavada con NMP (6 x 0,8 ml).

Procedimiento general IVa: Introducción del grupo final de acetilo

50

[0103] Anhídrido acético (5 equiv) y DIPEA (10 equiv) fueron disueltos en DMF para dar una solución 0,5 M que se añadió a la resina. La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 2 h y lavada con DMF (3 x 2 ml) y DCM (2 x 2 ml).

Procedimiento general IVb (sintetizador): Introducción del grupo final de acetilo

55

[0104] Un acoplamiento normal fue realizado usando ácido acético en vez de un Fmoc-aminoácido.

Procedimiento general Va: Desprotección con Mmt

5 [0105] La resina fue tratada con una mezcla de DCM, trifluoroetanol, y ácido acético (7:2:1,2 ml) durante 15 min. Este procedimiento fue repetido 7 veces. Posteriormente, la resina fue lavada con DCM (2 x 2 ml), DMF (2 x 2 ml), 10% NMM en DMF (2 x 2 ml) y DMF (2 x 2 ml).

Procedimiento general Vb (sintetizador): Desprotección con Mmt

10 [0106] La resina fue tratada 4 x 25 min con 1,5 ml de una mezcla de DCM trifluoroetanol, y ácido acético (7:2:1). A continuación, la resina fue lavada con DCM (2 x 1.5 ml), NMP (2 x 1.5 ml) y 10% NMM en NMP (2 x 1.5 ml, 3 min).

Procedimiento general VIa: Introducción de la fracción de halo-amidina

15 [0107] Hidrocloruro de 2-cloroacetimidato de etilo (5 equiv), y DIPEA (10 equiv) fueron disueltos en DMF (2 ml) y añadidos a la resina. La mezcla reactiva fue agitada a temperatura ambiente durante 4 h y lavada con DMF (4 x 2 ml).

Procedimiento general VIb (sintetizador): Introducción de la fracción de halo-amidina

20 [0108] Hidrocloruro de 2-cloroacetimidato de etilo (10 equiv) y DIPEA (20 equiv) fueron disueltos en NMP (0,2 ml) y añadidos a la resina. La reacción fue realizada durante 1 h con agitación ocasional. La resina fue lavada con NMP, DCM y éter.

Procedimiento general VIIa: Escisión con ácido trifluoroacético.

25 [0109] La resina fue tratada con una mezcla de TFA, agua, y triisopropilsilano (95:2,5:2,5,2 ml) durante 2 h a temperatura ambiente. La resina fue lavada con TFA (2 2 ml), los filtrados combinados fueron concentrados bajo una corriente de N₂ y coevaporados con tolueno (3 2 ml). El producto bruto fue precipitado de una mezcla de MeOH y Et₂O para producir el producto como un sólido blanco mate.

Péptido de Procedimiento general VIIb (obtenido del sintetizador): escisión con ácido trifluoroacético.

30 [0110] La resina fue tratada durante 2,5 h con 1 ml de TFA que contiene 5 % de agua. En el caso de que W estuviera presente en el péptido, 5 % de trietilsilano también fue añadido a la mezcla de escisión. El péptido fue precipitado con 9 ml de éter/pentano 1/1 y aislado por centrifugado. El precipitado fue aislado, disuelto en agua o agua/ácido acético y liofilizado en un sólido blanco.

Síntesis de Fmoc-Orn(Mmt)-OH-DIPEA

40 [0111] A una suspensión de Fmoc-Orn-OH-HCl (5 g, 12.79 mmol) en DCM (300 ml) se añadió clorotrimetilsilano (5,07 ml, 39,7 mmol). La mezcla fue calentada a reflujo y agitada durante 1 h. Después del enfriamiento de la reacción a 0 °C, DIPEA (12.26 ml, 70,4 mmol) fue añadida lentamente y la mezcla fue dejada calentar a temperatura ambiente durante un periodo de 1 h. Mmt-Cl (4.35 g, 14.07 mmol) fue añadido y la solución de color naranja fue agitada durante 4.5 h. Después, MeOH (85 ml) fue añadido y la reacción fue calentada a 40 °C durante 20 min. La solución de color amarillo chillón fue lavada con solución salina/H₂O (2:1,2 200 ml). La fase acuosa fue extraída con DCM (150 ml) y las fases orgánicas combinadas fueron secadas sobre Na₂SO₄ y concentradas al vacío. Purificación por cromatografía flash en columna con gel de sílice (usando EtOAc: tolueno: MeOH:DIPEA = 10:10:3:0.2 seguido de EtOAc:tolueno:MeOH:DIPEA = 10:10:4:0.2 como eluyente) seguido de coevaporación con DCM (3 x 100 ml) liberó el producto como un sólido blanco (8.66 g, 90%).

Síntesis de hidrocloreuro de 2-cloroacetimidato de etilo

[0112] Este compuesto fue sintetizado según los procedimientos descritos por Stillings et al. {Stillings, 1986}.

Síntesis de hidrocloreuro de 2-fluoroacetimidato de etilo

[0113] Este compuesto fue sintetizado según los procedimientos descritos por Hughes et al. {Hughes, 1990}

Referencias

60 [0114]
1. Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M (2004): Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. Nat Struct Mol Biol 11: 777-783 .

