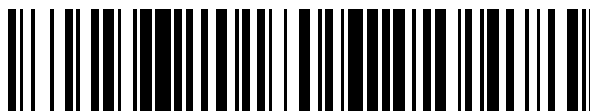


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 255**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11728634 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2588495**

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

30 Prioridad:

02.07.2010 EP 10168270

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

29.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PRATESI, FEDERICO;
ALCARO, MARIA CLAUDIA;
CHELLI, MARIO;
LOLLI, FRANCESCO;
PAOLINI, ILARIA;
PAPINI, ANNA MARIA;
ROVERO, PAOLO y
MIGLIORINI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 539 255 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 de histonas y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos sintéticos citrulinados derivados de la proteína histona H4 y a su uso en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, en particular artritis reumatoide (AR).

10 **Estado de la técnica**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad articular inflamatoria caracterizada por un mecanismo autoinmunitario medida por los linfocitos tanto T como B. En los fluidos biológicos de los pacientes con AR se pueden detectar diferentes autoanticuerpos. Algunos de estos autoanticuerpos se pueden usar para el diagnóstico y seguimiento de la AR.

El biomarcador de la AR mejor conocido es el factor reumatoide (FR), una clase de anticuerpos IgG o IgM dirigidos contra la región Fc del isotipo IgG de inmunoglobulinas. No obstante, el FR no es un marcador específico de la AR ya que también se puede encontrar otras afecciones patológicas y en individuos sanos ancianos. El descubrimiento de la implicación de los epítomos citrulinados (cit) en la AR usando los anticuerpos anti-factor perinuclear y anti-queratina reforzaron la identificación de nuevos biomarcadores altamente específicos de la AR. Se han usado diferentes proteínas y péptidos citrulinados para desarrollar ensayos diagnósticos específicos y sensibles, lo que permite reconocer los autoanticuerpos frente a la AR, lo que generalmente se denominan anticuerpos anti-péptido citrulinado (PC) (AAPC) [documentos US20020143143, US20070087380, EP1946109, US20070148704, WO2009007846, WO2009000077, WO2007017556, EP1456662, WO1999028344, WO2008132264]. Entre todas las proteínas asociadas con la AR, las siguientes secuencias citrulinadas se han usado en ensayos diagnósticos: fibrina [C. Masson-Bessière et al. J. Immunol. 2001, 166, 4177], colágeno II [H. Burkhardt et al. Eur. J. Immunol. 2005, 35, 1643], vimentina [E.R. Vossenaar et al. Arthritis Rheum. 2004, 50, 3485], filagrina [documentos US20090028885, US7445903, US6890720] y proteínas virales [C. Anzilotti et al. J. Rheumatol. 2006, 33, 647; WO2004087747].

La sensibilidad de las pruebas se incrementó mediante el uso de péptidos citrulinados cíclicos sintéticos derivado de filagrina (PCC) [G.A. Schellekens et al. J. Clin. Invest. 1998, 101, 273] [documento WO1998022503] caracterizados por una estructura que expone óptimamente las citrulinas a la unión del anticuerpo. En la actualidad se han desarrollado tres generaciones de pruebas con PCC: PCC1 (sensibilidad 68 %, especificidad 98 %) [G.A. Schellekens et al. Arthritis Rheum. 2000, 43, 155], PCC2 (intervalo de sensibilidad 39-94 %, intervalo de especificidad 81-100 %) [J. Avouac et al. Ann. Rheum. Dis. 2006, 65, 845], y PCC3 (intervalo de sensibilidad 51-83 %, intervalo de especificidad 93-98 %) [L. Lutteri et al. Clin. Chim. Acta 2007, 386, 76]. Estos ELISA diagnósticos de la AR están disponibles comercialmente (Euro-Diagnostica, Arnhem, Países Bajos; Axis-Shield, Dundee, Scotland; INOVA, San Diego, EE.UU.).

Recientemente, el uso de secuencias citrulinadas derivadas de las proteínas EBNA-1 (VCP1) y EBNA-2 (VCP2) del virus de Epstein-Barr ha permitido el desarrollo de ensayos diagnósticos caracterizados por especificidades y sensibilidades comparables a las indicadas para las pruebas PCC2 y PCC3 [F. Pratesi et al. Arthritis Rheum. 2006, 54, 733; C. Anzilotti et al. J. Rheumatol. 2006, 33, 647; documento WO2004087747; documento EP091767764]. Es interesante el hecho de que la comparación de los rendimientos de las pruebas basadas en PCC2, PCC3, PCC1, y VCP2 sugirió que secuencias citrulinadas diferentes pueden detectar diferentes subgrupos de anticuerpos anti-PC en el mismo grupo de pacientes. Estos resultados confirmaron el papel importante de la secuencia de aminoácidos que rodea a los residuos de citrulina en la formación de epítomos anti-PC, en contraste con el hipotético papel excluido de la unidad XG o XnonG (X= citrulina) [documento EP1693673].

Otra clase de proteínas asociadas con otras enfermedades autoinmunitarias pero todavía no directamente relacionadas con el diagnóstico de la AR está representada por las proteínas histonas. Las histonas son constituyentes de los nucleosomas y se clasifican en seis clases: H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5. Las secuencias derivadas de H1 y H2B se usaron para detectar autoanticuerpos en el lupus eritematoso sistémico, la AR y la esclerosis sistémica [documento WO03044054]. Incluso si se sabe que estas proteínas están desmanadas de forma nativa y generalmente modificadas [K. Arita et al. PNAS 2006, 103, 5291; A.J.W. Zendman et al. Anal. Biochem. 2007, 369, 232], hasta ahora ninguna secuencia citrulinada de histona se ha asociado con la AR. No obstante se han descrito micromatrices basadas en el uso de histonas modificadas (es decir, fosforiladas, metiladas, acetiladas y ubiquitinadas), pero no citrulinadas, para la detección de anticuerpos [documento WO07132177]. Osborne et al. [Biochemistry, 2007, 46(46), 13370-13381] describen la síntesis química de fragmento de la histona H4 (1 – 21) que tiene un residuo de citrulina en las posiciones 17 y 29 para estudios enzimáticos.

Wysocka et al. [Frontiers in Bioscience, 2006, 11, 344-355] divulgan que a histona H4 está citrulinada in vivo únicamente en la posición 3 y que tiene residuos de citrulina en las posiciones 3, 17 y 19, obtenible mediante desaminación *in vitro*.

Hagiwara et al. [Biochemistry, 2005, 44(15), 5827-5834] divulgan que el fragmento (1-23) y (1-5) de la histona H4 que tienen Cit en la posición 3.

5 El documento WO 20091147201 divulga agentes de unión, tales como anticuerpos que se unen específicamente a péptidos citrulinados, incluida la histona H4 citrulinada enzimáticamente. Estos agentes de unión se usan en la prevención o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en particular la AR.

10 El documento WO2010/117694 divulga una secuencia que es una combinación de fragmentos de la histona H4 que comprenden un residuo de citrulina en las posiciones 23 y 95.

10 El documento WO 2004/078098 divulga un péptido no relacionado con las proteínas histonas y que consiste principalmente en residuos de citrulina.

15 Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere a péptidos sintéticos citrulinados derivados de la proteína histona del núcleo H4 y a su uso en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, en particular AR. La investigación del papel de la desaminación de las histonas en la AR condujo a la definición de una serie de secuencias citrulinadas derivadas de H4. Dichas secuencias pueden reconocer autoanticuerpos específicos de la AR. Los péptidos citrulinados de acuerdo con la invención derivan de la secuencia de aminoácidos de la H4 humana, en particular de la secuencia comprendida entre el aminoácido (aa) 1 al aa 50 (Swiss-Prot P62805 aa 2 al aa 51) de dicha secuencia.

