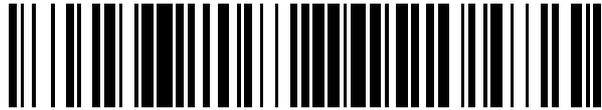


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 530**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2010** **E 10822880 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2504354**

54 Título: **Péptidos citrulinados virales y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**23.11.2009 EP 09176776**

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

**12.05.2015**

73 Titular/es:

**TOSCANA BIOMARKERS S.R.L. (100.0%)**  
**Via Fiorentina, 1**  
**53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

**PRATESI, FEDERICO y**  
**MIGLIORINI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 535 530 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos citrulinados virales y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos péptidos sintéticos citrulinados derivados del virus de Epstein Barr y su uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular, de la artritis reumatoide (AR).

10 **Antecedentes de la técnica**

En el amplio espectro de las enfermedades inflamatorias de las articulaciones, la artritis reumatoide (AR) ocupa una posición destacada. Al causar la inflamación simétrica y destructiva de las pequeñas y grandes articulaciones, la AR produce dolor y fallo de las articulaciones, que al final genera desfiguración y discapacidad.

15 La aparición de diversos autoanticuerpos es prueba de la existencia de AR. El más conocido es el factor reumatoide (RF), una clase de anticuerpos IgG o IgM dirigidos contra la región Fc del isotipo IgG de las inmunoglobulinas. Aproximadamente el 70-80 % de los pacientes con AR son seropositivos para RF, pero también se encuentran RF en las infecciones crónicas, enfermedades linfoproliferativas, otras enfermedades reumáticas y en aproximadamente  
20 el 20 % de los individuos sanos de edad avanzada. Por lo tanto, dada la limitada especificidad del RF hacia la AR, se han buscado otros anticuerpos más específicos. Se demostró claramente que los anticuerpos APF (factor anti-perinuclear) y AKA (anticuerpos anti-queratina) son altamente específicos de la enfermedad.

25 Más tarde, se encontró que los antígenos reconocidos por los anticuerpos APF y AKA son proteínas que contienen citrulina generadas después de la traducción mediante la modificación de las argininas en los restos de citrulina. Se desarrolló un ELISA usando péptidos citrulinados (CP) sintéticos derivados de la filagrina [G. A. Schellekens *et al. J. Clin. Invest.* 1998, 101, 273]. Para aumentar la sensibilidad del ensayo, se modificaron los CP en una estructura, el péptido citrulinado cíclico (CCP), en el que el resto de citrulina queda expuesto de manera óptima para la unión de anticuerpos [solicitud internacional WO1998022503]. En un ensayo denominado CCP1 [G. A. Schellekens *et al. Arthritis Rheum.* 2000, 43, 155], pudieron detectarse los anticuerpos en el 68 % de los sueros de pacientes con AR con una especificidad del 98 % con un solo CCP. Estudios recientes indican que el ensayo CCP de segunda  
30 generación, el CCP2 [J. Avouac *et al. Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65, 845], es muy sensible y específico, mostrando una sensibilidad del 68 % (intervalo del 39 al 94 %) con una especificidad del 95 % (intervalo del 81 al 100 %). Recientemente, se ha desarrollado un ensayo de tercera generación por INOVA [L. Lutteri *et al. Clin. Chim. Acta* 2007, 386, 76] y se ha reivindicado como un nuevo ELISA anti-CCP más sensible que mantiene una especificidad del 98 %. Estos ensayos de ELISA se encuentran disponibles en el mercado (Euro-Diagnostica, Arnhem, Países Bajos; Axis-Shield, Dundee, Escocia; INOVA, San Diego, EE.UU.).

40 Además, se ha presentado una serie de solicitudes de patente, referidas a métodos basados en proteínas/péptidos citrulinados para detectar anticuerpos en pacientes con AR [US20020143143, US20070087380, EP1946109, US20070148704, WO2009007846, WO2009000077, WO2007017556, EP1456662, WO1999028344, WO2008132264].

45 Se han descrito diversas proteínas citrulinadas en la membrana sinovial con AR, por ejemplo, fibrina citrulinada extravascular [C. Masson-Bessiere *et al. J. Immunol.* 2001, 166, 4177], colágeno II [H. Burkhardt *et al. Eur. J. Immunol.* 2005, 35, 1643] y vimentina en macrófagos [E. R. Vossenaar *et al. Arthritis Rheum.* 2004, 50, 3485]. Aunque la filagrina no se expresa en la membrana sinovial, sus derivados citrulinados se han usado para la detección de anticuerpos anti-CP [US20090028885, US 7.445.903, US 6.890.720].

50 La AR tiene influencias tanto genéticas como ambientales, y hace tiempo que se sospecha que los virus potencian el desarrollo de la AR. Para ser candidatos para desempeñar un papel causal en la AR, los virus tienen que ser ubicuos, persistir en el organismo, mostrar tropismo directo o indirecto de las articulaciones, y ser capaces de alterar las respuestas inmunes del huésped. El virus de Epstein Barr (EBV) presenta estas características. Como resultado de ello, los posibles vínculos entre el VEB y la AR han sido objeto de investigación durante las tres últimas décadas  
55 [K. H. Costenbader *et al. Arthritis Res. Ther.* 2006, 8, 204]. Se sabe que los pacientes de AR poseen niveles elevados de anticuerpos frente a las proteínas EBV latentes y replicativas y, en particular, frente a EBNA-1 (antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr). Además, la carga de EBV en sangre periférica de pacientes de AR es mayor que en los controles. Una serie de estudios ha arrojado luz sobre el posible papel etiológico de EBV en la sinovitis de la AR [S. Sawada *et al. Autoimmun. Rev.* 2005, 4, 106]. Estos estudios llevaron a la idea de explorar la respuesta inmune en los  
60 pacientes con AR usando el CP de origen viral. Los anticuerpos específicos de un péptido correspondiente a la secuencia de EBNA-1 (35-58) (péptido citrulinado viral 1, VCP1), que contiene citrulina en lugar de arginina, se detectaron en el 50 % de los sueros de AR y en menos del 5 % de los sueros de control de la enfermedad y normales [F. Pratesi *et al. Arthritis Rheum.* 2006, 54, 733]. Además, los anticuerpos anti-VCP1 purificados por afinidad de sueros de AR reaccionaron con CP derivado de la filagrina, fibrinógeno desaminado y EBNA-1  
65 recombinante desaminada. Se determinó la frecuencia de los anticuerpos anti-VCP1 en 627 muestras de suero, 300 de pacientes con AR y 327 de los controles, incluyendo enfermedades del tejido conjuntivo, artritis crónicas, y en

donantes sanos. Se encontraron anticuerpos anti-VCP1 en el 45 % de los sueros de AR frente a menos del 5 % de los controles [C. Anzilotti *et al. J. Rheumatol.* 2006, 33, 647].

5 Incaprera *et al. [Clin. y Exp. Rheum.* 1998, 16(3), 289-294] desvelan el posible papel de EBV en la autoinmunidad sistémica del lupus eritematoso. En particular, dicho documento indica que EBNA-2 (354-373) reconoce anticuerpos IgG anti-SmD1.

