

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 083**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/EP2010/069431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11070172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10788080 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2509999**

54 Título: **Agentes anti-inflamatorios dirigidos contra epítomos citrulinados**

30 Prioridad:

10.12.2009 EP 09178658

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

20.10.2016

73 Titular/es:

MODIQUEST B.V. (100.0%)

LSP-Oss, Molenweg 79

5349 AC Oss, NL

72 Inventor/es:

RAATS, JOZEF, MARIA, HENDRIK y

CHIRIVI, RENATO, GERARDUS, SILVANO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 587 083 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

Agentes anti-inflamatorios dirigidos contra epítomos citrulinados

Campo de la invención

5 Esta invención se encuentra en el campo de tratar o prevenir la inflamación en seres humanos y animales, y se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos para tratar o prevenir diversas afecciones inflamatorias. En particular, la invención se encuentra en el campo de prevenir o tratar afecciones inflamatorias tales como enfermedades relacionadas con la citrulina, preferiblemente enfermedades inflamatorias, más preferiblemente la artritis inflamatoria tal como la artritis reumatoide. La invención proporciona moléculas de unión específicas tales como anticuerpos dirigidos contra epítomos que contienen citrulina para uso en la terapia y prevención de afecciones inflamatorias tal como la artritis inflamatoria, preferiblemente la artritis reumatoide.

Antecedentes de la invención

15 Las afecciones inflamatorias, ya sean de naturaleza crónica o aguda, representan un problema importante en la industria de la salud. En síntesis, la inflamación crónica se considera que es la inflamación de una duración prolongada (semanas o meses) en la que la inflamación activa, la destrucción de tejidos y los intentos de curación avanzan simultáneamente (Robbins Pathological Base of Disease by R. S. Cotran, V. Kumar y S. L. Robbins, W. B. Saunders Co., pág. 75, 1989). Aunque la inflamación crónica puede seguir un episodio inflamatorio agudo, también puede comenzar como un proceso insidioso que progresa con el tiempo, por ejemplo, como resultado de una infección persistente (p. ej., tuberculosis, sífilis, infección fúngica) que provoca una reacción de hipersensibilidad retardada, exposición prolongada a toxinas endógenas (p. ej., lípidos en plasma elevados) o exógenas (p. ej., sílice, amianto, alquitrán de cigarrillos, suturas quirúrgicas) o reacciones autoinmunes contra los tejidos del propio cuerpo (p. ej., artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis).

25 La artritis inflamatoria es un grave problema de salud en los países desarrollados, especialmente teniendo en cuenta el creciente número de personas de edad avanzada. Por ejemplo, una forma de artritis inflamatoria, la artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria multisistémica crónica, recurrente, que afecta al 1 a 2% de la población del mundo.

30 Aunque muchos órganos pueden verse afectados, la RA es básicamente una forma grave de la sinovitis crónica que a veces conduce a la destrucción y la anquilosis de las articulaciones afectadas (Robbins Pathological Base of Disease by R. S. Cotran, V. Kumar y S. L. Robbins, W. B. Saunders Co., 1989). Patológicamente la enfermedad se caracteriza por un marcado engrosamiento de la membrana sinovial que forma proyecciones vellosas que se extienden en el espacio articular, multiestratificación del revestimiento de sinoviocitos (proliferación de sinoviocitos), infiltración de la membrana sinovial con leucocitos (macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y folículos linfoides; denominada una "sinovitis inflamatoria"), y la deposición de fibrina con necrosis celular dentro de la membrana sinovial. El tejido formado como resultado de este proceso se llama pannus y, finalmente, el pannus crece para llenar el espacio de la articulación. El pannus desarrolla una extensa red de vasos sanguíneos nuevos a través del proceso de la angiogénesis, que es esencial para la evolución de la sinovitis. La liberación de enzimas digestivas (metaloproteinasas de la matriz (p. ej., colagenasa, estromelina)), y otros mediadores del proceso inflamatorio (p. ej., peróxido de hidrógeno, superóxidos, enzimas lisosomales y productos del metabolismo del ácido araquidónico), a partir de las células del tejido pannus conduce a la destrucción progresiva del tejido de cartílago. El pannus invade el cartílago articular, conduciendo a erosiones y a la fragmentación del tejido de cartílago. Finalmente existe una erosión del hueso subcondral con anquilosis fibrosa, y en última instancia, anquilosis ósea, de la articulación afectada.