Por tanto, es un objeto de la invención un péptido caracterizado por

25 - ser antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y
 - consistir en, desde el extremo amino al carboxílico, de la secuencia de aminoácidos: SGX₁GKGGKGLGKGGAKX₂HX₃K(aa 1 al aa 20 de la SEC ID N° 1), G AKX₂HX₃KVLX₄DNIQGITKPAL (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1) o K PAIX₅X₆LAX₇X₈GGVKX₉ISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1) en las que
 30 los aminoácidos X₁-X₉ se seleccionan de forma independiente de un resto de arginina o un resto de citrulina y al menos dos de X₁-X₉ son un resto de citrulina, o un fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina, siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de la artritis reumatoide.

35 Se demostró que los péptidos como se describen en la invención y que poseen al menos dos restos de citrulina eran muy adecuados para el diagnóstico específico de la AR. Las secuencias peptídicas más cortas que comprenden al menos siete restos de aa y derivadas de H4(1-50) (Fórmula I) son de particular interés.

40 Preferentemente, el péptido es un fragmento funcional de la SEC ID N° 1 y consiste en la secuencia seleccionada del grupo de G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en el que X₂-X₄ son restos de citrulina (Cit)), K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en el que X₅-X₉ son restos de citrulina (Cit)) o un fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de la artritis reumatoide.

45 Preferentemente, el péptido como se ha indicado anteriormente está en forma lineal o en forma de péptido multimérico ramificado o de otro complejo conjugado.

El péptido multimérico ramificado consiste preferentemente en:

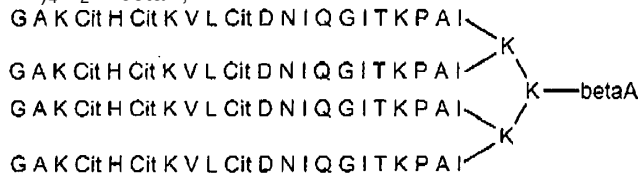
50 - una estructura del núcleo MAP;
 - un péptido lineal que tiene una secuencia de aminoácidos de fórmulas III, IV, y/o V unidas a través de un enlace químico a cada uno de los restos de aminoácidos de la estructura del núcleo MAP, en el que los péptidos lineales son iguales o diferentes entre sí. De acuerdo con la invención, una estructura del núcleo MAP es:

- detectar el complejo.

Se obtiene una sensibilidad y especificidad más altas cuando los péptidos se usan en forma de MAP o de otro complejo conjugado, en particular en forma de MAP tetravalentes.

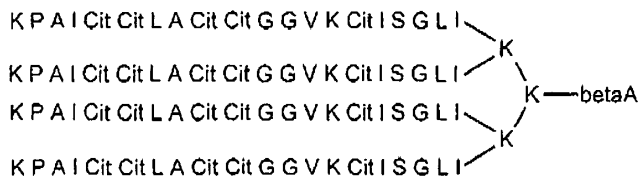
5 Se descubrió que un método basado en el uso de un MAP de péptidos citrulinados de fórmula VI, VII, o VIII da la sensibilidad y especificidad más altas en una prueba para detectar anticuerpos específicos de la AR. Por tanto, preferentemente, la muestra biológica se hace reaccionar con al menos un péptido de la invención de fórmula III, IV, V, VI, VII o VIII. En otra realización preferida, un método se basa en el uso combinado de péptidos de las fórmulas III, IV y V y en el uso combinado de MAP de fórmula VII y MAP de fórmula VIII para detectar anticuerpos específicos de AR.

Preferentemente, la muestra biológica se hace reaccionar con el péptido que comprende la secuencia (G A K Cit H Cit K V L Cit D N I (G I T K P A I)₄ K₂ K betaA,



y el péptido que comprende la secuencia

20 (K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I)₄ K₂ K betaA,

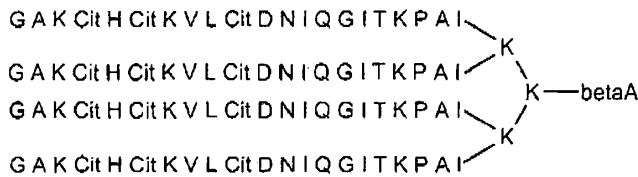


en la que Cit es un resto de citrulina y betaA es un resto de beta-alanina.

25 Todavía preferentemente, el método es un ensayo inmunológico.

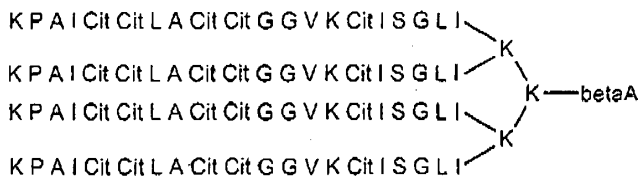
Es otro objeto de la invención un kit para el diagnóstico de artritis reumatoide que comprende al menos un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina, siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de artritis reumatoide, en el que dicho kit detecta anticuerpos específicos de artritis reumatoide.

Preferentemente, el kit comprende el péptido que comprende la secuencia (G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I)₄ K₂ K betaA,



y el péptido que comprende la secuencia

40 (K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit E S G L I)₄ K₂ K betaA,



en la que Cit es un resto de citrulina y betaA es un resto de beta-alanina.

45 En particular, el kit permite la detección de anticuerpos anti-PC en fluidos biológicos. El kit comprende uno de los

péptidos citrulinados como se ha definido anteriormente o un fragmento funcional de los mismos y al menos un reactivo adicional. Preferentemente, el reactivo adicional es una inmunoglobulina anti-humana conjugada con una enzima capaz de reaccionar con un sustrato cromogénico. El kit puede también comprender instrucciones de uso.

- 5 Es otro objeto de la invención un anticuerpo dirigido contra el péptido como se ha descrito anteriormente para su uso en ensayos diagnósticos para la artritis reumatoide.

10 Para aplicaciones diagnósticas, los péptidos como se describen en la invención se pueden usar para detectar anticuerpos específicos en fluidos biológicos de pacientes con AR. En otra realización preferida, los péptidos se pueden usar para detectar linfocitos B y T autorreactivos circulantes e infiltrantes en el tejido.

En otra realización de la presente invención, los péptidos como se ha divulgado anteriormente, unidos a resinas adecuadas, se pueden usar para eliminar anticuerpos.

15 Un anticuerpo presente en los fluidos biológicos de pacientes autoinmunitarios se unirá a los péptidos de la invención. Como se ha indicado anteriormente, los péptidos citrulinados de la invención, tanto en forma lineal como en forma MAP, son particularmente adecuados para su uso como antígenos en un ensayo para detectar la presencia y/o medir los niveles de anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmunitaria, tales como anticuerpos anti-PC, en una muestra de un fluido biológico.

20 Con el fin de realizar el ensayo, los péptidos se pueden adsorber o unir de forma covalente o modificar con un vehículo para unirse a un soporte sólido (por ejemplo, chips, microesferas, oro, poliestireno, vasos reactores o pocillos, placa de microtitulación). En una primera etapa del método, la muestra del fluido biológico que se va a analizar se pone en contacto y se incuba con el péptido de la invención que puede estar unido al soporte sólido. Los anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmunitaria, tales como anticuerpos anti-PC, que posiblemente están presentes en la muestra están, por tanto, unidos específicamente al péptido de la invención, de modo que se produce un complejo antígeno/anticuerpo. Los anticuerpos anti-PC que se van a detectar en el inmunoensayo son inmunoglobulinas IgG, IgA o IgM. La evaluación de la presencia y la cantidad del complejo antígeno/anticuerpo se puede realizar con un biosensor espectroscópico, piezoeléctrico o electroquímico.