10 Los péptidos citrulinados a base de EBNA-1 desiminada (35-58) son el objeto de la solicitud internacional WO2004087747, en la que se describe su uso para detectar anticuerpos en sueros con AR. Dicha solicitud también desvela que el uso del péptido antigénico múltiple [MAP; J. P. Tarn PNAS EE.UU. 1988, 85, 5409], que contiene al menos 4 copias de EBNA-1 desiminada (35-58) como antígeno de recubrimiento en el ensayo inmunológico para la detección de anticuerpos, permite detectar anticuerpos en el 45 % de los sueros con AR con una especificidad del 95 %.

### 15 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevos péptidos sintéticos citrulinados derivados del EBV, y a su uso en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades autoinmunes, específicamente de la AR. En particular, estas secuencias se derivan de las proteínas de EBV (por ejemplo, EBNA-1, EBNA-2). Los péptidos citrulinados de acuerdo con la invención tienen una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de la región de 320-375 aa de la proteína EBNA-2 del EBV (Swiss-Prot P12978). Sorprendentemente, los péptidos según lo descrito en la invención y que poseen un número de restos de citrulina superior a uno demostraron ser muy adecuados para el diagnóstico específico de la AR.

25 Para aumentar la sensibilidad, manteniendo intacta la especificidad del ensayo, los autores de la presente invención buscaron otras secuencias desiminadas de origen viral para el conjunto de ensayos de diagnóstico de la AR. Con este fin, se han sintetizado secuencias de péptidos derivadas de proteínas de EBV con diferentes grados de sustituciones de arginina/citrulina, y se ha ensayado la reactividad en sueros de pacientes con AR (Tabla 1). Entre estos, algunas secuencias permitieron la diferenciación de los sueros con AR de los controles normales. Los mejores resultados se obtuvieron con péptidos citrulinados derivados del péptido desiminado EBNA-2 (338-358) (G Q S R G Q S R G R G R G R G R G R G K G). Estas secuencias y su uso en el diagnóstico y el tratamiento de trastornos autoinmunes son el objeto de la presente invención. En particular, la presente invención muestra que EBNA-2 (338-358) no citrulinado no reacciona con los sueros con AR. Por el contrario, los péptidos citrulinados de la invención muestran una mayor reactividad hacia los sueros con AR. También demuestra que la población de IgG identificadas por los péptidos de la invención se caracteriza por ser IgG anti-CP específicas de AR e IgG anti-SmD1 específicas de LES. La presente invención también ha identificado dos epítomos representados por las repeticiones Gly-Cit y, el otro, en las repeticiones Gly-Gln-Ser-Cit, siendo las posiciones más reactivas Cit-341, Cit-345 y Cit-349.

40 Los péptidos de la invención derivan de la región EBNA-2 (320-375).

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención un péptido antigénicamente eficaz **que consiste**, desde el extremo amino al extremo carboxílico, **en** la secuencia de aminoácidos: G Q S X<sub>1</sub>, G Q S X<sub>2</sub> G X<sub>3</sub> G X<sub>4</sub> G X<sub>5</sub> G X<sub>6</sub> G X<sub>7</sub> G K G (Fórmula II, aminoácido 19 a aminoácido 39 de la SEC ID N° 1), en la que los aminoácidos X<sub>1</sub>-X<sub>7</sub> se seleccionan de manera independiente entre un resto de arginina o un resto de citrulina, y al menos uno de X<sub>1</sub>-X<sub>7</sub> es un resto de citrulina, o un fragmento funcional del mismo, **siendo capaz dicho péptido antigénicamente eficaz y fragmento del mismo de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.**

50 Más preferentemente, el péptido **consiste en** la secuencia de aminoácidos G Q S Cit G Q S Cit G X<sub>3</sub> G Cit G X<sub>5</sub> G X<sub>6</sub> G X<sub>7</sub> G K G (SEC ID N° 27), en la que los aminoácidos X<sub>3</sub>-X<sub>7</sub> se seleccionan, de manera independiente, entre un resto de arginina o un resto de citrulina.

Más preferentemente, el péptido **consiste en** la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de:

55 GQSRGQSCitGRGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 4), GQSRGQSRGRGCitGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 6), GQSRGQSCitGRGCitGRGRGRGKG (SEC ID N° 12), GQSCitGQSCitGRGCitGRGRGRGKG (SEC ID N° 22) o G Q S Cit G Q S Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G K G (SEC ID N° 2), en la que Cit es un resto de citrulina o un fragmento funcional del mismo.

60 En una realización preferida, el péptido es de forma lineal. Más preferentemente, el péptido está en forma de péptido ramificado multimérico o de otro complejo conjugado.

El péptido ramificado multimérico consiste en:

- 65 - una estructura de núcleo MAP;  
- un péptido lineal que tiene una secuencia de aminoácidos de fórmula II, unida a través de un enlace carbamido a



El método descrito anteriormente puede ser un ensayo inmunológico ELISA en el que un anticuerpo indicador, como una inmunoglobulina anti-humana, se conjuga con una enzima y se añade para medir el título de anticuerpos mediante un transductor espectroscópico.

5 Por lo tanto, es un objeto adicional de la invención un método para el diagnóstico de **la artritis reumatoide** en un sujeto que comprende la etapa de detectar anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmune en una muestra biológica mediante:

- la reacción en condiciones adecuadas de dicha muestra biológica con al menos un péptido como se ha descrito anteriormente para producir un complejo; y
- la detección del complejo.

Se obtienen una mayor sensibilidad y especificidad del método cuando los péptidos se usan en forma de MAP o de otro complejo conjugado. En particular, en forma de MAP tetravalentes.

15 Por lo tanto, preferentemente, la muestra biológica se hace reaccionar con al menos un péptido o péptido ramificado múltiple de la invención y un péptido ramificado múltiple que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



en la que: Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma.

25 Se encontró que un método basado en el uso combinado de una MAP de péptidos citrulinados de fórmula GPPWWPPICDPPQPSKTQGQSX<sub>1</sub> GQSX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>GX<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>GX<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>GKGSX<sub>8</sub>DKQX<sub>9</sub>KPGGPWX<sub>10</sub>PEP (Fórmula I, SEC ID N° 1), en la que los aminoácidos X<sub>1</sub>-X<sub>10</sub> se seleccionan, de manera independiente, entre un resto de arginina o un resto de citrulina, y al menos uno de X<sub>1</sub>-X<sub>10</sub> es un resto de citrulina, y de MAP de EBNA-1 desiminado (35-58) de secuencia G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G (fórmula III, SEC ID N° 3) proporciona el ensayo de sensibilidad y especificidad más altas para detectar anticuerpos específicos de la AR.

30 Así pues, preferentemente, se hace reaccionar la muestra biológica con el péptido ramificado múltiple que consiste en la secuencia (G Q S Cit G Q S Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G K G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina (Fórmula V, también denominado VCP-2):



en la que Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma, y el péptido que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina (Fórmula VI, también denominado VCP-1):



en la que: Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma.