65 2. Beniach DR, Wood DD, Palaniyar N, Ottensmeyer FP, Moscarello MA, Harauz G (2000): Cryoelectron microscopy of protein-lipid complexes of human myelin basic protein charge isomers differing in degree of citrullination. J Struct Biol

- 129: 80-95 .
3. Boggs JM, Rangaraj G, Koshy KM, Ackerley C, Wood DD, Moscarello MA (1999): Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles. *J Neurosci Res* 57: 529-535 .
- 5 4. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith MD, Webster AD (2003): Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2146-2154 .
- 10 5. Cao L, Goodin R, Wood D, Moscarello MA, Whitaker IN (1999): Rapid release and unusual stability of immunodominant peptide 45-89 from citrullinated myelin basic protein. *Biochemistry* 38: 6157-6163 .
6. Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, de Keyser F, Serre G (2004): The presence of deiminated fibrin in the synovial membrane is not specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6[Suppl 1], S8 .
- 15 7. Chavanas S, Mechin MC, Takahara H, Kawada A, Nachat R, Serre G, Simon M (2004): Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* 330:19-27 .
- 20 8. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E (2003): Cutting Edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J. Immunol* 171: 538-541 .
9. Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H (2000): Decreased deiminated keratin KI in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 114: 701-705
- 25 10. Masson-Bessière C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, Durroux R, Cantagrel A, Serre G (2000) : In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol* 119: 544-552 .
- 30 11. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G (2001): The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166: 4177-4184 .
- 35 12. Moscarello MA, Pritzker L, Mastronardi FG, Wood DD (2002): Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. *J Neurochem* 81: 335-343 .
13. Moscarello MA, Mak B, Nguyen TA, Wood DD, Mastronardi FG, Ludwin SK (2002): Paclitaxel (Taxol) attenuates clinical disease in a spontaneously demyelinating transgenic mouse and induces remyelination. *Mult Scler* 8: 130138 .
- 40 14. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M (2002): Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem*, 277: 49562-49568 .
- 45 15. Nijenhuis S, Zendman AJ, Vossenaar ER, Puijn GJM, van Venrooij WJ (2004): Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clin Chim Acta* 350: 17-34 .
16. O'Connor PW, Lee L, Moscarello MA, Hunter W, Narayana PA & Wolinsky JS (1999): A phase I study of micellar paclitaxel in the treatment of secondary progressive multiple sclerosis [abstract]. *Ann Neurol* 46: 470.
- 50 17. Pritzker LB, Moscarello MA (1998): A novel microtubule independent effect of paclitaxel: the inhibition of peptidylarginine deiminase from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 1388: 154-160 .
18. Pritzker LB, Joshi S, Gowan JJ, Harauz G & Moscarello MA (2000): Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D. *Biochemistry* 39: 5374-5381 .
- 55 19. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau, CS (2003): Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48: 2888-2897.
- 60 20. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Schellekens GA, de Jong BA, van Venrooij WJ, Breedveld FC, Verweij CL (2001): Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 41-47 .
- 65 21. Shirai H, Blundell TL, Mizuguchi K (2001): A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. *Trends Biochem Sci* 26: 465-468.

22. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA (2003a): Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2489-2500.
- 5 23. Vossenaar ER, van Venrooij WJ (2004): Citrullinated proteins: the sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 107-111 .
24. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn,GJM (2003b): PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25: 1106-1118 .
- 10 25. Wood DD, Moscarello MA (1989): The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein. *J Biol Chem* 264: 5121-5127 .
- 15 26. Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA (1996): Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 40: 18-24
27. Petkova SB, Konstantinov KN, Sproule TJ, Lyons BL, Awwami MA, Roopenian DC (2006): Human antibodies induce arthritis in mice deficient in the low-affinity inhibitory IgG receptor Fc gamma RIIB. *J Exp Med* 203: 275-80 .
- 20 28. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM (2006): Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 116: 961-73 .
29. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, Lee DM, Hueber W, Robinson WH, Cairns E (2008): Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 205: 967-79 .
- 25 30. Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, Nishioka K, Saito T, Kato T (2006): Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 8: R175 .
- 30 31. Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, Asaga H (1992): Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane, *Anal Biochem* 203: 94-100 .
32. Raats JM, Wijnen EM, Pruijn GJ, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ (2003): Recombinant human monoclonal autoantibodies specific for citrulline-containing peptides from phage display libraries derived from patients with rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* 30: 1696-1711 .
- 35 33. Zendman AJW, Raijmakers R , Nijenhuis S ,Vossenaar ER, van der Tillaart M, Chirivi GS, Raats JMH, van Venrooij WJ, Drijfhout JW, Pruijn GJM (2007): ABAP: Antibody-based assay for peptidylarginine deiminases activity, *Anal Biochem* 369: 232-240 .
- 40 34. (Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee Y-H, Stallcup MR, Sato M, Thompson PR (2006): Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization, *Biochemistry* 45: 11727-11736 .
- 45 35. Sugawara K, Yoshizawa Y, Tzeng S, Epstein WL, Fukuyama K (1998): Colorimetric determination of citrulline residues in proteins, *Anal Biochem* 265: 92-96 .
36. Shirai H, Mokrab Y, Mizuguchi K (2006): The guanidino-group modifyng enzymes: structural basis for their diversity and commonality, *Proteins* 64: 1010-1032 .
- 50 37. Knipp M, Vaák M (2000): A 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline, *Anal Biochem* 286: 257-264 .
38. Stillings MR, Welbourn AP, Walter DS (1986): Substituted 1,3,4-thiadiazoles with anticonvulsant activity. 2. Aminoalkyl derivatives, *J Med Chem* 29: 2280-2284 .
- 55 39. Hughes LR, Jackman AL, Oldfield J, Smith RC, Burrows KD, Marsham PR, Bishop JAM, Jones TR, O'Connor BM, Calvert AH (1990): Quinazoline antifolate thymidylate synthase inhibitors: alkyl, substituted alkyl, and aryl substituents in the C-2 position, *J Med Chem* 33: 3060-3067 .