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

35 Se descubrió que un método basado en el uso de un MAP de péptidos citrulinados de fórmula VI, VII, o VIII da la sensibilidad y especificidad más altas en una prueba para detectar anticuerpos específicos de la AR. Por tanto, preferentemente, la muestra biológica se hace reaccionar con al menos un péptido de la invención de fórmula III, IV, V, VI, VII o VIII. En otra realización preferida, un método se basa en el uso combinado de péptidos de las fórmulas III, IV y V y en el uso combinado de MAP de fórmula VII y MAP de fórmula VIII para detectar anticuerpos específicos de AR.

45 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 enfermedad autoinmune. En particular, el péptido o el fragmento funcional del mismo es capaz de unirse específicamente a anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmune.

Descripción detallada de la invención

50 La invención se ilustrará a continuación por medio de ejemplos no limitantes en referencia a las siguientes figuras.

Figura 1. Anticuerpos anti-PC purificados a partir de dos sueros representativos diferentes de pacientes con AR usando el péptido [Cit¹⁷,Cit¹⁹,Cit²³]H4(14-34) (es decir del aa 12 al aa 34 de la SEC ID N° 1, en la que X₂-X₄ son restos de citrulina (Cit), fórmula IV), la secuencia no citrulinada H4(14-34) y un MAP control no relacionado de secuencia (EEEEDEMGFGLFD)₄-K₂-K-betaA (SEC ID N° 2). La purificación de los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (AAPC) se logró usando el péptido citrulinado [Cit¹⁷,Cit¹⁹,Cit²³]H4(14-34) (fórmula IV). Por el contrario, la secuencia no citrulinada H4(14-34) y el MAP control no detectó ningún anticuerpo IG en los dos sueros de AR.

60 Figura 2. Anticuerpos anti-PC purificados a partir de dos sueros representativos diferentes de pacientes con AR usando el péptido [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (es decir del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1, en la que X₅-X₉ son restos de citrulina (Cit), fórmula IV), la secuencia no citrulinada H4(31-50) y un MAP control no relacionado de secuencia (EEEEDEMGFGLFD)₄-K₂-K-betaA (SEC ID N° 2). La purificación de los AAPC se logró usando el péptido citrulinado [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (fórmula V). Por el contrario, la secuencia no citrulinada H4(31-50) y el MAP control no detectó ningún anticuerpo IG en los dos sueros de AR.

65 Figura 3. Media del título de anticuerpos para la AR y los grupos SSN frente a secuencias citrulinadas de forma diferente de H4(14-34).

Figura 4. Media del título de anticuerpos para la AR y los grupos SSN frente a secuencias citrulinadas de forma

diferente de H4(31-50).

Figura 5. Media del título de anticuerpos para la AR y los grupos SSN frente a péptidos solapantes citrulinados comprendidos en la H4(1-50).

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1. Síntesis peptídica

10 Los péptidos se sintetizaron usando una resina Wang precargada con el aminoácido en el extremo C de la
 15 secuencia o con el núcleo de MAP y siguiendo la estrategia del péptido en fase sólida Fmoc/tBu [R.B. Merrifield J.
 Am. Chem. Soc. 1963, 85, 2149; E. Atherton *et al.* Oxford: IRL Press 1989; J.P. Tam Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 1988, 85, 5409]. Las desprotecciones de Fmoc se llevaron a cabo en 20 minutos con 20 % de piperidina en DMF. Se
 realizaron reacciones de acoplamiento tratando la resina durante 45 minutos con una solución 0,5 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.). La escisión del péptido de la resina y la desprotección de las cadenas laterales del
 aminoácido se llevaron a cabo en 3 horas con TFA/tioanisol/etanoditiol/fenol/H₂O (82,5:5:2,5:5:5). Los productos
 brutos se precipitaron con Et₂O frío, se centrifugaron y se liofilizaron. Los péptidos puros se obtuvieron mediante
 HPLC con una pureza >95 % y se caracterizaron mediante espectrometría de masas (ESI-Orbitrap y/o MALDI-TOF).

20 **Ejemplo 2. ELISA para la determinación de anticuerpos anti-péptido citrulinado**

El MAP de los antígenos citrulinados de acuerdo con la invención se diluyó hasta una concentración de 10 µg/ml en
 solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cargaron en los pocillos de una placa de microtitulación de
 poliestireno (50 µl/pocillo). La placa se dejó durante la noche a +4 °C para permitir la interacción entre el péptido y
 25 los plásticos; no obstante, se puede incubar a 37 °C durante 1-2 horas con el mismo resultado. Tras la finalización
 del periodo de recubrimiento, los pocillos que contienen el antígeno, más un número igual de pocillos que se usaron
 como controles, se trataron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con 3 % de seroalbúmina bovina (BSA) en
 PBS. Las muestras de suero de los pacientes (diluidas a 1:200 en un tampón constituido por 1 % de BSA, 0,05 %
 Tween X-100 En PBS) se cargaron después en la placa (50 µl/pocillo) y se dejaron incubar durante 3 horas a TA.
 30 Tras el periodo de incubación, se realizó un lavado con 1 % de PBS Tween X-100 y se realizaron dos lavados con
 PBS (150 µl/pocillo). Se usó un anticuerpo anti-IgG, IgM o IgA humano conjugado con la enzima fosfatasa alcalina
 en 1 % de PBS BSA, 0,05 % de Tween X-100 para mostrar que la reacción de antígeno/anticuerpo se había
 producido. Después, el anticuerpo (50 µl/pocillo) se incubó durante 3 horas a TA con agitación. Tras la finalización
 de la incubación, después de tres lavados como se ha descrito anteriormente, se añadió el sustrato de la fosfatasa
 35 alcalina (fosfato de p-nitrofenilo) a los pocillos y en presencia de la enzima produjo un producto amarillo mensurable
 con técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 405 nm; su cantidad fue proporcional al título de
 anticuerpos unidos. Los resultados del ensayo se expresaron como el porcentaje de positividad, se calcularon
 dividiendo la absorbancia de cada muestra de suero por la absorbancia de una muestra de suero positiva cuyo valor
 se fijó de forma arbitraria en 100.

40 Las muestras de suero de 97 pacientes que sufrían AR y de 34 sujetos sanos normales (SSN) se analizaron
 mediante este método usando el péptido de fórmula III, IV o V.

45 Un resultado que fuera superior al percentil 97,5 del grupo de sueros control normales se define como positivo, los
 datos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de sueros positivos sobre los sueros totales analizados para los péptidos de las fórmulas III, IV y V.

Fórmula	AR (% de sueros positivos)	SSN
III	20/97 (21 %)	2/34
IV	10/97 (10 %)	2/34
V	12/97 (12 %)	2/34

50 Las muestras de suero de 101 pacientes que sufren AR y 48 SSN se analizaron mediante este método usando los
 MAP de las fórmulas VI, VII o VIII.

55 Además, 91 muestras de suero de los controles de la enfermedad distintos a la AR (esclerosis sistémica,
 crioglobulinemia mixta, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante y artritis prostática) se analizaron
 mediante este método usando MAP de las fórmulas VI, VII o VIII, que mostraron las reactividades más interesantes.

Un resultado que fuera superior al percentil 97,5 del grupo de sueros control normales (SSN) se define como
 positivo, los datos se indican en la Tabla 2.

60

Tabla 2. Número de sueros positivos sobre los sueros totales analizados para los péptidos MAP de las fórmulas VI, VII y VIII.

Fórmula	Sueros positivos para la AR	SSN	Est	CM	LES	EA	AP
VI	28/101	2/48	3/7	1/12	6/48	5/12	1/12
VII	65/101	2/48	1/7	0/12	3/48	0/12	0/12
VIII	61/101	1/48	0/7	0/12	1/48	1/12	0/12

*en la que: AR= artritis reumatoide, SSN= sujetos sanos normales, Est= esclerosis sistémica, CM= crioglobulinemia mixta, LES= lupus eritematoso sistémico, EA= espondilitis anquilosante, AP= artritis psoriásica.