45 En una realización preferida, el método es un ensayo inmunológico.

Es un objeto adicional de la invención un kit para el diagnóstico de **la artritis reumatoide** que comprende al menos un péptido de la invención o un fragmento funcional del mismo. Preferentemente, el kit comprende además el péptido ramificado múltiple que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)

G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina (Fórmula VI, también denominado VCP-1):



5 en la que: Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma.

10 En particular, el kit permite la detección de anticuerpos anti-CP en fluidos biológicos. El kit de diagnóstico comprende una combinación de péptidos citrulinados como se han definido anteriormente o de un fragmento funcional de los mismos, y al menos un reactivo adicional. Preferentemente, el reactivo adicional es una inmunoglobulina anti-humana conjugada a una enzima capaz de reaccionar con un sustrato cromogénico.

Es otro objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz del péptido o péptido ramificado múltiple de la invención, o un fragmento funcional del mismo.

15 En la presente invención, “antigénicamente eficaz” significa que el péptido, o un fragmento funcional del mismo, es capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de **la artritis reumatoide** y/o a linfocitos T específicos de **la artritis reumatoide**.

### 20 Descripción detallada de la invención

Ahora, se ilustrará la invención mediante ejemplos ilustrativos, no limitantes, que se refieren a las siguientes figuras.

25 Figura 1. Se analizaron 79 sueros con AR por ELISA para evaluar la presencia de diferentes poblaciones de autoanticuerpos comparando la reactividad hacia los siguientes antígenos: CCP2, CCP3, VCP1 [péptido de fórmula (VI)] y VCP2 [péptido de fórmula (V)]. La presencia de diferentes poblaciones de autoanticuerpos se representa en el diagrama de bloques. Encima del diagrama, se muestra una serie de sueros con AR positivos (+) o negativos (-) en anti-CCP2, anti-CCP3, anti-VCP1 [péptido de fórmula (VI)] y anti-VCP2 [péptido de fórmula (V)]. Se resaltan las poblaciones de anticuerpos positivos en VCP1 [péptido de fórmula (VI)] y/o VCP2 [péptido de fórmula (V)], pero no en CCP2 y CCP3.

30 Figura 2. Distribución de los anticuerpos contra péptidos/proteínas citrulinados (ACPA - anticuerpos anti-CP) detectados con VCP2 en 100 sujetos con AR, 100 sujetos normales sanos (SSN) y 206 controles de la enfermedad (espondilitis anquilosante, EA; mononucleosis infecciosa, MI; crioglobulinemia mixta, CM; polimialgia reumática, PMR; artritis sorliásica, AS; síndrome de Sjogren, SSj; lupus eritematoso sistémico, LES; esclerosis sistémica, ES; artritis indiferenciada, AI). Las muestras de suero se ensayaron por ELISA usando el método descrito en el ejemplo 2. Los resultados demuestran la alta especificidad de VCP2 en la detección de ACPA en pacientes con AR. Por otra parte, no se detectaron anticuerpos en los controles de la enfermedad y, en particular, en la MI y el LES, en contraste con los resultados descritos en Incaprera *et al.* [*Clin Exp Rheumatol* 1998, 16, 289], que publicaron la detección de IgG con la secuencia de EBNA2 no desiminado (354-373) en sueros con MI y LES.

40 Figura 3. Correlación entre los anticuerpos anti-CCP y anti-VCP2. Se analizaron 100 sueros con AR con el ensayo de CCP2 y con VCP2 usando el método descrito en el ejemplo 2. Los resultados muestran la correlación significativa ( $p < 0,0001$ ) entre las dos poblaciones de anticuerpos, lo que demuestra que los anticuerpos anti-VCP2 son ACPA y que, por lo tanto, son específicos de la AR y no de otras enfermedades autoinmunes.

45 Figura 4. Se realizó el aislamiento de anticuerpos anti-VCP2 de sueros con AR de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4. Se ensayaron cuatro preparaciones de anticuerpos anti-VCP2 de 4 sueros con AR diferentes mediante ELISA en VCP2, EBNA2 no desiminado (338-358) y una MAP de control. La IgG anti-VCP2 muestra una reactividad muy alta con VCP2, la MAP derivada de EBNA2 (338-358) citrulinada, y no se une a la arginina que contiene EBNA2 (338-358) ni a la MAP de control.

### 50 Ejemplo 1. Síntesis de péptidos

Se sintetizaron péptidos usando una resina de Wang precargada con el aminoácido C-terminal de la secuencia o con el núcleo MAP, y siguiendo la estrategia de péptidos en fase sólida con Fmoc/tBu. Se llevaron a cabo las desprotecciones de Fmoc en 20 min con piperidina al 20 % en DMF. Se realizaron reacciones de acoplamiento mediante el tratamiento de la resina durante 45 min con una solución 2,5 M de los aminoácidos protegidos con Fmoc y HOBt en DMF (2,5 equiv), una solución 0,5 M de TBTU en DMF (2,5 equiv) y NMM 4 M en DMF (5 equiv). Se llevaron a cabo la escisión peptídica de la resina y la desprotección de las cadenas laterales de aminoácidos en 3 h con TFA/tioanisol/etanoditiol/fenol/H<sub>2</sub>O (82,5:5:2,5:5:5). Se precipitaron los productos brutos con Et<sub>2</sub>O frío, se centrifugaron y se liofilizaron. Los péptidos puros se obtuvieron por HPLC en una pureza > 95 % y se caracterizaron

por espectrometría de masas (ESI-Orbitrap y/o MALDI-TOF).

#### Ejemplo 2. ELISA para la determinación de anticuerpos anti-CP

5 Se diluyó la MAP de los antígenos de péptidos citrulinados de acuerdo con la invención hasta una concentración de 20 µg/ml en tampón fosfato salino (PBS) y se cargó en los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno (50 µl/pocillo). Se dejó la placa durante la noche a +4 °C para permitir la interacción entre el péptido y los plásticos (sin embargo, se puede incubar a 37 °C durante 1-2 horas con el mismo resultado). Al finalizar el período de recubrimiento, se trataron los pocillos que contenían el antígeno, además de un número igual de pocillos que se usaron como controles, durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con albúmina de suero bovino (BSA) al 3 % en PBS. A continuación, se cargaron las muestras de suero de los pacientes (diluidas 1:200 en un tampón constituido por BSA al 1 %, Tween X-100 al 0,05 % en PBS) sobre la placa (50 µl/pocillo) y se dejaron incubar durante 3 horas a TA. Después del período de incubación, se realizó un lavado con PBS al 1 %, Tween X-100 y se realizaron dos lavados con PBS (150 µl/pocillo). Se usó un anticuerpo IgG, IgM o IgA anti-humano conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (respectivamente diluida 1:3.000, 1:1.000 y 1:3.000) en PBS al 1 %, BSA, Tween X-100 al 0,05 %, para demostrar que había tenido lugar la reacción entre el antígeno y el anticuerpo. A continuación, se incubó el anticuerpo (50 µl/pocillo) durante 3 horas a TA con agitación. Al término de la incubación, tras tres lavados como se ha descrito anteriormente, se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina (fosfato de *p*-nitrofenilo) a los pocillos y, en presencia de la enzima, generó un producto amarillo medible por técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 405 nm; siendo su cantidad proporcional al título de los anticuerpos unidos. Los resultados del ensayo se expresaron como el porcentaje de positividad, que se calcula dividiendo la absorbancia de cada muestra de suero entre la absorbancia de una muestra de suero positivo, cuyo valor se fijó arbitrariamente en 100.