LISTADO DE SECUENCIAS

[0115]

- 5 <110> Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC Modiquest Chiralix bv
 <120> Inhibidores de PAD
 <130> P6012867PCT
- 10 <150> EP08158330.4
 <151> 2008-06-16
- 15 <150> US 61/061,754
 <151> 2008-06-16
- <160> 143
- <170> Versión de patentIn 3.3
- 20 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
- 25 <400> 1
Asp Asp Tyr Ser Ser Ser Arg Asp Gly Tyr Gly Gly Ser
1 5 10
- 30 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
- <400> 2
Gly Gly Tyr Ser Gly Asp Arg Ser Gly Gly Tyr Gly
1 5 10
- 35 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
- 40 <400> 3
Asp Gly Tyr Gly Gly Ser Arg Asp Ser Tyr Ser Ser Ser
1 5 10
- 45 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
- <400> 4
Asp Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Asp Gly Tyr Tyr Ser Asp
1 5 10
- 50 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
- <400> 5
Ile Glu Ile Met Thr Asp Arg Gly Ser Gly Lys Lys Arg
1 5 10
- 55 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 6
Ile Gly Ser Arg Gly Asp Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 5

<400> 7
Ile Glu Ile Ile Thr Asp Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 10

<400> 8
Asp Ser Glu Gly Thr Trp Arg Lys Gly Pro Glu Ala Asp
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 15

<400> 9
Asp Ser Ser Glu Glu Leu Arg Gly Gly Gly Lys Ser Asp
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 20

<400> 10
Asp Ser Arg Phe Tyr Trp Arg Gly Gly Gly Lys Ser Asp
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25

<400> 11
Asp Ser Gln Phe Ala Phe Arg Gly Ala Ser Ala Ser Asp
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 <400> 12
Thr Asp Xaa Gly Ser
 1 5
 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido
 35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 40

<400> 13
Gly Asp Xaa Ser Gly
1 5
 <210> 14
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 <221> MIS FEATURE
 10 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

 <400> 14
Ser Ser Xaa Asp Gly
1 5
 15 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

 25 <400> 15
Gly Ser Xaa Asp Gly
1 5
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Péptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 35 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

 <400> 16
Thr Asp Xaa Gly Ser
1 5
 <210> 17
 40 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

 <400> 17
Gly Asp Xaa Ser Gly
1 5
 50 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido

 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

 60 <400> 18

Ser Ser Xaa Asp Gly
1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Péptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

 <400> 19
Gly Ser Xaa Asp Gly
1 5
 15 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

 <400> 20
Gly Asp Xaa Gly Ser
1 5
 25 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina
 35
 <400> 21
Tyr Asp Xaa Gly Ser
1 5
 <210> 22
 <211> 13
 40 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 22
Asp Ser Lys His His Ser Arg Asp His Leu Glu Ser Asp
1 5 10
 45 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 50 <400> 23
Asp Ser Lys His Lys Asp Arg Glu Tyr Val Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Péptido

 <400> 24
Asp Ser Lys His Phe His Arg Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 25

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

5 <400> 25
Asp Ser Lys His Leu Ser Arg Glu Trp Met Trp Ser Asp
1 5 10
 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Péptido

<400> 26
Asp Ser Lys His Trp Asp Arg Asp His Phe Glu Ser Asp
1 5 10
 <210> 27
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 27
Asp Ser Lys His His His Arg Glu Tyr Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 28
 20 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 28
Asp Ser Lys His Lys Ser Arg Asp Phe Val Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 29
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 29
Asp Ser Lys His Phe Asp Arg Glu Trp Ile Trp Ser Asp
1 5 10
 30 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 30
Asp Ser Lys Lys Leu His Arg Asp His Met Glu Ser Asp
1 5 10
 <210> 31
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 31
Asp Ser Lys Lys Trp Ser Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 32
 40 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 32
Asp Ser Lys Lys His Asp Arg Asp Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 45 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Péptido

<400> 33
Asp Ser Lys Lys Lys His Arg Glu Trp Val Trp Ser Asp
1 5 10

5 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

10 <400> 34
Asp Ser Lys Lys Phe Ser Arg Asp His Ile Glu Ser Asp
1 5 10

<210> 35
 <211> 13
 <212> PRT

15 <213> Péptido

<400> 35
Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Glu Tyr Met Phe Ser Asp
1 5 10

20 <210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 36
Asp Ser His Lys Trp His Arg Asp Phe Phe Tyr Ser Asp
1 5 10