5 La sensibilidad y la especificidad globales de los tres ensayos se muestran en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de los ensayos basados en el péptido de las fórmulas VI, VII, VIII.

Fórmula	Sensibilidad	Especificidad**
VI	28 %	85 %
VII	65 %	96 %
VIII	60 %	98 %

**Determinado en las poblaciones de SSN y control de la enfermedad indicadas en la Tabla 2

10 Se realizó un mapeo del epítipo de la proteína H4 completa y los datos mostraron que la parte N-terminal, H4(1-50), que comprende el péptido de fórmula I citrulinado de forma diferente correspondía a la porción antigénica de la molécula. En particular, la porción en el extremo C citrulinada de H4(1-50) es altamente reactiva y los datos indicados en las Tablas 1-3 demuestran que las secuencias de las fórmulas III-VIII se pueden usar para reconocer sueros de AR.

15 Cabe destacar que hasta ahora, las histonas y su citrulinación nunca se han asociado con la AR, mientras que la reactividad hacia los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con LES es bien conocida [documento WO03044054]. Los datos indicados en la Tabla 3 demuestran una sensibilidad y especificidad muy buenas de las secuencias de las fórmulas VII y VIII para la AR. Es muy interesante y sorprendente que ni el MAP de la fórmula VII ni el MAP de la fórmula VIII mostraron una reactividad significativa en la detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con LES. Por tanto, los autores de la presente invención demuestran la correlación inesperada entre las secuencias del péptido citrulinado que comprenden la región H4(1-50) y el reconocimiento específico de autoanticuerpos en sueros de pacientes de AR. Por tanto, dichos péptidos son biomarcadores de la enfermedad.

25 Además, las secuencias objeto de la presente invención no se solapan en ninguna de las proteínas o péptidos ya usados para detectar anticuerpos anti-PC (por ejemplo, fibrina, colágeno II, Vimentina, filagrina, proteínas virales y PCC sintéticos). Esto demuestra el innovador papel de las secuencias peptídicas derivadas de H4(1-50) para reconocer los anticuerpos anti-PC con un 63-67 % de sensibilidad y un 96-97 % de especificidad en el caso de los MAP de las fórmulas VII y VIII.

30 **Ejemplo 3. Propiedades diagnósticas de un ELISA basado en el uso contemporáneo del MAP de fórmula VII y del MAP de fórmula VIII.**

35 Para lograr un inmunoensayo altamente sensible se dejó que una mezcla equimolar de MAP de fórmula VII y MAP de fórmula VIII adsorbiera en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 4 horas a temperatura ambiente. Después, la prueba se realizó como se describe en el ejemplo 2. El análisis de una segunda población independiente de 147 pacientes de AR analizados para detectar anticuerpos frente a los péptidos MPA de fórmulas VII y VIII, los autores descubrieron que:

- 40 - 87/147 (59 %) pacientes de AR reconocían el péptido de fórmula VII;
 - 89/147 (61 %) pacientes de AR reconocían el péptido de fórmula VIII;

Analizando con mayor detalle esta población de pacientes con AR positivos al péptido de fórmula VII o al péptido de fórmula VIII los autores descubrieron que:

- 45 - 71/147 (48 %) reaccionaban con los péptidos tanto de la fórmula VII como VIII;
 - 16/147 (11 %) sueros eran positivos solo al péptido de la fórmula VII;
 - 18/147 (12 %) sueros eran positivos solo al péptido de la fórmula VIII;

Por tanto, el uso combinado del péptido citrulinado MAP de fórmula VII y el MAP citrulinado de fórmula VIII mejora los rendimientos diagnósticos de la prueba con respecto a los ensayos basados en un solo péptido. El uso combinado conduce a un ensayo diagnóstico de alta sensibilidad en la AR (105/147-71,5 % sueros positivos en la AR) dado que las dos poblaciones de anticuerpos identificadas en los sueros de AR se solapan pero son diferentes.

Ejemplo 4. Purificación de anticuerpos anti-péptidos citrulinados y usos de los mismos

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

Un péptido citrulinado o MAP de acuerdo con la presente invención se conjugó con sefarsa activada-CNBr de acuerdo con procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica. Las inmunoglobulinas totales de sueros que contienen anticuerpos anti-PC se precipitaron con 50 % de sulfato amónico saturado; los precipitados se disolvieron en tampón fosfato (pH 7,4) y se dializaron durante la noche contra PBS. Las preparaciones enriquecidas con inmunoglobulina se aplicaron a la columna y se recogió el flujo continuo para su posterior análisis. La columna se lavó extensamente con Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 150 mM (pH 7,2) y los anticuerpos unidos a la columna se eluyeron mediante tampón 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 dializaron durante la noche contra PBS. El contenido del anticuerpo anti-PC en los eluatos y el flujo continuo se analizó mediante ELISA (Fig. 1 y 2).

La Figura 1 muestra que la purificación de los AAPC se logró usando el péptido citrulinado [Cit¹⁷,Cit¹⁹,Cit²³]H4(14-34) (fórmula IV). Por el contrario, la secuencia no citrulinada H4(14-34) y el MAP control no detectó ningún anticuerpo IG en los dos sueros de AR. La Figura 2 muestra que la purificación de los AAPC también se logró usando el péptido citrulinado [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (fórmula V). Por el contrario, la secuencia no citrulinada H4(31-50) y el MAP control no detectó ningún anticuerpo IG en los dos sueros de AR.

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

Ejemplo 5. Papel del número y posición de las citrulinas.

El papel del número y de la posición de las citrulinas dentro de la secuencia H4(1-50) en la detección de anticuerpos específicos en sueros de AR se investigó por medio de péptidos citrulinados de forma diferente (Figuras 3-4).

Tabla 4: Péptidos citrulinados

Nombre de la secuencia	Secuencia
H4(14-34)	GAKRHRKVLRLDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₂ -X ₄ son restos de arginina)
[Cit ¹⁷]H4(14-34)	GAKCitHRKVLRLDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₂ es Cit y X ₃ -X ₄ son restos de arginina)
[Cit ¹⁹]H4(14-34)	GAKRHCitKVLRLDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₃ es Cit y X ₂ y X ₄ son restos de arginina)
[Cit ²³]H4(14-34)	GAKRHRKVLRLCitDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₄ es Cit y X ₂ y X ₃ son restos de arginina)
[Cit ¹⁷ ,Cit ¹⁹]H4(14-34)	GAKCitHCitKVLRLDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₂ y X ₃ son Cit y X ₄ es arginina)
[Cit ¹⁷ ,Cit ²³]H4(14-34)	GAKCitHRKVLRLCitDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₂ y X ₄ son Cit y X ₃ es arginina)
[Cit ¹⁹ ,Cit ²³]H4(14-34)	GAKRHCitKVLRLCitDNIQGITKPAI (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X ₃ y X ₄ son Cit y X ₂ es arginina)
[Cit ¹⁷ ,Cit ¹⁹ ,Cit ²³]H4(14-34)	GAKCitHCitKVLRLCitDNIQGITKPAI, fórmula IV
H4(31-50)	KPAIRRLARRGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ -X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁵]H4(31-50)	KPAICitRLARRGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ es Cit y X ₆ -X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁶]H4(31-50)	KPAIRCitLARRGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₆ es Cit y X ₅ y X ₇ -X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁹]H4(31-50)	KPAIRRLACitRGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₇ es Cit y X ₅ -X ₆ y X ₈ -X ₉ son restos de arginina)
[Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAIRRLARCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₈ es Cit y X ₅ -X ₇ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAIRRLARRGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₉ es Cit y X ₅ -X ₈ son restos de arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAICitRLARCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la