25 Mediante este método, se ensayaron las muestras de suero de 104 pacientes con AR, 97 sujetos voluntarios sanos (SSN) y 194 controles de la enfermedad (lupus eritematoso sistémico, esclerodermia sistémica, síndrome de Sjogren, crioglobulinemia mixta, artritis soriásica, espondilitis anquilosante, polimialgia reumática y mononucleosis infecciosa) usando el péptido de fórmula (V).

30 Considerando cada resultado que era superior al percentil 97,5 del grupo de control normal como positivo, se encontraron anticuerpos IgG anti-CP del péptido de fórmula (V) en 67/104 (64 %), IgM en 48/104 (46 %) e IgA en 41/104 (40 %) de las muestras de suero de los pacientes con AR, y en menos del 5 % de los sujetos sanos normales y los controles de enfermedad.

#### Ejemplo 3. Especificidad de los péptidos con respecto a otras enfermedades autoinmunes

35 La Fig. 2 muestra la distribución de ACPA detectada con VCP2 en 100 AR, 100 SSN y 206 controles de la enfermedad (espondilitis anquilosante, EA; mononucleosis infecciosa, MI; crioglobulinemia mixta, CM; polimialgia reumática, PMR; artritis soriásica, AS; síndrome de Sjogren, SSj; lupus eritematoso sistémico, LES; esclerosis sistémica, ES; artritis indiferenciada, AI). Se ensayaron las muestras de suero mediante ELISA usando el método descrito en el Ejemplo 2. Los resultados demuestran la alta especificidad de VCP2 en la detección de ACPA en los pacientes con AR. Por otra parte, no se detectaron anticuerpos en los controles de la enfermedad y, en particular, en MI y LES, en contraste con los resultados descritos en Incapera *et al.* [*Clin Exp Rheumatol* 1998, 16, 289], que publicaron la detección de IgG con la secuencia no desiminada EBNA2 (354-373) en los sueros con MI y LES.

45 Además, la Fig. 3 muestra la correlación entre los anticuerpos anti-CCP y anti-VCP2. Se analizaron 100 sueros con AR con el ensayo de CCP2 y con VCP2 usando el método descrito en el Ejemplo 2. Los resultados muestran la correlación significativa ( $p < 0,0001$ ) entre las dos poblaciones de anticuerpos que demuestran que los anticuerpos anti-VCP2 son ACPA y que son, por lo tanto, específicos de la AR y no de otras enfermedades autoinmunes.

#### Ejemplo 4. ELISA para la comparación de anticuerpos anti-CP de fórmula (V) y anticuerpos anti-CP de fórmula (VI)

Se evaluó por ELISA la capacidad para reconocer anticuerpos específicos en pacientes con AR mediante MAP de fórmula (V), en comparación con la MAP de fórmula (VI).

55 Se diluyeron la MAP de fórmula (V) y la MAP de fórmula (VI) respectivamente a una concentración de 20 µg/ml y 5 µg/ml en PBS, se cargaron en los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno (50 µl/pocillo) y se dejaron durante la noche a +4 °C. Al finalizar el período de recubrimiento, se trataron los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con BSA al 3 % en PBS. A continuación, se cargaron las muestras de suero de los pacientes (diluidas 1:200 en un tampón constituido por BSA al 1 %, Tween X-100 al 0,05 % en PBS) sobre la placa (50 µl/pocillo) y se dejaron incubar durante 3 horas a TA. Después del período de incubación, se realizó un lavado con PBS al 1 %, Tween X-100 y se realizaron dos lavados con PBS (150 µl/pocillo). Se incubó un anticuerpo IgG anti-humano conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (50 µl/pocillo), diluida 1:3.000 en PBS al 1 %, BSA, Tween X-100 al 0,05 %, durante 3 horas a TA con agitación. Al término de la incubación, tras tres lavados como se ha descrito anteriormente, se añadió fosfato de *p*-nitrofenilo a los pocillos y, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados del ensayo se expresaron como el porcentaje de positividad, que se calcula

dividiendo la absorbancia de cada muestra de suero entre la absorbancia de una muestra de suero positivo, cuyo valor se fijó arbitrariamente en 100

5 Mediante este método, se ensayaron las muestras de suero de 100 pacientes con AR. Considerando cada resultado que era superior al percentil 97,5 del grupo de control normal como positivo, se encontraron MAP anti-CP de anticuerpos de fórmula (VI) en el 47 % de la cohorte de AR, y MAP anti-CP de anticuerpos de fórmula (V) en el 64 %. Por lo tanto, el uso de MAP anti-CP de anticuerpos de fórmula (V) condujo a una mayor sensibilidad manteniendo la misma especificidad del 95 %.

10 Ejemplo 5. Purificación de anticuerpos anti-CP y usos de los mismos

Los anticuerpos anti-CP se pueden purificar de suero de pacientes con AR por medio de procedimientos de cromatografía de afinidad.

15 Se conjugó un péptido citrulinado o MAP de acuerdo con la presente invención a sefarsosa activada con CNBr de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Se precipitaron las inmunoglobulinas totales en los sueros que contenían anticuerpos anti-CP con sulfato de amonio saturado al 50 %. Se disolvieron los precipitados en tampón fosfato (pH 7,4) y se sometieron a diálisis durante la noche contra PBS. Se aplicaron preparaciones de inmunoglobulina enriquecidas a la columna, y se recogió el flujo a través para su posterior análisis. Se lavó bien la columna con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 150 mM (pH 7,2), y se eluyeron los anticuerpos unidos a la columna con tampón de glicina 0,1 M (pH 2,8) (0,5 ml/fracción), se neutralizaron inmediatamente con 50 µl de Tris 1 M (pH 8,0), y se sometieron a diálisis durante la noche contra PBS. Se ensayó por ELISA el contenido de anticuerpos anti-CP de los eluatos y del flujo a través.

25 Dichos anticuerpos purificados se pueden usar como controles en ensayos en fase sólida usando antígenos citrulinados.

30 Además, se ensayaron por ELISA cuatro preparaciones de anticuerpos anti-VCP2 de 4 sueros con AR diferentes en VCP2, EBNA2 no desiminado (338-358) y una MAP de control. IgG anti-VCP2 muestra una reactividad muy alta con VCP2, la MAP derivada de EBNA2 citrulinado (338-358), y no se une a la arginina que contiene EBNA2 (338-358) ni a la MAP de control (Fig. 4).

Ejemplo 6. Papel del número y de la posición de las citrulinas

35 Se estudió el papel del número y de la posición de las citrulinas de la secuencia de EBNA-2(338-358) en la detección de anticuerpos específicos en los sueros con AR por medio de diferentes péptidos citrulinados (Tabla 1).