25 <210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

30 <400> 37
Asp Ser His Lys His Ser Arg Glu Trp Leu Trp Ser Asp
1 5 10

<210> 38
 <211> 13

35 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 38
Asp Ser His His Lys Asp Arg Asp His Val Glu Ser Asp
1 5 10

40 <210> 39
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Péptido

45 <400> 39
Asp Ser His His Phe His Arg Glu Tyr Ile Phe Ser Asp
1 5 10

<210> 40
 <211> 13

50 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 40
Asp Ser His His Leu Ser Arg Asp Phe Met Tyr Ser Asp
1 5 10

55 <210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 41
Asp Ser His His Trp Asp Arg Glu Trp Phe Trp Ser Asp
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 5
 <400> 42
Asp Ser His Lys His His Arg Asp His Leu Glu Ser Asp
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 10
 <400> 43
Asp Ser His Lys Lys Ser Arg Glu Tyr Val Phe Ser Asp
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 15
 <400> 44
Asp Ser His Lys Phe Asp Arg Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 20
 <400> 45
Asp Ser His Lys Leu His Arg Glu Trp Met Trp Ser Asp
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25
 <400> 46
Asp Ser His Lys Trp Ser Arg Asp His Phe Glu Ser Asp
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30
 <400> 47
Phe Phe Asp Ser Lys His His Ser Arg Asp His Leu Glu Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 35
 <400> 48
Phe Phe Asp Ser Lys His Lys Asp Arg Glu Tyr Val Phe Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 40
 <400> 49

Phe Phe Asp Ser Lys His Phe His Arg Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 5
 <400> 50
Phe Phe Asp Ser Lys His Leu Ser Arg Glu Trp Met Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 10
 <400> 51
Phe Phe Asp Ser Lys His Trp Asp Arg Asp His Phe Glu Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 15
 <400> 52
Phe Phe Asp Ser Lys His His His Arg Glu Tyr Leu Phe Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 20
 <400> 53
Phe Phe Asp Ser Lys His Lys Ser Arg Asp Phe Val Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25
 <400> 54
Phe Phe Asp Ser Lys His Phe Asp Arg Glu Trp Ile Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30
 <400> 55
Phe Phe Asp Ser Lys Lys Leu His Arg Asp His Met Glu Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 35
 <400> 56
Phe Phe Asp Ser Lys Lys Trp Ser Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido
 40
 <400> 57
Phe Phe Asp Ser Lys Lys His Asp Arg Asp Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 58

ES 2 400 013 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

5 <400> 58
Phe Phe Asp Ser Lys Lys Lys His Arg Glu Trp Val Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

10 <400> 59
Phe Phe Asp Ser Lys Lys Phe Ser Arg Asp His Ile Glu Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

15 <400> 60
Phe Phe Asp Ser His Lys Leu Asp Arg Glu Tyr Met Phe Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

20 <400> 61
Phe Phe Asp Ser His Lys Trp His Arg Asp Phe Phe Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

25 <400> 62
Phe Phe Asp Ser His Lys His Ser Arg Glu Trp Leu Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

30 <400> 63
Phe Phe Asp Ser His His Lys Asp Arg Asp His Val Glu Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

35 <400> 64
Phe Phe Asp Ser His His Phe His Arg Glu Tyr Ile Phe Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

40 <400> 65
Phe Phe Asp Ser His His Leu Ser Arg Asp Phe Met Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT

45 <400> 65
Phe Phe Asp Ser His His Leu Ser Arg Asp Phe Met Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT

50 <400> 65
Phe Phe Asp Ser His His Leu Ser Arg Asp Phe Met Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT

55 <400> 65
Phe Phe Asp Ser His His Leu Ser Arg Asp Phe Met Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 400 013 T3

<213> Péptido

<400> 66
Phe Phe Asp Ser His His Trp Asp Arg Glu Trp Phe Trp Ser Asp
1 5 10 15

5 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

10 <400> 67
Phe Phe Asp Ser His Lys His His Arg Asp His Leu Glu Ser Asp
1 5 10 15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

15 <400> 68
Phe Phe Asp Ser His Lys Lys Ser Arg Glu Tyr Val Phe Ser Asp
1 5 10 15

20 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 69
Phe Phe Asp Ser His Lys Phe Asp Arg Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10 15

25 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

30 <400> 70
Phe Phe Asp Ser His Lys Leu His Arg Glu Trp Met Trp Ser Asp
1 5 10 15

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

35 <400> 71
Phe Phe Asp Ser His Lys Trp Ser Arg Asp His Phe Glu Ser Asp
1 5 10 15

40 <210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

45 <400> 72
Asp Ser Lys Lys Phe Asp Arg Asp His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

50 <400> 73
Asp Ser Lys Trp Phe Asp Arg Asp His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

55

<400> 74
Asp Ser Asn Lys His His Arg Asp His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 75
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 75
Asp Ser Lys Trp His His Arg Asp His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 10 <210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 15 <400> 76
Asp Ser Asn Trp His His Arg Asp His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 77
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Péptido

 <400> 77
Asp Ser Lys Lys His Asp Arg Asp His Leu Trp Ser Asp
1 5 10
 25 <210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 78
Asp Ser Lys Lys His Asp Arg Asp His Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 30 <210> 79
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 35 <400> 79
Asp Ser Lys Lys His Phe Arg Asp Lys Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 80
 <211> 13
 40 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 80
Asp Ser Trp Trp His Lys Arg Asp Lys Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 45 <210> 81
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 50 <400> 81
Asp Ser Lys Lys His Asp Arg Asp Lys Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 82
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Péptido