Nombre de la secuencia	Secuencia
	que X ₅ y X ₈ son Cit y X ₆ -X ₇ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁶ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAIRCitLARCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₆ y X ₈ son Cit y X ₅ , X ₇ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAIRRLACitCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₇ y X ₈ son Cit y X ₅ -X ₆ y X ₉ son restos de arginina)
(Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵)H4(31-50)	KPAIRRLARCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₈ y X ₉ son Cit y X ₅ -X ₇ son restos de arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAICitCitLARCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ X ₆ y X ₈ son Cit y X ₇ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAICitRLACitCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ , X ₇ y X ₈ son Cit y X ₆ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAICitRLARCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ , X ₈ y X ₉ son Cit y X ₆ y X ₇ son restos de arginina)
[Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAIRCitLACitCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₆ , X ₇ y X ₈ son Cit y X ₅ y X ₉ son restos de arginina)
[Cit ³⁶ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAIRCitLARCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₆ , X ₈ y X ₉ son Cit y X ₅ y X ₇ son restos de arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(31-50)	KPAICitCitLACitCitGGVKRISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ -X ₈ es Cit y X ₉ es arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAICitCitLARCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ -X ₆ y X ₈ -X ₉ es Cit y X ₇ es arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAICitRLACitCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₅ , X ₇ y X ₈ -X ₉ son Cit y X ₆ es arginina)
[Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAIRCitLACitCitGGVKCitISGLI (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X ₆ -X ₉ es Cit y X ₅ es arginina)
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAICitCitLACitCitGGVKCitISGLI, fórmula V
[Cit ³ ,Cit ¹⁷ ,Cit ¹⁹]H4(1-20)	SGCitGKGGKGLGKGGAKCitHCitK, fórmula III
[Cit ²³]H4(19-28)	RKVLCitDNIQG (del aa 19 al aa 28 de la SEC ID N° 1 en la que X ₄ es Cit y X ₃ es arginina)
[Cit ¹⁹ ,Cit ²³ ,Cit ³⁵ ,Cit ³⁶]H4(19-38)	CitKVLCitDNIQGITKPAICitCitLA (del aa 19 al aa 38 de la SEC ID N° 1 en la que X ₃ -X ₆ son Cit)
[Cit ²³ ,Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(22-41)	LCitDNIQGITKPAICitCitLACitCitG (del aa 22 al aa 41 de la SEC ID N° 1 en la que X ₄ -X ₈ son Cit)
[Cit ²³ ,Cit ⁹⁵]H4(19-28)-(91-99)	RKVLCitDNIQGGKRCitTLYG SEC ID N° 3

Las muestras de suero de 14 pacientes de AR y 23 SSN se analizaron mediante ELISA usando el método descrito en el ejemplo 2. Los resultados se analizaron determinando el valor de corte como la DO media de los sueros de SSN más dos desviaciones estándar y después se expresaron como un índice (DO de la muestra/DO del corte). Los resultados son positivos si el índice es superior de 1,0. La media del título de anticuerpos para los grupos de AR y de SSN frente a los péptidos citrulinados de forma diferente H4(14-34) y H4(31-50) se indica en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

5

Para la secuencia H4(14-34) se descubrió que al menos dos citrulinas son necesarias para discriminar entre pacientes de AR y SSN (Figura 3). Como cabía esperar, la H4(14-34) no citrulinada no mostró ninguna reactividad. Además, la introducción de un único resto de citrulina en la H4(14-34) mostró que una arginina desiminada no es suficiente para permitir la detección de AAPC. Este resultado sugiere un papel activo de los aminoácidos que flanquean a la citrulina en el reconocimiento de anticuerpos.

10

Por el contrario, la introducción de dos residuos de citrulina permite la discriminación entre pacientes de AR y SSN.

15

En particular, el péptido [Cit¹⁷,Cit²³]H4(14-34) es el péptido dicitrulinado más activo. Por tanto, para la secuencia de H4(14-34), la presencia de dos citrulinas es el requisito mínimo para el reconocimiento de AAPC en sueros de AR. Cabe destacar que la mejor discriminación entre sueros de AR y de SSN se consigue cuando las tres argininas presentes en la secuencia de H4(14-34) están desiminadas.

20

Los datos indicados en la Figura 4 para H4(31-50) confirmaron que la ausencia de citrulinas no permitía detectar ningún AAPC ni discriminar entre AR y SSN. La introducción de una citrulina mostró una reactividad solo para [Cit⁴⁰]H4(31-50), lo que sugiere un posible papel de la desiminación de la posición 40 en el reconocimiento de AAPC. Entre los péptidos dicitrulinados, [Cit³⁵,Cit⁴⁰]H4(31-50) es la secuencia más reactiva. Este hallazgo demuestra fuertemente el efecto adictivo de dos citrulinas. Los derivados de H4(31-50) que contienen tres o cuatro citrulinas son capaces de discriminar entre sueros de AR y SSN pero son menos preferidos porque no son tan sensibles como [Cit³⁵,Cit⁴⁰]H4(31-50) y [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (fórmula V).

25

Ejemplo 6. Análisis de los determinantes antigénicos.

30

La presencia de los determinantes antigénicos dentro de la secuencia de H4(1-50) se investigó usando péptidos solapantes seleccionados con el fin de contener el número máximo de citrulinas por secuencia (Tabla 5 y Figura 5).

Tabla 5. Péptidos solapantes usados para definir los determinantes antigénicos en H4(1-50).

[Cit ³ ,Cit ¹⁷ ,Cit ¹⁹]H4(1-20)	SGXGKGGKGLGKGGAKXHXX
[Cit ¹⁷ ,Cit ¹⁹ ,Cit ²³]H4(14-34)	GAKXHXXVLXDNIQGITKPAI
[Cit ²³]H4(19-28)	RKVLXDNIQG
[Cit ¹⁹ ,Cit ²³ ,Cit ³⁵ ,Cit ³⁶]H4 (19-38)	XKVLXDNIQGITKPAIXXLA
[Cit ²³ ,Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰]H4(22-41)	LXDNIQGITKPAIXXLAXXG
[Cit ³⁵ ,Cit ³⁶ ,Cit ³⁹ ,Cit ⁴⁰ ,Cit ⁴⁵]H4(31-50)	KPAIXXLAXXGGVKXISGLI
X = Cit	

El estudio se realizó con los péptidos lineales. [Cit³,Cit¹⁷,Cit¹⁹]H4(1-20) (del aa 1 al aa 20 de la SEC ID N° 1 en la que X₁-X₃ son restos de citrulina (Cit), fórmula III), [Cit¹⁷,Cit¹⁹,Cit²³]H4(14-34) (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1 en la que X₂-X₄ son restos de citrulina (Cit), fórmula IV), [Cit²³]H4(19-28) (del aa 19 al aa 28 de la SEC ID N° 1 en la que X₄ es un resto de citrulina), [Cit¹⁹,Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶]H4(19-38) (del aa 19 al aa 38 de la SEC ID N° 1 en la que X₃-X₆ son un resto de citrulina), [Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰]H4(22-41) (del aa 22 al aa 41 de la SEC ID N° 1 en la que X₄-X₈ son un resto de citrulina), [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en la que X₅-X₉ son restos de citrulina (Cit), fórmula V).

Las muestras de suero de 18 pacientes de AR y 23 SSN se analizaron mediante ELISA usando el método descrito en el ejemplo 2. Los resultados se analizaron determinando el valor de corte como la DO media de los sueros de SSN más dos desviaciones estándar y después se expresaron como un índice (DO de la muestra/DO del corte). Los resultados son positivos si el índice es superior a 1,0. La media del título del anticuerpo para los grupos de AR y de SSN frente a los péptidos se indica en la Figura 5.