Tabla 1:

Nombre	Secuencia	Sueros positivos en AR	Sueros positivos en NHS
EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRGRGRGK	3/24	0/23
[Cit <sup>341</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSCitGQSRGRGRGRGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 28	4/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGRGRGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 4	9/24	1/23
[Cit <sup>347</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGcitGRGRGRGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 5	6/24	1/23
[Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRCitGRGRGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 6	9/24	1/23
[Cit <sup>351</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRCitGRGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 7	6/24	1/23
[Cit <sup>353</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRGRCitGRGK SEC ID N <sup>o</sup> 8	6/24	0/23
[Cit <sup>355</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRGRGRCitGK SEC ID N <sup>o</sup> 9	3/24	2/23

[Cit <sup>341</sup> ,Cit <sup>345</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSCitGQSCitGRGRGRGRGRGKG SEC ID Nº 10	12/24	0/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>347</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGCitGRGRGRGRGKG SEC ID Nº 11	10/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGCitGRGRGRGKG SEC ID Nº 12	15/24	0/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>351</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGRGCitGRGRGKG SEC ID Nº 13	12/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>353</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGRGRGCitGRGKG SEC ID Nº 14	6/24	2/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>355</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGRGRGRGCitGKG SEC ID Nº 15	11/24	0/23
[Cit <sup>341</sup> ,Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSCitGQSRGRGRGCitGRGRGKG SEC ID Nº 16	6/24	0/23
[Cit <sup>347</sup> ,Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGCitGRGCitGRGRGKG SEC ID Nº 17	5/24	1/23
[Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>351</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGCitGCitGRGRGKG SEC ID Nº 18	15/24	2/23
[Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>353</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRGCitGCitGRGKG SEC ID Nº 19	12/24	0/23
[Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>355</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSRGRGRGCitGRGCitGKG SEC ID Nº 20	9/24	0/23
[Cit <sup>341</sup> ,Cit <sup>355</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSCitGQSRGRGRGRGRGCitGKG SEC ID Nº 21	8/24	1/23
[Cit <sup>341</sup> ,Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSCitGQSCitGRGCitGRGRGRGKG SEC ID Nº 22	12/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>347</sup> ,Cit <sup>349</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGCitGCitGRGRGRGKG SEC ID Nº 23	9/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>351</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGCitGCitGRGRGKG SEC ID Nº 24	8/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>353</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGCitGRGCitGRGKG SEC ID Nº 25	10/24	1/23
[Cit <sup>345</sup> ,Cit <sup>349</sup> ,Cit <sup>355</sup> ]EBNA2(338-358)	GQSRGQSCitGRGCitGRGRGCitGKG SEC ID Nº 26	8/24	0/23

5 Se ensayaron muestras de suero de 24 pacientes con AR y 23 sujetos sanos normales (SSN) mediante ELISA usando el método descrito en el Ejemplo 2. Considerando cada resultado que era superior al percentil 97,5 del grupo de control normal como positivo, se encontró que la sensibilidad del ensayo aumenta de acuerdo con el número de citrulinadas y depende de sus posiciones dentro de la secuencia. En detalle, la secuencia no desaminada de EBNA-2(338-358) no reconoce los anticuerpos IgG en un número relevante de sueros con AR (teniendo en cuenta el resultado relevante cuando el número de pacientes AR positivos es superior al 25 % de la población total con AR). Este resultado está en línea con el estado de la técnica en el campo del diagnóstico de la AR, en el que se sabe que los anticuerpos se dirigen contra secuencias citrulinadas. La introducción de un solo resto de citrulina en EBNA-2 (338-358) demuestra que las posiciones 345 y 349 son importantes para el reconocimiento, ya que los péptidos con cualquiera de las posiciones citrulinadas muestran un aumento del porcentaje de sueros AR positivos. Se cree que estas dos posiciones se refieren a dos regiones antigénicas diferentes.

10 La introducción de dos restos de citrulina muestra que el péptido [Cit<sup>345</sup>,Cit<sup>349</sup>]EBNA2(338-358) es el péptido dicitrulinado más activo y selectivo. Este resultado confirma que las posiciones 345 y 349 son importantes para el reconocimiento. Cabe señalar que el péptido [Cit<sup>349</sup>,Cit<sup>351</sup>] también es muy activo. Sin embargo, es menos específico y selectivo.

Por otra parte, los datos obtenidos para EBNA-2(338-358) tricitrulinado muestran que el péptido [Cit<sup>341</sup>,Cit<sup>345</sup>,Cit<sup>349</sup>]EBNA2(338-358) es el péptido más activo de esta serie. Este resultado confirma todavía más que las posiciones 341, 345 y 349 son importantes para el reconocimiento. Se cree que se identificaron dos epítomos: uno en las repeticiones Gly-Cit y el otro en las repeticiones Gly-Gln-Ser-Cit.

#### Ejemplo 7. Propiedades de diagnóstico de un ELISA basado en el uso simultáneo de la MAP de fórmula (V) y de la MAP de fórmula (VI)

Para obtener un inmunoensayo altamente sensible, se dejó adsorber una mezcla equimolar de MAP de fórmula (V) y MAP de fórmula (VI) a placas de microtitulación de 96 pocillos durante 4 h a TA. A continuación, se realizó el ensayo como se ha descrito en el Ejemplo 2. Usando la MAP de fórmula (V) y la MAP de fórmula (VI) como agentes de recubrimiento, se pueden encontrar anticuerpos en el 68 % de los pacientes con AR. El uso combinado del péptido MAP citrulinado de fórmula (V) y MAP citrulinado de fórmula (VI) mejora los rendimientos del diagnóstico de los ensayos basados en un solo péptido, lo que lleva a un ensayo de diagnóstico muy sensible para la AR.

De hecho, en una población de 79 pacientes con AR ensayada en cuanto a la MAP peptídica citrulinada anti-CCP2, anti-CCP3 y anti-viral de fórmula (V) y (VI), los autores encontraron que 44/79 (56 %) son anti-CCP2 positivos, 48/79 (61 %) son anti-CCP3 positivos, 49/79 (62 %) reaccionan con el péptido de fórmula (VI) y 41/79 (52 %) reaccionan con el péptido de fórmula (V). Cabe mencionar que 7/79 (9 %) de los sueros anti-CCP2 y anti-CCP3 negativos son positivos para el péptido de fórmula (VI); 2/79 (3 %) de los sueros anti-CCP2 y anti-CCP3 negativos son positivos para el péptido de fórmula (V); 1/79 (1 %) de los sueros anti-CCP2 y anti-CCP3 negativos es positivo para ambos péptidos de fórmula (V) y fórmula (VI). Por lo tanto, la fórmula (V) y (VI) permite detectar anticuerpos en un subgrupo de pacientes con AR anti-CCP negativos (Figura 1).

Comparando los resultados obtenidos con MAP de fórmula (V) y MAP de fórmula (VI), se encontró que la mayoría de los sueros con AR contienen anticuerpos que reaccionan con ambas MAP. Sin embargo, el 15 % de los sueros con AR contiene anticuerpos que reaccionan con una cualquiera de las dos MAP desiminadas de fórmula (V) y (VI), lo que sugiere que las dos poblaciones de anticuerpos se solapan pero son diferentes.