 <400> 82
Asp Ser Lys Lys Phe His Arg Asp Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 83
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 5
 <400> 83
Asp Ser Lys Lys Phe Lys Arg Asp Phe Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 84
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 84
Asp Ser Lys Lys Phe Asp Arg Asp Phe Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 15 <210> 85
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 20 <400> 85
Asp Ser His Lys Phe Asp Arg Asp Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 86
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Péptido
 <400> 86
Asp Ser Lys Lys Tyr Asp Arg Asp Phe Leu Trp Ser Asp
1 5 10
 <210> 87
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30 <400> 87
Asp Ser Lys Lys Phe Asp Arg Gly His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 40 <400> 88
Asp Ser Lys Trp His His Arg Gly His Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 89
 <211> 13
 <212> PRT
 45 <213> Péptido
 <400> 89
Asp Ser Lys Lys His Phe Arg Gly Lys Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 50 <210> 90
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido
 55 <400> 90
Asp Ser Lys Lys Phe His Arg Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10
 <210> 91
 <211> 13

<400> 99
Asp Ser Lys Phe Lys Phe Arg Tyr Ala Tyr Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 100
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 100
Asp Ser Lys Phe His Phe Arg Tyr Ala Val Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 101
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 101
Asp Ser Gln Phe Ala Tyr Arg Asn Ala Lys Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 102
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 102
Asp Ser Gln Trp Ala Phe Arg His Ala Leu Phe Ser Asp
1 5 10
 <210> 103
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 103
Asp Ser Gln Trp Ala Phe Arg Asn Ala Phe Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 104
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 104
Asp Ser Gln Phe Lys Phe Arg Gly Ala Phe Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 105
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 105
Asp Ser Gln Cys Leu Phe Arg Gly Ala Phe Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 106
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <400> 106
Asp Ser Lys Phe Ala Phe Arg Gly Gly Ile Ala Ser Asp
1 5 10
 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

5 <400> 107
Phe Phe Asp Ser Lys His Phe Asp Xaa Glu Trp Ile Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 15 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 108
Phe Phe Asp Ser His Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 109
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 109
Phe Phe Asp Ser His Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10 15
 30 <210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 40 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 110
Phe Phe Asp Ser His Lys Leu His Xaa Glu Trp Met Trp Ser Asp
1 5 10 15
 <210> 111
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 111
Asp Ser His Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10
 55 <210> 112
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 400 013 T3

<222> (7)..(7)
 <223> X representa ornitin fluoroamidina

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 112
 10 **Asp Ser Lys Lys His Asp Xaa Asp Phe Leu Tyr Ser Asp**
 1 5 10
 <210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

20 <400> 113
Phe Phe Asp Ser Lys His Phe Asp Xaa Glu Trp Ile Trp Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 114
Phe Phe Asp Ser His Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Tyr Ser Asp
 1 5 10 15
 35 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Péptido

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

45 <400> 115
Phe Phe Asp Ser His Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
 1 5 10 15
 <210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 55 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 116
Phe Phe Asp Ser His Lys Leu His Xaa Glu Trp Met Trp Ser Asp
 1 5 10 15
 60 <210> 117
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 117
Asp Ser His Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 118
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 118
Asp Ser Lys Lys His Asp Xaa Asp Phe Leu Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 119
His Phe Asp Xaa Glu Trp Ile
1 5

<210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 120
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe
1 5

<210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

<400> 121
Lys Leu His Xaa Glu Trp Met
1 5

<210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 5 <223> Xaa reprezenta fluoroamidina de ornitina

 <400> 122
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile
1 5
 <210> 123
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 15 <223> Xaa reprezenta fluoroamidina de ornitina

 <400> 123
Lys His Asp Xaa Asp Phe Leu
1 5
 20 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa reprezenta fluoroamidina de ornitina
 30
 <400> 124
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile
1 5
 <210> 125
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa reprezenta fluoroamidina de ornitina

 <400> 125
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe
1 5
 45 <210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido

 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa reprezenta fluoroamidina de ornitina

 55 <400> 126
Thr Asp Xaa Gly Ser
1 5
 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina
 5
 <400> 127
Gly Asp Xaa Gly Ser
1 5
 <210> 128
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina
 15
 <400> 128
Tyr Asp Xaa Gly Ser
1 5
 <210> 129
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 25
 <400> 129
Phe Asp Xaa Asp Phe
1 5
 <210> 130
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa representa AEEAc
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa representa AEEAc
 45
 <400> 130
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Xaa
1 5
 <210> 131
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa representa AEEAc
 60

<400> 131
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Xaa
1 5
 5 <210> 132
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

 <400> 132
 15 **Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile**
1 5
 <210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Péptido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 25 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 30 <223> Xaa representa AEEAc

 <400> 133
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Xaa
1 5
 35 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8) para AEEAc
 <223> Xaa representa AEEAc

 <400> 134
 50 **Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Xaa**
1 5
 <210> 135
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 60
 <400> 135
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe
1 5