45 Se cree generalmente que la RA es una enfermedad autoinmune y que muchos estímulos artrogénicos diferentes activan la respuesta inmune en un huésped inmunogenéticamente susceptible. Ambos agentes exógenos infecciosos (virus de Epstein-Barr, virus de la rubéola, citomegalovirus, virus herpes, virus linfotrópico de células T humano, micoplasma y otros) y proteínas endógenas tales como colágeno, proteoglicanos, inmunoglobulinas alteradas y proteínas modificadas post-traducción tales como las proteínas citrulinadas han sido implicados como un agente causante que desencadena una respuesta inmune del huésped inapropiada. Independientemente del agente incitador, la autoinmunidad juega un papel en la progresión de la enfermedad. En particular, el antígeno relevante es ingerido por las células presentadoras de antígeno (macrófagos o células dendríticas en la membrana sinovial), es procesado y es presentado a linfocitos T. Las células T inician una respuesta inmune celular y estimulan la

5 proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. El resultado final es la producción de una respuesta inmune inapropiada excesiva dirigida contra los tejidos del huésped (p. ej., anticuerpos dirigidos contra el colágeno de tipo II, anticuerpos dirigidos contra la porción Fc de IgG autóloga (denominado "Factor Reumatoide")), y anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos citrulinados (anti-CCP). Esto amplía aún más la respuesta inmune y acelera la destrucción del tejido de cartílago. Una vez que se inicia esta cascada, numerosos mediadores de la destrucción del cartílago son responsables de la progresión de la artritis reumatoide.

10 Los anticuerpos anti-CCP mencionados anteriormente han demostrado ser altamente específicos para la RA. Una evidencia reciente demuestra que cada uno de los individuos que es seropositivo para estos anticuerpos o bien ya tiene RA o va a desarrollar esta enfermedad en el futuro. La presencia de anticuerpos anti-CCP (especialmente cuando están presentes altos títulos) es predictiva de la evolución de la enfermedad erosiva (Nijenhuis et al., Clin. Chim. Acta, vol 350, 17-34, 2004). Además, se ha demostrado que anticuerpos anti-CCP se producen localmente en el sitio de la inflamación. La proporción de anticuerpos anti-CCP con respecto al total de IgG encontrada en el material sinovial de pacientes con RA parecía ser significativamente más alta que en el suero de los mismos pacientes (Masson-Bessière et al, Clin Exp Immunol, vol 119, 544-552, 2000) (Reparon-Schuijt et al, Arthritis Rheum, vol 44, 41-47, 2001).

20 La presencia de células plasmáticas productoras de anti-CCP en el sinovio es indicativa de una maduración impulsada por antígenos de las células B específicas para CCP en el sitio de la inflamación. Una vez que se producen los anticuerpos anti-CCP, la formación de complejos inmunes con proteínas citrulinadas en los sinovios puede desencadenar la progresión del proceso inflamatorio. Estos y otros datos apoyan la hipótesis de que los anticuerpos anti-CCP provocaban realmente por lo menos parte de los síntomas de la enfermedad de la RA. Un papel de los anticuerpos anti-CCP en la patogénesis de la RA se apoya en los resultados de los experimentos de agotamiento de linfocitos B en pacientes con RA (Cambridge et al., Arthritis Rheum, vol. 48, 2146-2154, 2003).

25 Personas con artritis reumatoide avanzada tienen una tasa de mortalidad mayor que algunas formas de cáncer, y debido a esto los regímenes de tratamiento se han desplazado hacia un tratamiento precoz agresivo con medicamentos diseñados para reducir la probabilidad de daño articular irreversible. Las recientes recomendaciones de American College of Rheumatology (Arthritis and Rheumatism 39(5): 713-722, 1996) incluyen el inicio temprano de la terapia con fármacos antirreumáticos (DMARD) modificadora de la enfermedad para cualquier paciente con un diagnóstico establecido y síntomas en curso. Fármacos contra el cáncer se han convertido en la terapia de primera línea para la gran mayoría de los pacientes, siendo el fármaco quimioterapéutico metotrexato el fármaco de elección para el 60 a 70% de los reumatólogos. La gravedad de la enfermedad a menudo garantiza un tratamiento semanal indefinido con este medicamento, y en aquellos pacientes cuya enfermedad progresa a pesar de la terapia con metotrexato (más del 50% de los pacientes), se emplean con frecuencia fármacos quimioterapéuticos de segunda línea tales como ciclosporina y azatioprina (solos o en combinación). Otra terapia que se emplea para tratar la RA hace uso del anticuerpo infliximab anti-TNF-ALFA. (Narayanan 2007; Indian.J of Rheum.; Vol 2(1): 8-10).