#### Respuesta de los linfocitos T

Los inventores también han encontrado que los péptidos citrulinados de la invención son capaces de reconocer específicamente no solo anticuerpos anti-CP como se los descritos anteriormente, sino también linfocitos T específicos de péptidos citrulinados. Los linfocitos T específicos de los péptidos citrulinados son característicos de algunas enfermedades autoinmunes en las que hay una respuesta inmune mediada por células hacia los antígenos citrulinados. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple (EM), se ha demostrado la existencia de linfocitos T específicos de la proteína básica de la mielina desiminada (MBP) [L. R. Tranquill *et al.*, *Mult. Scler.* 2000, 6, 220].

Por lo tanto, los péptidos sintéticos citrulinados de la invención, tanto en forma lineal como en forma de MAP, se pueden usar como antígenos para la detección de linfocitos T específicos de antígenos citrulinados.

El tipo de ensayo comúnmente usado para detectar linfocitos T específicos de antígeno es el ensayo de proliferación en el que los leucocitos de sangre periférica de un paciente por examinar se cultivan junto con dosis graduadas del antígeno, en este caso, un péptido sintético citrulinado como se ha descrito anteriormente. Si se han encontrado previamente en el paciente péptidos citrulinados y tiene un número suficiente de linfocitos T específicos de los mismos, se logra la proliferación en presencia de este antígeno.

Como era de esperar, en el ensayo, es necesario introducir una sustancia capaz de inducir la proliferación de todos los linfocitos T (un mitógeno) como control positivo, así como algunos antígenos contra los que se supone que el paciente no ha sido inmunizado, como un control negativo.

Los péptidos citrulinados de la invención, en particular en forma de MAP, son antígenos óptimos para este tipo de ensayo. De hecho, se sabe que la estructura polimérica de las MAP facilita su procesamiento y presentación a los linfocitos T.

Luego, los linfocitos T específicos del antígeno se pueden caracterizar morfológica y funcionalmente, por ejemplo, se pueden analizar por citofluorometría para la expresión de moléculas superficiales y la producción de citoquinas.

#### Uso terapéutico

Finalmente, los péptidos citrulinados de la invención, tanto en forma lineal como en forma de MAP, también se pueden usar como moduladores de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes, por ejemplo, en la AR. Los péptidos sintéticos citrulinados de la invención se pueden usar para el tratamiento de pacientes afectados por la AR, EM u otras enfermedades autoinmunes en las que se haya demostrado la existencia de una respuesta inmune mediada por células hacia antígenos desiminados.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

20 <400> 10

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

25 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> péptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de citrulina

<400> 11

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

45 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> péptido sintético

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)

ES 2 535 530 T3

<223> resto de citrulina

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
5 <222> (12)..(12)  
<223> resto de citrulina

<400> 12

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Arg  
1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
10 20

<210> 13  
<211> 21  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> resto de citrulina

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (14)..(14)  
<223> resto de citrulina

30 <400> 13

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Xaa Gly Arg  
1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
20

<210> 14  
35 <211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> péptido sintético

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
45 <223> resto de citrulina

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
50 <223> resto de citrulina

<400> 14

ES 2 535 530 T3

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Xaa

1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
20

5 <210> 15  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido sintético

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> resto de citrulina

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18)..(18)  
<223> resto de citrulina

20 <400> 15

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
1 5 10 15

Gly Xaa Gly Lys Gly  
20

25 <210> 16  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> péptido sintético

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> resto de citrulina

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (14)..(14)  
<223> resto de citrulina

<400> 16

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Xaa Gly Arg  
1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
20

45 <210> 17

ES 2 535 530 T3

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> péptido sintético

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de citrulina

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina

<400> 17

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

20

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> péptido sintético

30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina

40

<400> 18

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Xaa Gly Xaa Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

45

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> péptido sintético

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina

ES 2 535 530 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> resto de citrulina  
 5  
 <400> 19  
  
 Gln Ser Arg Gln Ser Arg Gln Arg Gln Arg Gln Xaa Gln Xaa  
 1 5 10 15  
  
 Gln Arg Gln Lys Gln  
 20  
  
 10 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de citrulina  
  
 <400> 20  
  
 Gln Ser Arg Gln Ser Arg Gln Arg Gln Arg Gln Xaa Gln Arg  
 1 5 10 15  
  
 Gln Xaa Gln Lys Gln  
 20  
  
 30 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de citrulina  
  
 50 <400> 21

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Xaa Gly Lys Gly

20

5 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

25 <400> 22

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

30 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> péptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de citrulina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

<400> 23

ES 2 535 530 T3

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

5 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina

<400> 24

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Xaa Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

30 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> péptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> resto de citrulina

<400> 25

ES 2 535 530 T3

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Xaa  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

5 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de citrulina

<400> 26

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Xaa Gly Lys Gly  
 20

30 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> péptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de arginina o citrulina

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de arginina o citrulina

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> resto de arginina o citrulina

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de arginina o citrulina

20 <400> 27

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa  
 1 5 10 15

Gly Xaa Gly Lys Gly  
 20

25 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> péptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina

<400> 28

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toscana Biomarkers srl PRATESI, Federico MIGLIORINI, Paola

45 <120> PÉPTIDOS CITRULINADOS VIRALES Y USOS DE LOS MISMOS

<130> PCT 110438

<150> EP09176776.4  
 <151> 23-11-2009

50 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(22)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(26)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (28)..(28)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(30)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (32)..(32)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 35 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (34)..(34)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 40 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (36)..(36)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (42)..(42)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (46)..(46)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (53)..(53)  
 <223> resto de arginina o citrulina  
 <400> 1  
 60

ES 2 535 530 T3

Gly Pro Pro Trp Trp Pro Pro Ile Cys Asp Pro Pro Gln Pro Ser Lys  
 1 5 10 15

Thr Gln Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa  
 20 25 30

Gly Xaa Gly Xaa Gly Lys Gly Lys Ser Xaa Asp Lys Gln Xaa Lys Pro  
 35 40 45

Gly Gly Pro Trp Xaa Pro Glu Pro  
 50 55

- 5 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> péptido sintético
- 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> resto de citrulina
- 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina
- 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de citrulina
- 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina
- 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina
- 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> resto de citrulina
- 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de citrulina
- <400> 2

ES 2 535 530 T3

Gly Gln Ser Xaa Gly Gln Ser Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa  
 1 5 10 15

Gly Xaa Gly Lys Gly  
 20

5 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> resto de citrulina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> resto de citrulina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> resto de citrulina

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> resto de citrulina

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> resto de citrulina

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> resto de citrulina

<400> 3

Gly Gly Asp Asn His Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Xaa Pro Gly Ala Pro Gly  
 20

45 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> péptido sintético

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> resto de arginina o citrulina

ES 2 535 530 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> resto de citrulina  
 5  
 <400> 4  
  
 Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Gly Arg Gly Lys Gly  
 20  
 10  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> resto de citrulina  
 20  
 <400> 5  
  
 Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Gly Arg Gly Lys Gly  
 20  
 25  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> resto de citrulina  
 40  
 <400> 6  
  
 Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Xaa Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Gly Arg Gly Lys Gly  
 20  
 45  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 530 T3

<220>  
 <223> péptido sintético

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> resto de citrulina

10

<400> 7

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Xaa Gly Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