<210> 136
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 10
 <400> 136
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile
1 5
 <210> 137
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 20
 <400> 137
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Tyr
1 5
 <210> 138
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 30
 <400> 138
Lys Phe Asp Xaa Asp Phe Ile Lys
1 5
 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Péptido
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 45
 <400> 139
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe
1 5
 <210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina
 55
 <400> 140
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Tyr
1 5
 <210> 141

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptido

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa representa fluoroamidina de ornitina

10 <400> 141
Lys Trp His Xaa Asp Phe Phe Lys
1 5

<210> 142
 <211> 5
 <212> PRT

15 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

20 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 142
Gly Asp Xaa Gly Ser
1 5

<210> 143
 <211> 5
 <212> PRT

25 <213> Péptido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

30 <223> Xaa representa cloroamidina de ornitina

<400> 143
Tyr Asp Xaa Gly Ser
1 5

35

REIVINDICACIONES

1. Compuesto capaz de inhibir la actividad de una PAD que comprende una parte peptídica y un grupo electrofílico reactivo al tiol portado por un aminoácido Ω donde
- 5 (a) la parte peptídica comprende al menos 5 aminoácidos y no más de 20 aminoácidos,
 (b) el péptido comprende el motivo (b2):
 (b2) H/K/F/L/W - S/D/H - Ω - D/E - H/Y/F/W donde Ω representa un aminoácido que porta un grupo electrofílico reactivo al tiol
 (c) opcionalmente el N-término y/o C-término de la secuencia peptídica se modifican y
 10 (d) donde el grupo electrofílico reactivo al tiol es un grupo halógeno-amidina, preferiblemente una fluoroamidina o una cloroamidina.
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde Ω es ornitina.
- 15 3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el motivo definido en (b2) es: H / K/F/L/W-D- Ω -D-H/Y/F/W.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia peptídica comprende o consiste en 7 aminoácidos.
- 20 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el N-término de la secuencia peptídica se modifica por un grupo acetilo y/o el C-término como una amida.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el N-término de la secuencia peptídica se modifica por adición de un grupo 2-naftilsulfonilo y/u opcionalmente donde el C-término se modifica por adición de un D-aminoácido.
- 25 7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia peptídica comprende o consiste en SEQ ID NO: 22-78, 82, 84,85 donde R se ha sustituido por Ω .
- 30 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto comprende o consiste en SEQ ID NO: 107-125,129-141, preferiblemente 120, 122,129-141, más preferiblemente 136-141, incluso más preferiblemente 138, 141.
- 35 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la parte peptídica comprende o consiste en las secuencias SEQ ID NO: 129-135.
10. Composición que comprende un compuesto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y al menos un excipiente, preferiblemente donde la composición es conveniente para la administración local, preferiblemente la inyección en una articulación o la administración transdérmica tópica.
- 40 11. Composición según la reivindicación 10 que comprende además un inmunodepresivo y/o un agente supresor de inflamación.
- 45 12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, para su uso como un medicamento, preferiblemente donde el medicamento es para la prevención, retraso y/o tratamiento de un trastorno autoinmunitario, preferiblemente donde el trastorno autoinmunitario es RA.
- 50 13. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para la producción de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de un trastorno autoinmunitario, preferiblemente donde el trastorno autoinmunitario es RA.