35 Sigue habiendo una necesidad de compuestos para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias que sean capaces de inhibir la patogénesis de enfermedades inflamatorias, en enfermedades particulares en las que está implicado el sinovio y enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina.

Sumario de la invención

La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

40 La invención proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con un epítomo citrulinado en p15 y/o p17 para uso en el tratamiento o la prevención de la RA.

P15 y P17 se identifican en esta memoria como histona 2A y/o histona 4 humana deiminada PAD4 y/o PAD2 humana, y/o en histona H3 humana deiminada PAD2 humana.

45 La invención también proporciona un método para tratar o prevenir una RA, que comprende la etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición anti-inflamatoria que comprende una molécula de unión específicamente reactiva con un epítomo de citrulina en p15 y/o p17.

Las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables de moléculas de unión específicos reactivas con residuos citrulina. En particular, las moléculas de unión son

específicamente reactivas con epítomos citrulinados en dos polipéptidos identificados en esta memoria, denominados p15 y p17.

La presente descripción también se refiere a polipéptidos y ácidos nucleicos tal como se identifican en esta memoria.

- 5 Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada, figuras y ejemplos. Además, en esta memoria se recogen diversas referencias que describen con más detalle determinados procedimientos, dispositivos o composiciones.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con un epítomo citrulinado en p15 y/o p17 para su uso en el tratamiento o la prevención de la RA.

- 10 La expresión "molécula de unión específica" se utiliza en esta memoria para indicar una molécula, preferiblemente una molécula pequeña, capaz de una unión específica. La unión específica a este respecto pretende dar a entender que la molécula es capaz de unirse a una molécula diana seleccionada, mientras que no se unirá a otra molécula diana no relacionada en las mismas condiciones. Por ejemplo, se dice que una molécula de unión se une específicamente a la albúmina sérica cuando se une a la albúmina sérica y menos o nada en absoluto a otra o, preferiblemente, a cualquier otra proteína que se encuentra en el suero. Moléculas de unión específicas preferidas son anticuerpos.

- 20 La expresión "reacciona específicamente con citrulina" o "reactivo con un epítomo citrulinado" o "reactivo con un epítomo de citrulina" en este contexto significa que la molécula de unión específica o el anticuerpo reacciona con una estructura tal como un péptido que contiene un residuo citrulina, mientras que el anticuerpo reacciona menos o, preferiblemente, no reacciona en absoluto con la misma estructura que contiene un residuo arginina en lugar del residuo citrulina. El término péptido se debe interpretar como una estructura que es capaz de presentar el residuo citrulina en el contexto correcto para la inmunorreactividad con las moléculas de unión específica tal como se describe en esta memoria, preferiblemente en el mismo contexto que aparece en el cuerpo humano o animal, preferiblemente en el contexto de un polipéptido nativo. También se prefiere que el residuo citrulina se presente en el contexto de un polipéptido nativo que no activa o desencadena otros componentes del sistema inmune tales como la activación de células o la unión del complemento.

- 30 La "molécula de unión específica" puede ser una molécula, preferiblemente una molécula pequeña compuesta de ADN, ARN, péptido, dominio de proteína, proteínas enteras, o combinaciones de los mismos o partes de los mismos, que son capaces de unirse específicamente a un compuesto diana. Ejemplos preferidos de moléculas de unión específicas son péptidos o anticuerpos.

Los anticuerpos nativos (también conocidos como inmunoglobulinas) son proteínas gamma globulina que se pueden encontrar en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, y son utilizados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar objetos extraños, tales como bacterias y virus.