15

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> péptido sintético

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> resto de citrulina

<400> 8

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Xaa  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Lys Gly  
 20

30

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> péptido sintético

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(18)  
 <223> resto de citrulina

<400> 9

Gly Gln Ser Arg Gly Gln Ser Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg  
 1 5 10 15

45

Gly Xaa Gly Lys Gly  
 20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antigénicamente eficaz que consiste, desde el extremo amino al extremo carboxílico, en la secuencia de aminoácidos:

5 G Q S X<sub>1</sub>, G Q S X<sub>2</sub> G X<sub>3</sub> G X<sub>4</sub> G X<sub>5</sub> G X<sub>6</sub> G X<sub>7</sub> G K G (aminoácido 19 a aminoácido 39 de la SEC ID N° 1), en la que los aminoácidos X<sub>1</sub>-X<sub>7</sub> se seleccionan de manera independiente entre un resto de arginina o un resto de citrulina, y al menos uno de X<sub>1</sub>-X<sub>7</sub> es un resto de citrulina, o un fragmento funcional del mismo, siendo capaz dicho péptido antigénicamente eficaz y fragmento del mismo de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

2. El péptido de la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de aminoácidos G Q S Cit G Q S Cit G X<sub>3</sub> G Cit G X<sub>5</sub> G X<sub>6</sub> G X<sub>7</sub> G K G (SEC ID N° 27), en la que los aminoácidos X<sub>3</sub>-X<sub>7</sub> se seleccionan, de manera independiente, entre un resto de arginina o un resto de citrulina.

15 3. El péptido de las reivindicaciones 1 o 2 que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de GQSRGQSCitGRGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 4), GQSRGQSRGRGCitGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 6), GQSRGQSCitGRGCitGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 12), GQSCitGQSCitGRGCitGRGRGRGRGKG (SEC ID N° 22) o G Q S Cit G Q S Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G K G (SEC ID N° 2), en las que Cit es un resto de citrulina o un fragmento funcional del mismo, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es de forma lineal.

25 5. Un péptido ramificado multimérico que consiste en múltiples péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. El péptido ramificado multimérico de la reivindicación 5 que comprende cuatro copias idénticas del péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3.

30 7. El péptido ramificado multimérico de la reivindicación 6, que es (G Q S Cit G Q S Cit G K G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



35 en el que Cit es un resto de citrulina.

40 8. Un método para el diagnóstico de la artritis reumatoide en un sujeto, que comprende la etapa de detectar anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmune en una muestra biológica obtenida del sujeto mediante:

- la reacción, en condiciones adecuadas, de dicha muestra biológica con al menos un péptido o péptido ramificado multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para producir un complejo;
- la detección del complejo.

45 9. El método de la reivindicación 8, en el que la muestra biológica se hace reaccionar con al menos un péptido o péptido ramificado multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un péptido ramificado multimérico que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



50 en la que: Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la muestra biológica se hace reaccionar con el péptido ramificado multimérico que consiste en la secuencia (G Q S Cit G Q S Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G K G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



5 en la que Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide, y el péptido ramificado multimérico que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



10 en la que Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

15 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que es un ensayo inmunológico.

20 12. Un kit para el diagnóstico de la artritis reumatoide que comprende al menos un péptido o un péptido ramificado multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un fragmento funcional del mismo, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

25 13. El kit de la reivindicación 12, que comprende además el péptido ramificado multimérico que comprende la secuencia (G G D N H G Cit G Cit G Cit G Cit G Cit G G G Cit P G A P G)<sub>4</sub> K<sub>2</sub> K β-Alanina:



30 en la que Cit = citrulina o un fragmento funcional de la misma, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

35 14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable y eficaz del péptido o del péptido ramificado multimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un fragmento funcional del mismo, siendo dicho fragmento capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y/o linfocitos T específicos de la artritis reumatoide.