La discriminación entre los sueros de AR y de SSN se obtuvo con péptidos de las fórmulas III-V, pero no con [Cit¹⁹,Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶]H4(19-38) o [Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰]H4(22-41). Es interesante el hecho de que las secuencias [Cit¹⁹,Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶]H4(19-38) y [Cit²³,Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰]H4(22-41) son menos reactivas, aunque contienen más citrulinas que [Cit³,Cit¹⁷,Cit¹⁹]H4(1-20) y [Cit¹⁷,Cit¹⁹,Cit²³]H4(14-34). Este resultado sugiere la importancia de los aminoácidos que flanquean a los restos de citrulina. El péptido [Cit³⁵,Cit³⁶,Cit³⁹,Cit⁴⁰,Cit⁴⁵]H4(31-50) (fórmula V) mostró la mejor reactividad en esta serie.

En este experimento, el péptido [Cit²³,Cit⁹⁵]H4(19-28)-(91-99), Arg¹⁹-Lys-Val-Leu-Cit-Asp-Asn-Ile-Gln-Gly²⁸-Lys⁹¹-Arg-Gln-Gly-Cit-Thr-Leu-Tyr-Gly⁹⁹ (SEC ID N° 4) se sintetizó y se analizó en el mismo conjunto de sueros para comparar su reactividad con las moléculas objeto de la presente invención y comprendidas en la secuencia H4(1-50). No se observó discriminación significativa entre los sueros de AR y SSN usando [Cit²³,Cit⁹⁵]H4(19-28)-(91-99) o usando el péptido [Cit²³,Cit⁹⁵]H4(19-28)-(91-99). Estos datos sugiere que los determinantes antigénicos en la proteína histona H4 se localizan en la región 1 – 50.

Considerando también los datos indicados en la Tabla 3, se puede postular la hipótesis de que la presencia de los dos dominios antigénicamente diferentes se localiza dentro de H4(1-50) en las regiones 17-23 y 35 – 45.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toscana Biomarkers srl PRATESI, Federico ALCARO, Maria Claudia CHELLI, Mario LOLLI, Francesco PAOLINI, Ilaria PAPINI, Anna Maria ROVERO, Paolo MIGLIORINI, Paola

<120> PÉPTIDOS CITRULINADOS DE HISTONAS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> PCT 112287

<150> EP10168270.6

<151> 02-07-2010

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> resto de arginina o citrulina
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> resto de arginina o citrulina
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> resto de arginina o citrulina
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> resto de arginina o citrulina
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> resto de arginina o citrulina
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> resto de arginina o citrulina
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> resto de arginina o citrulina
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> resto de arginina o citrulina
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> resto de arginina o citrulina
 50
 <400> 1

ES 2 539 255 T3

Ser Gly Xaa Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
 1 5 10 15

Xaa His Xaa Lys Val Leu Xaa Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys Pro
 20 25 30

Ala Ile Xaa Xaa Leu Ala Xaa Xaa Gly Gly Val Lys Xaa Ile Ser Gly
 35 40 45

Leu Ile
 50

5 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 2

Glu Glu Glu Asp Glu Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp Lys Lys Ala
 1 5 10 15

15 <210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 3

Arg Lys Val Leu Cys Ile Thr Asp Asn Ile Gln Gly Lys Arg Gln Gly
 1 5 10 15

25 Cys Ile Thr Thr Leu Tyr Gly
 20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido caracterizado por

- 5 - ser antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de la artritis reumatoide y
- consistir en, desde el extremo amino al carboxílico, la secuencia de aminoácidos:

10 S G X₁ G K G G K G L G K G G A K X₂ H X₃ K (del aa 1 al aa 20 de la SEC ID N° 1), G A K X₂ H X₃ K V L X₄ D N I Q G I T K P A I (del aa 14 al aa 34 de la SEC ID N° 1) o K P A I X₅ X₆ L A X₇ X₈ G G V K X₉ I S G L I (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1) en donde los aminoácidos X₁-X₉ se seleccionan de forma independiente de un resto de arginina o un resto de citrulina y al menos dos de X₁-X₉ son un resto de citrulina, o un fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina, siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de artritis reumatoide.

2. El péptido de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia seleccionada del grupo de G A K Cit H Crt K V L Cit D N I Q G I T K P A I (aa 14 al aa 34 de SEC ID N° 1 en la que X₂-X₄ son restos de citrulina (Cit)), K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I (del aa 31 al aa 50 de la SEC ID N° 1 en donde X₅-X₉ son restos de citrulina (Cit)) o fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina, siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de la artritis reumatoide.

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

4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en forma de péptido multimérico ramificado.

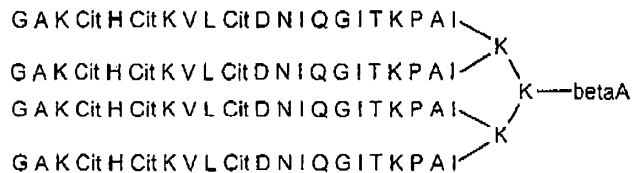
5. El péptido de la reivindicación 4 que comprende cuatro copias idénticas del péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2.

6. El péptido de la reivindicación 5, seleccionado del grupo de:

35 (S G Cit G K G G K G L G K G G A K Cit H Cit K)₄ K₂ K betaA.

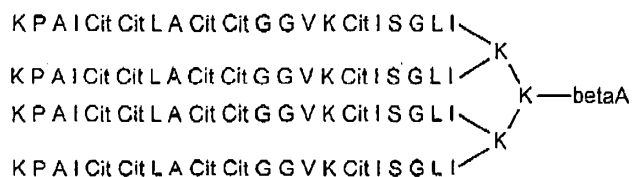


(G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I)₄ K₂ K betaA,



40 o

(K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I)₄ K₂ K betaA,

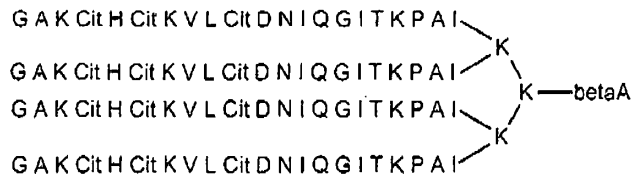


45 en la que Cit es un resto de citrulina y betaA es un resto de beta-alanina.

7. Un método para el diagnóstico de artritis reumatoide en un sujeto, que comprende la etapa de detectar anticuerpos específicos de la artritis reumatoide en una muestra biológica

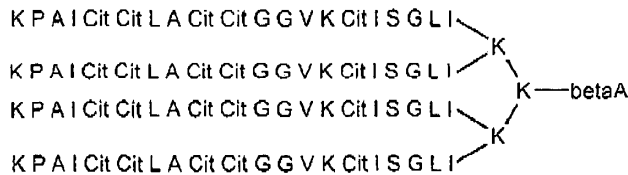
- haciendo reaccionar en las condiciones adecuadas dicha muestra biológica con al menos un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para producir un complejo;
- detectar el complejo.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la muestra biológica se hace reaccionar con el péptido que comprende la secuencia (G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I)₄ K₂ K betaA,



y el péptido que comprende la secuencia

(K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I)₄ K₂ K betaA,

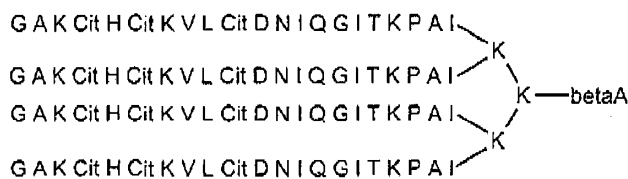


en la que Cit es un resto de citrulina y betaA es un resto de beta-alanina.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 que es un ensayo inmunológico.

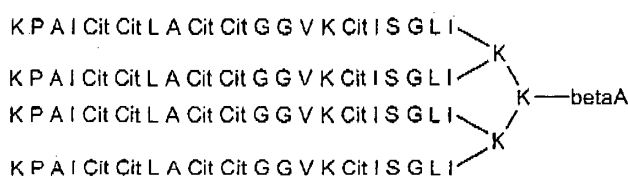
10. Un kit para el diagnóstico de artritis reumatoide que comprende al menos un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un fragmento funcional del mismo que tiene una longitud de al menos 7 aminoácidos y que comprende al menos dos restos de citrulina, siendo dicho fragmento funcional antigénicamente eficaz y capaz de unirse específicamente a los anticuerpos específicos de artritis reumatoide, en donde dicho kit detecta anticuerpos específicos de artritis reumatoide.