- 35 Los anticuerpos nativos están típicamente hechos de unidades estructurales básicas - cada una con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras pequeñas - para formar, por ejemplo, monómeros con una sola unidad, dímeros con dos unidades o pentámeros con cinco unidades. Los anticuerpos son producidos por un leucocito denominado una célula B. Existen varios tipos diferentes de cadenas pesadas, resultando diferentes tipos de anticuerpos. Los anticuerpos se pueden agrupar en diferentes isotipos en base a la cadena pesada que poseen. En mamíferos se conocen cinco isotipos de anticuerpos diferentes que realizan diferentes funciones, y ayudan a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada tipo diferente de objeto extraño que encuentran. Algunas especies animales tales como los camélidos (p. ej., llamas) y tiburones pueden tener estructuras de anticuerpos aberrantes.

- 45 Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, una pequeña región en la punta de la proteína es extremadamente variable, permitiendo que existan millones de anticuerpos con estructuras de punta ligeramente diferentes. Esta región es conocida como la región hipervariable. Cada una de estas variantes puede unirse a una diana diferente, conocida como un antígeno. Esta enorme diversidad de anticuerpos permite que el sistema inmune reconozca una igualmente amplia diversidad de antígenos.

5 La única parte del antígeno reconocido por un anticuerpo se denomina epítipo. Estos epítipos se unen con su anticuerpo en una interacción altamente específica que permite a los anticuerpos identificar y unirse solamente a su antígeno único en medio de los millones de moléculas diferentes que componen un organismo. El reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo lo etiqueta para el ataque por otras partes del sistema inmune. Los anticuerpos también pueden neutralizar directamente dianas, por ejemplo, mediante la unión a una parte de un patógeno que necesita provocar una infección.

10 La población grande y diversa de anticuerpos es generada por combinaciones aleatorias de un conjunto de segmentos de genes que codifican diferentes sitios de unión a antígenos (o paratopos), seguido de mutaciones aleatorias en esta zona del gen del anticuerpo, que crean una diversidad adicional. Genes de anticuerpos también se re-organizan en un proceso denominado conmutación de clase que cambia la base de la cadena pesada a otra, creando un isotipo diferente del anticuerpo que conserva la región variable específica de antígeno. Esto permite que un único anticuerpo sea utilizado en varios isotipos diferentes por varias partes diferentes del sistema inmunológico.

15 El término "anticuerpos" o "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una estructura, preferiblemente una estructura de proteína o polipéptido, capaz de unirse a una molécula diana específica a la que se alude a menudo como "antígeno".

20 Un anticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos de cadena sencilla, Fragmentos Variables de Cadena sencilla (scFvs), regiones de fragmento de unión al antígeno (Fabs), anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión que comprenden el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo nativo o un aptámero, anticuerpos de dominios sencillos (sdabs), también conocidos como anticuerpos VHH, nanocuerpos (anticuerpos de dominio sencillo derivados de camélidos), fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo derivados de IgNAR de tiburón denominados VNAR, Anticalinas, aptámeros (ADN o ARN) y los componentes activos o fragmentos de los mismos,

En otra realización preferida, un anticuerpo es una proteína de fusión que comprende el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo nativo o un aptámero tal como un aptámero en la forma de ADN o ARN.

25 La expresión "o parte del mismo" o "fragmentos de los mismos" en el contexto de un anticuerpo u otra molécula de unión específica significa que se refiere a la parte del anticuerpo o molécula de unión específica que forma el sitio de unión específica del anticuerpo o la molécula de unión específica y puede ser interpretado como la parte de un anticuerpo o molécula de unión específica que todavía es capaz de reaccionar con el mismo epítipo que el anticuerpo completo o molécula de unión específica.

30 Los anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos son una forma de realización preferida de la invención. Preferiblemente, se pueden utilizar ventajosamente anticuerpos IgG1 (p. ej., IgG1 λ) que tienen una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera lambda. Sin embargo, otros isotipos de anticuerpos humanos también quedan abarcados por la invención, incluyendo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE en combinación con una cadena ligera kappa o lambda. También pueden utilizarse en la invención todos los anticuerpos derivados de animales de diversos isotipos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de tamaño completo o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo Fab, F(ab')₂, fragmentos Fv de cadena sencilla, o VHH de dominio sencillo, dominios sencillos VH o VL.