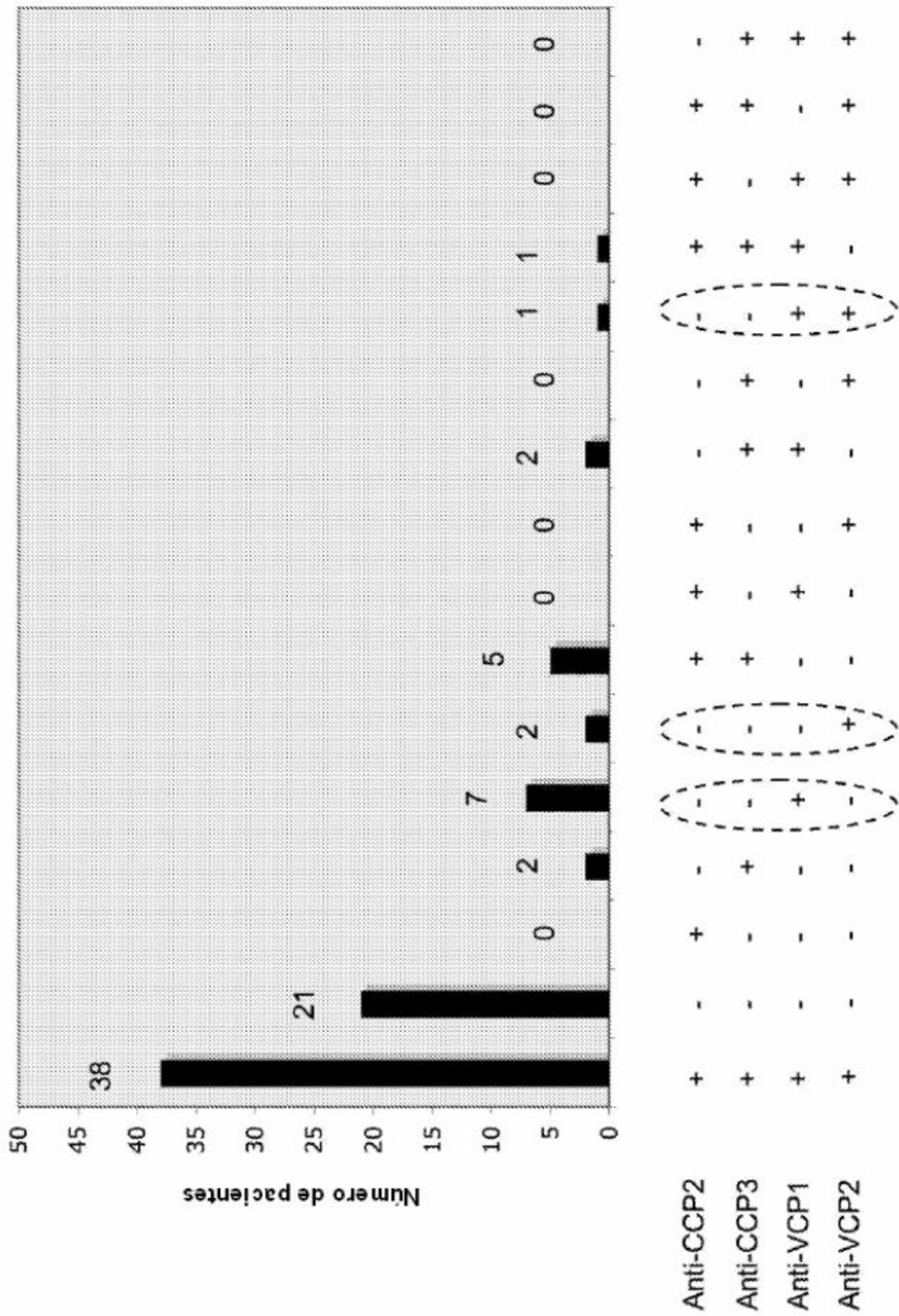


Fig. 1

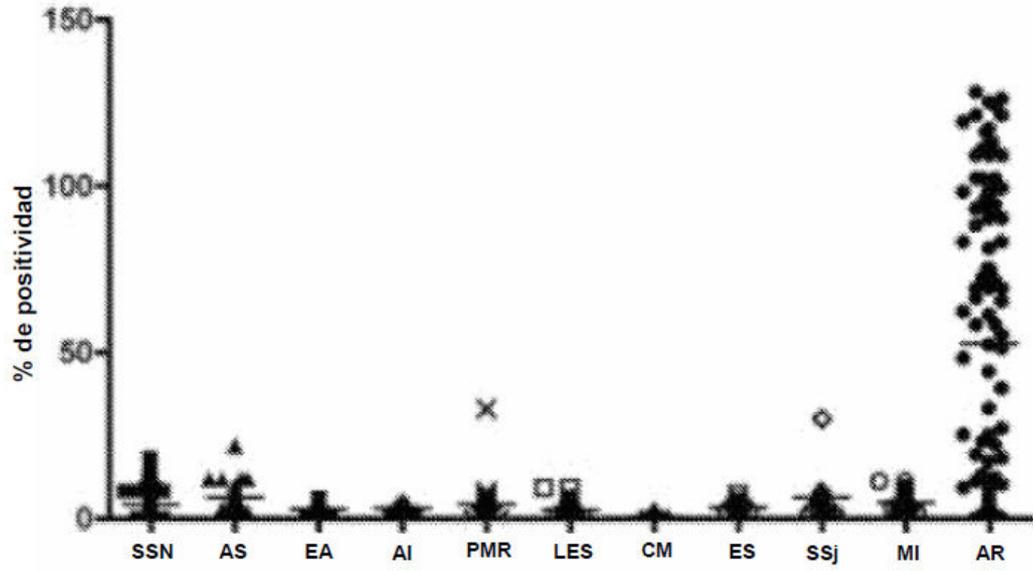


Fig. 2

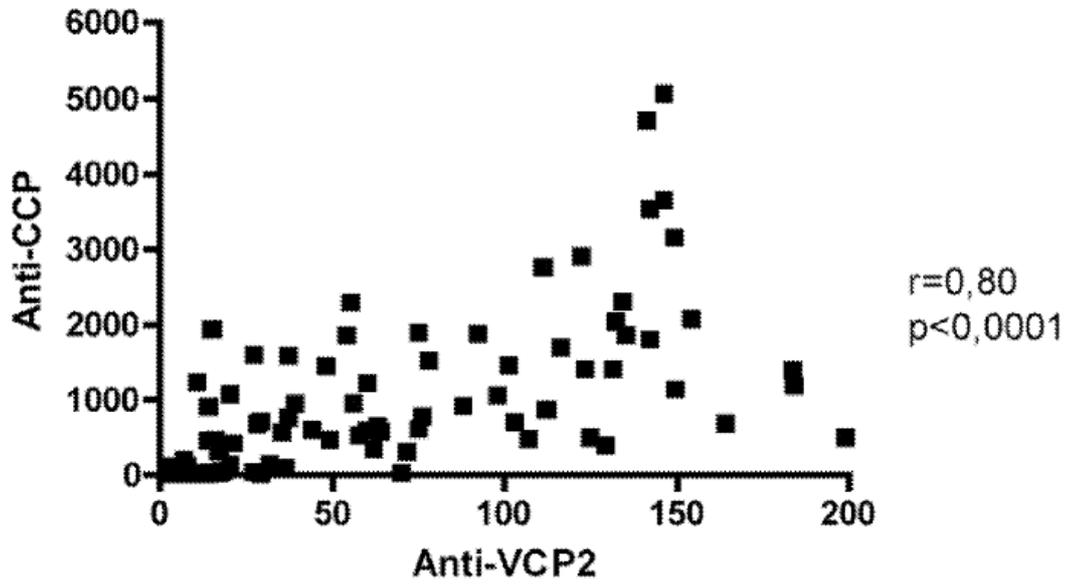


Fig. 3

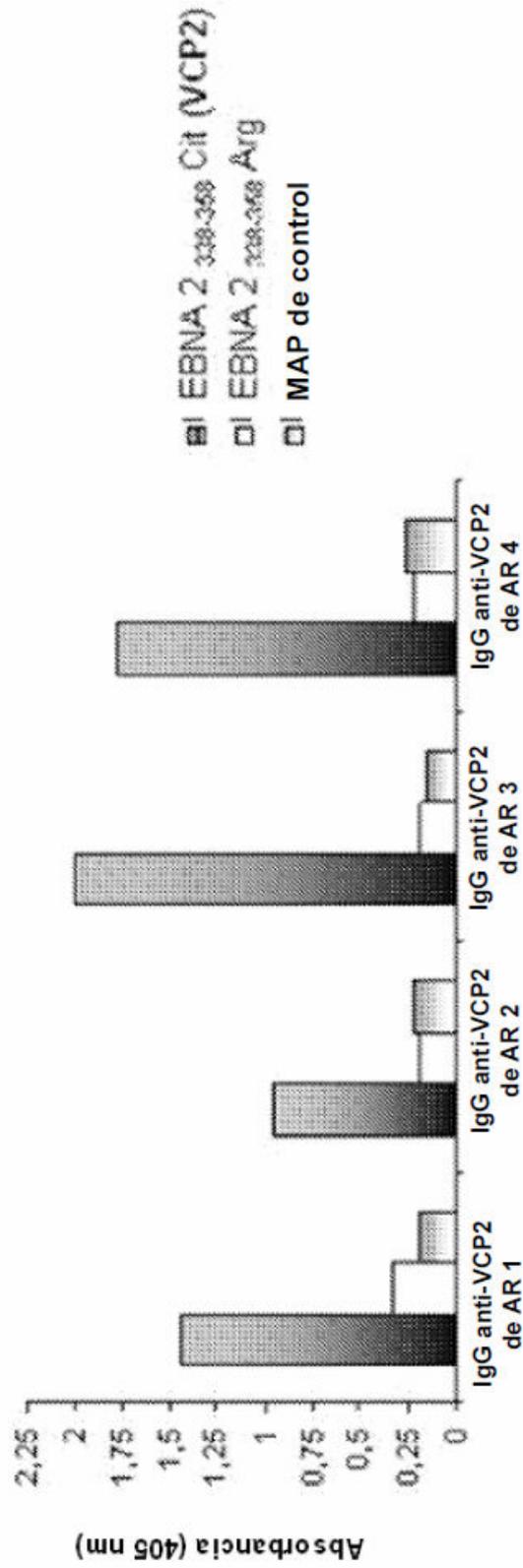


Fig. 4