11. El kit de la reivindicación 10, que comprende el péptido que comprende la secuencia (G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I)₄ K₂ K betaA,



y el péptido que comprende la secuencia

(K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I)₄ K₂ K betaA,



en la que Cit es un resto de citrulina y betaA es un resto de beta-alanina.

12. Un anticuerpo dirigido contra el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en ensayos diagnósticos para artritis reumatoide.

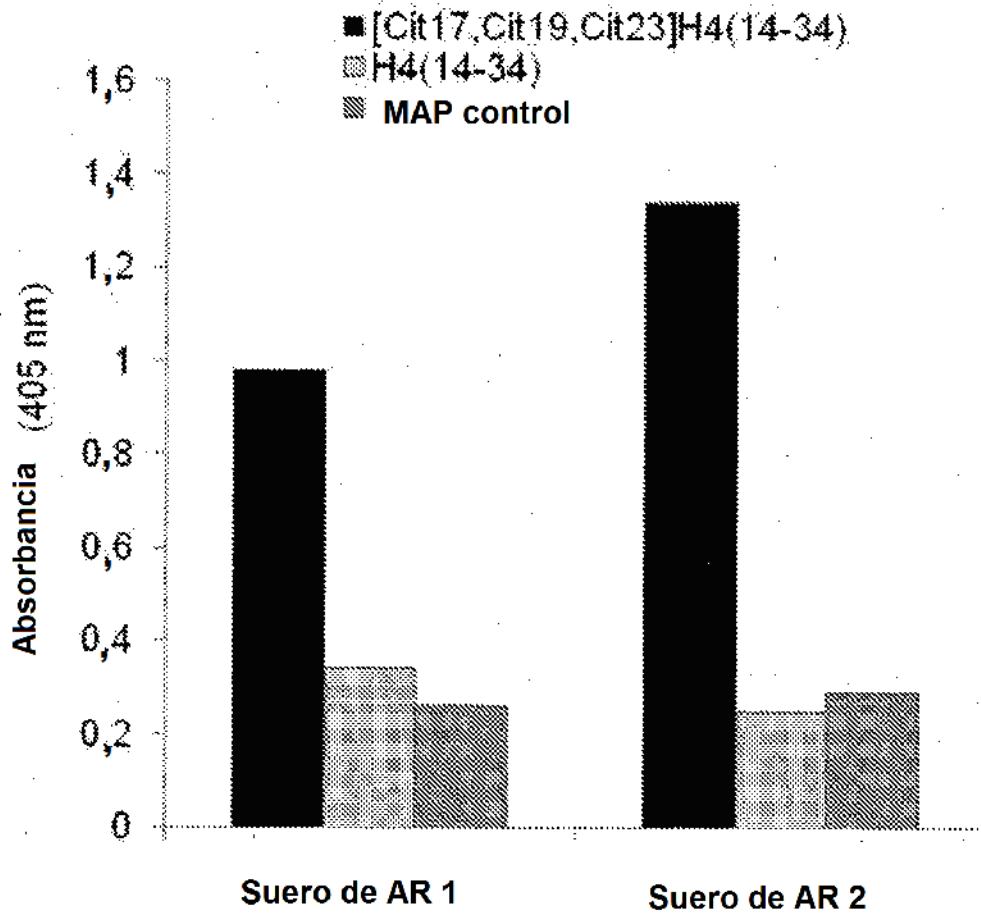


Fig. 1

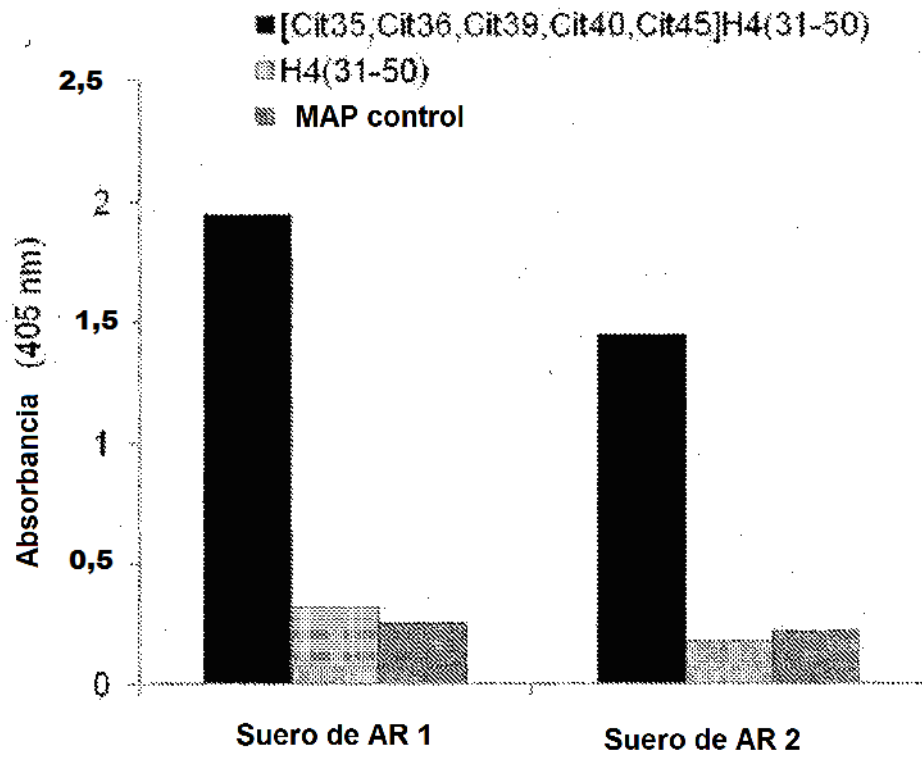


Fig. 2

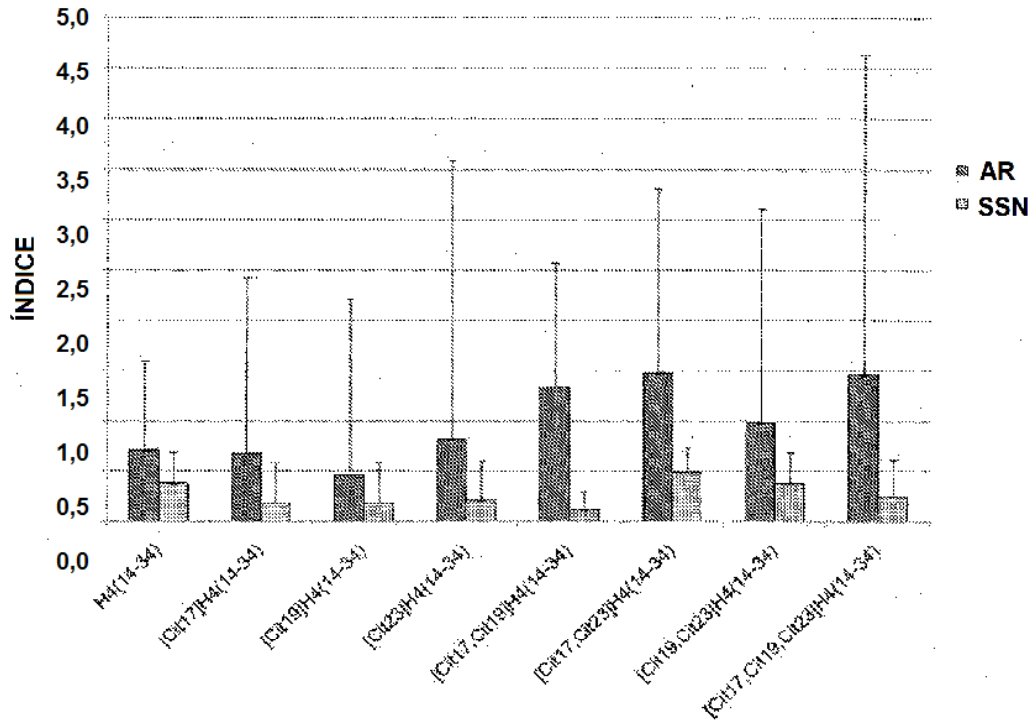


Fig. 3

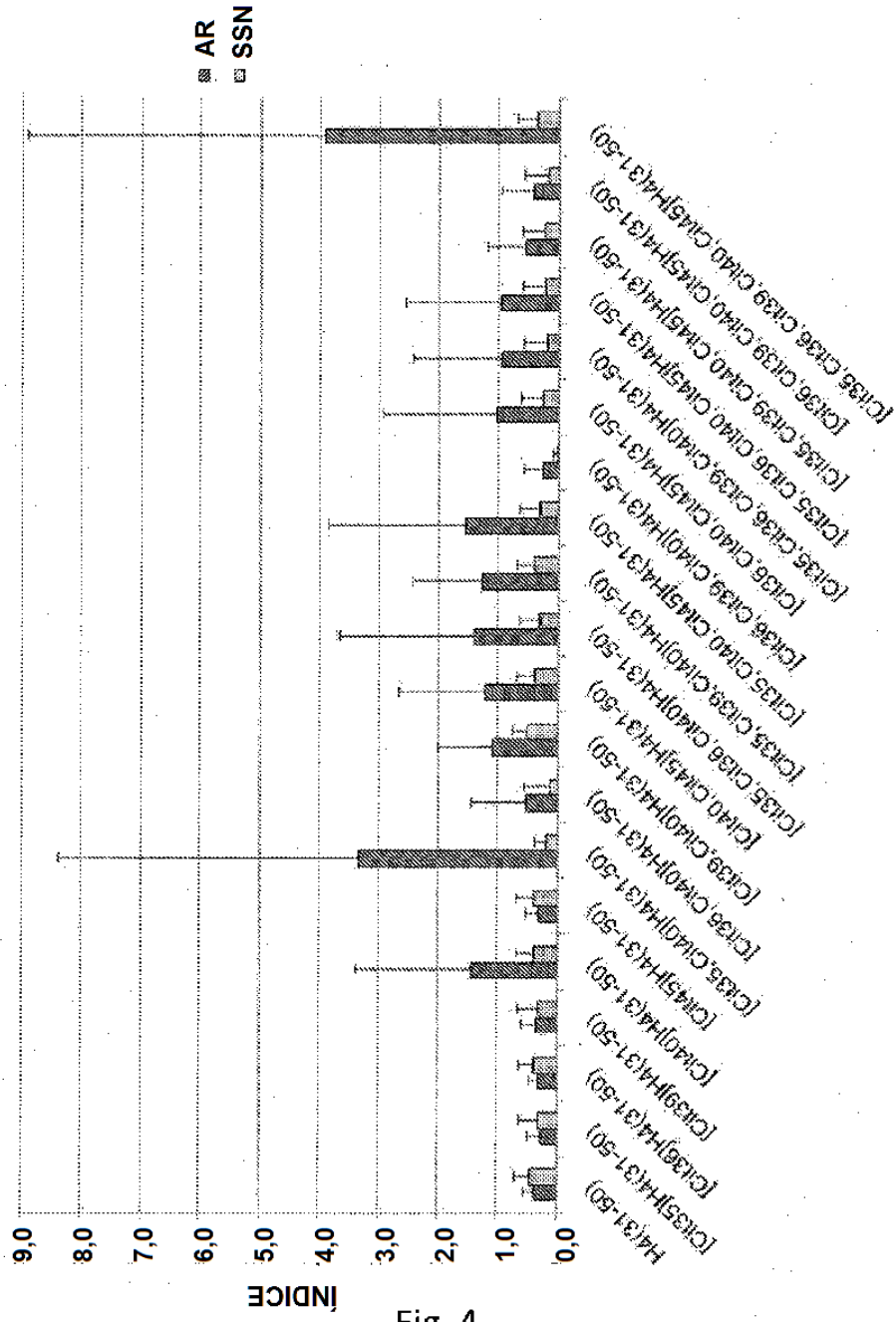


Fig. 4

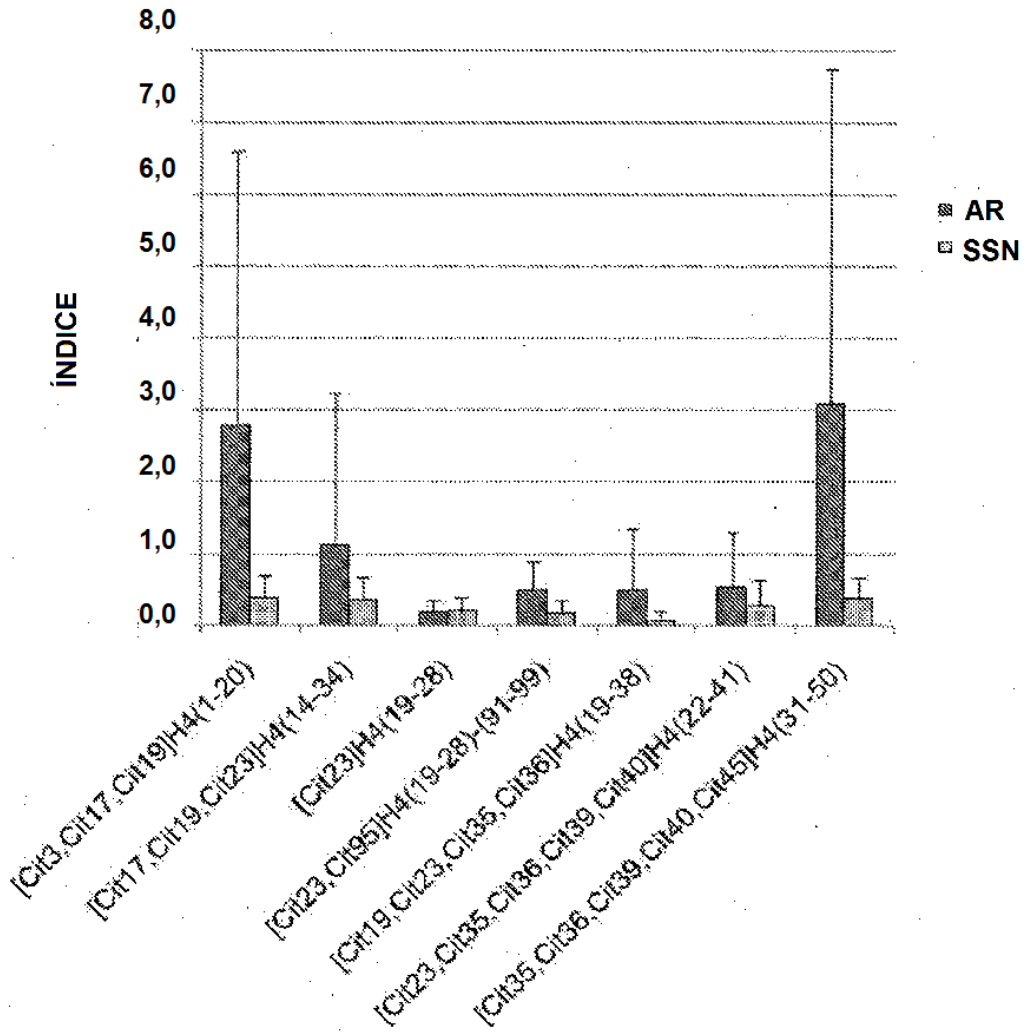


Fig. 5