Fig 1

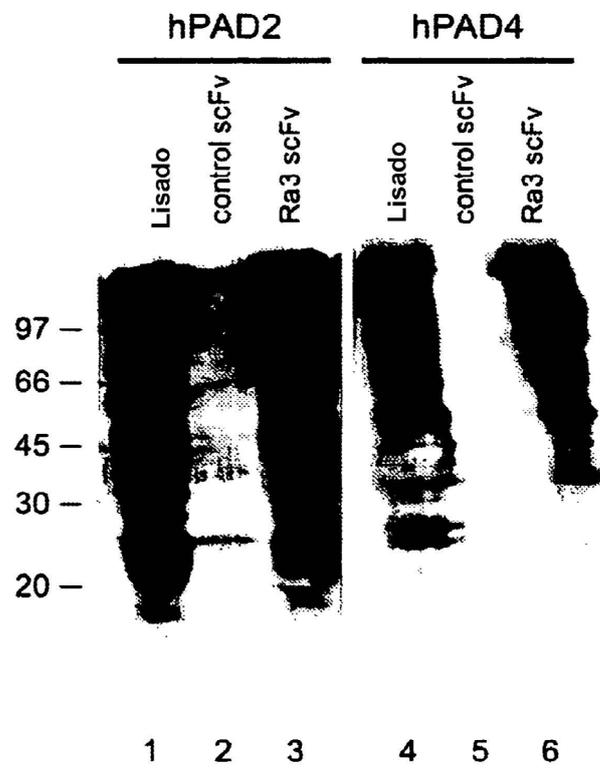


Fig 2

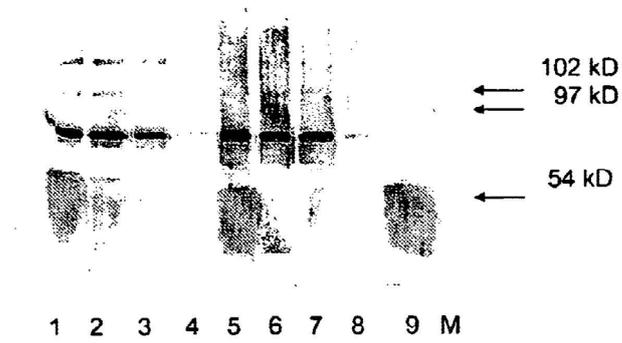


Fig 3

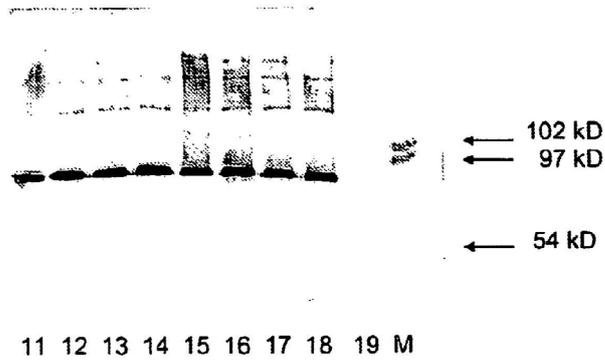


Fig 4a

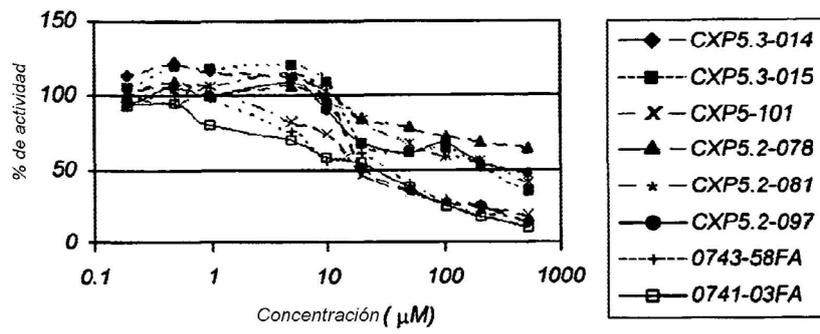


Fig 4b

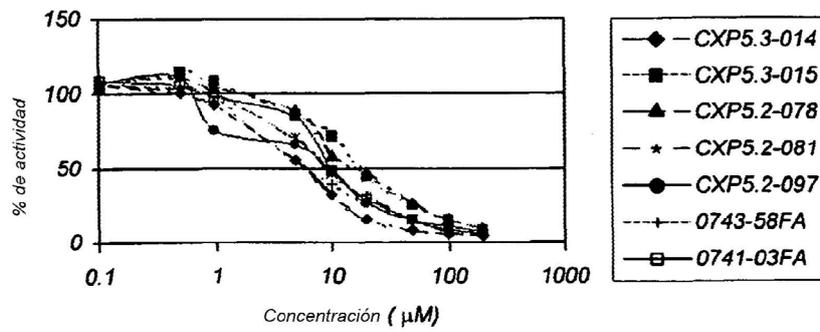


Fig 5a.1



Fig 5a.2

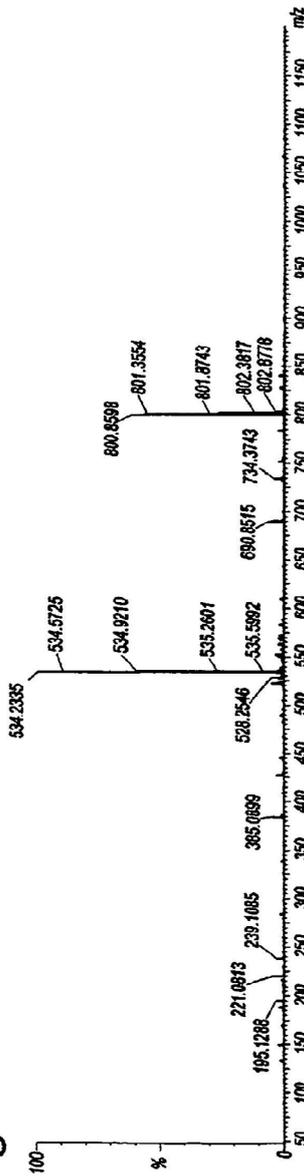


Fig 5b.1

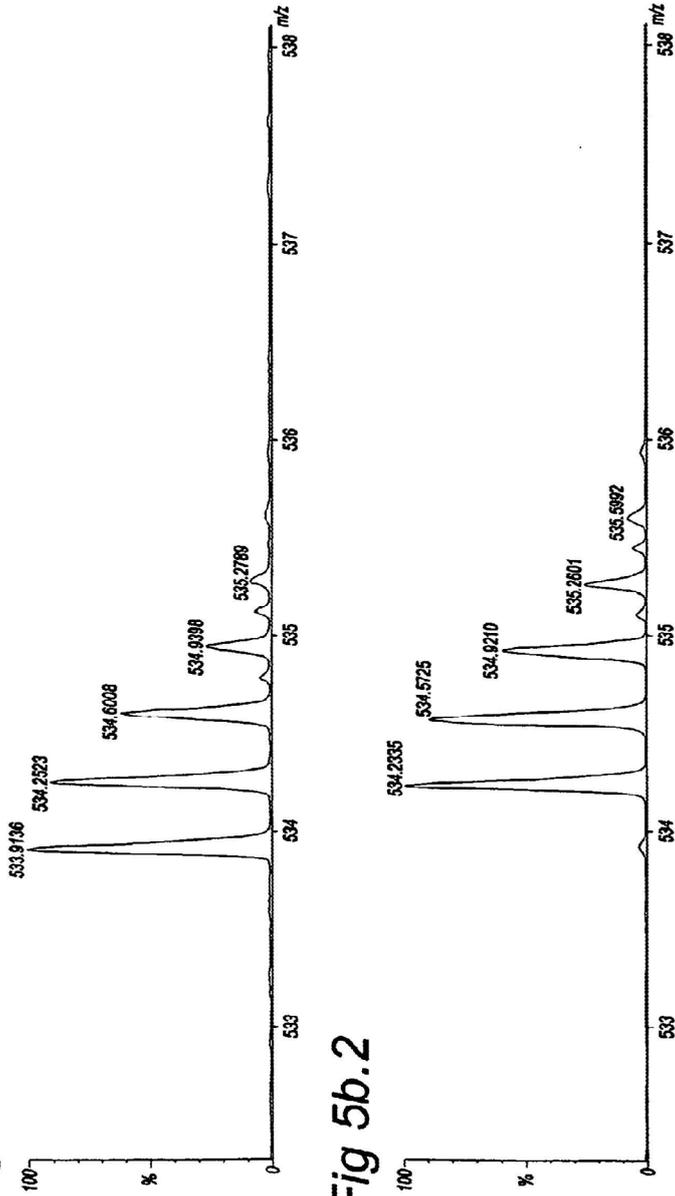


Fig 5b.2

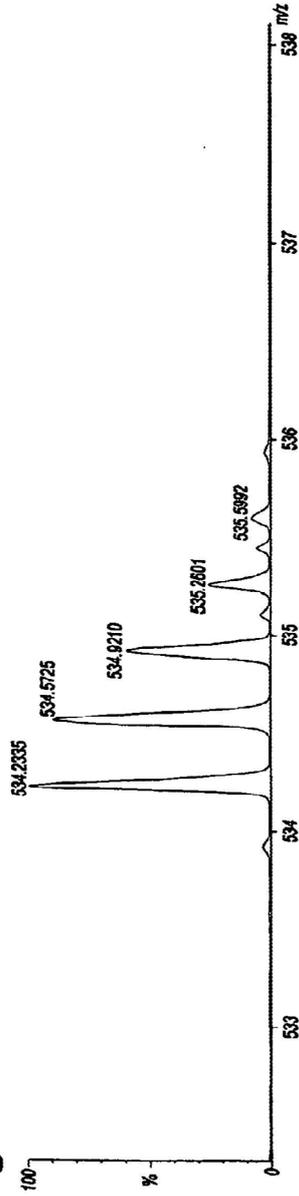


Fig 5c.1

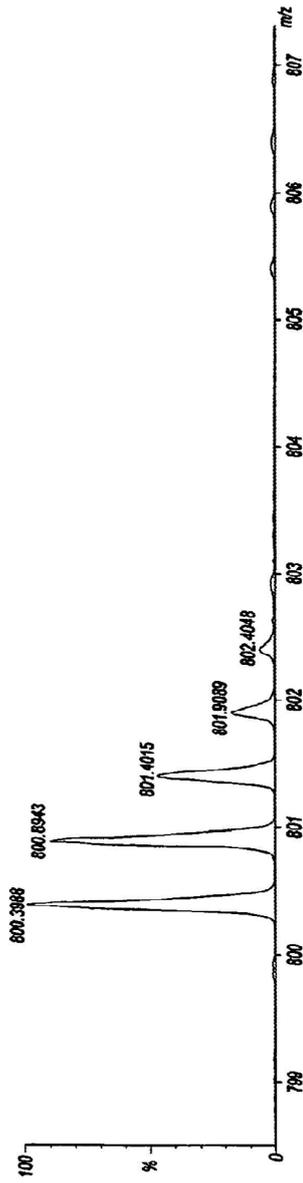


Fig 5c.2

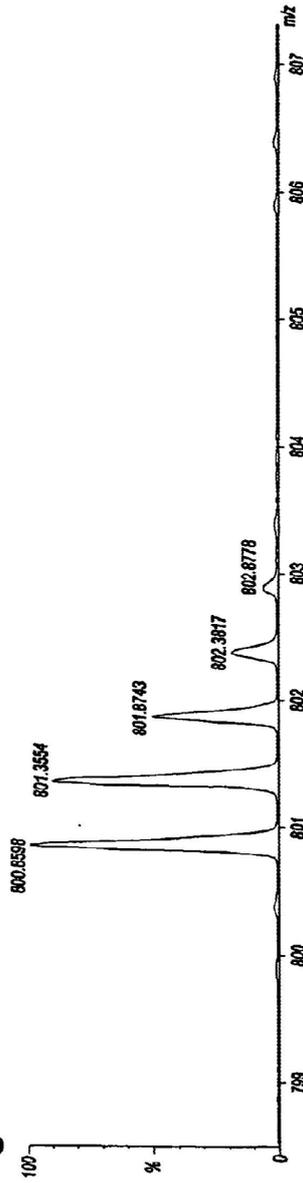


Fig 6