40 La expresión "moléculas de unión específicas reactivas con un epítipo citrulinado" se ha de interpretar como moléculas de unión específica que reaccionan específicamente con un residuo citrulina en el contexto de una estructura más grande tal como un péptido o un ácido nucleico peptídico o un aptámero o una estructura que imita a un péptido.

La citrulina es un aminoácido que no está incorporado en las proteínas durante la traducción normal, sin embargo, puede ser generada por modificación post-traducciona de un residuo arginina por peptidilarginina deiminasa (PAD).

45 La citrulinación es la conversión post-traducciona de residuos arginina en residuos citrulina, que es catalizada por peptidilarginina deiminasa (PAD). Enzimas peptidilarginina deiminasa (PAD; EC 3.5.3.15) catalizan la conversión de residuos arginina en residuos citrulina en las proteínas. No existe ARNt para la citrulina, la presencia de residuos citrulina en proteínas es exclusivamente el resultado de la modificación post-traducciona. En mamíferos (seres humanos, ratones y ratas) se han identificado cinco isotipos PAD (PAD1 - PAD6; 'PAD4' y 'PAD5' se utilizan para el mismo isotipo), cada uno codificado por un gen distinto, (Vossenaar et al, Bioessays 25, 1106-1118, 2003). Todas

estas enzimas se basan en gran medida en la presencia de Ca^{2+} para la actividad y no son capaces de convertir L-arginina libre en L-citrulina libre. L-arginina libre puede ser convertida en L-citrulina libre por la óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) en eucariotas o por arginina deiminasa (CE 3.5.3.6) en bacterias. Estas enzimas no son Ca^{2+} dependientes.

- 5 La diferencia más pronunciada entre las enzimas PAD altamente homólogas es su expresión específica para tejidos. En la epidermis PAD1 (sinónimos: PAD I, PAD tipo I) está implicada en la citrulinación de filamentos de queratina durante las etapas finales de la diferenciación de los queratinocitos, lo cual es importante para la reorganización de la envoltura córnea. Otro sitio de citrulinación en la epidermis es el folículo piloso, que contiene PAD3 (sinónimos PAD III, PAD tipo III) y su sustrato natural tricohialina (THH). THH es una importante proteína estructural de las
- 10 células de la vaina radicular interna y la capa de médula del folículo piloso y, en menor medida, de otros epitelios especializados. El isotipo PAD más recientemente identificado, PAD6 (sinónimo: ePAD), se encontró en las láminas citoplásmicas de los oocitos de ratón que desempeñan un papel importante en la embriogénesis temprana. Se encontró que la expresión de su ortólogo humano está restringida a ovario, testículos y leucocitos de sangre periférica (Chavanas et al, Gene vol 330; 19-27, 2004). Originalmente, este isotipo PAD fue designado ePAD, pero
- 15 basado en la numeración sistemática de otros PADs, este isotipo fue renombrado PAD6 (Vossenaar et al., vol 25 Bioessays 1106-1118, 2003). El isotipo más ampliamente expresado, PAD2 (sinónimos PAD II, PAD tipo II, PAD-H19), está presente en muchos tejidos diferentes tales como el músculo esquelético, cerebro, bazo, glándulas secretoras y macrófagos. A pesar de este patrón de expresión amplio, sólo la proteína básica de la mielina (MBP) y vimentina se han identificado como sustratos naturales. En la esclerosis múltiple (MS) los pacientes desarrollan una
- 20 respuesta autoinmune contra MBP. MBP es una proteína abundante de la vaina de mielina, y su citrulinación se produce durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se observó una citrulinación de vimentina durante la apoptosis inducida por el ionóforo calcio de macrófagos de seres humanos y de ratón y, como se describe anteriormente, la vimentina citrulinada ha demostrado ser la diana de los autoanticuerpos anti-Sa RA-específicos. En
- 25 contraposición con los PADs comentados anteriormente, los cuales están localizados principalmente en el citoplasma de las células, el isotipo PAD4 (sinónimos: PAD IV, PAD tipo IV, HL-60 PAD, PAD V, PAD tipo V, PAD14) está localizado en el núcleo. La señal de localización nuclear de PAD4 se encontró en la región N-terminal de la proteína. PAD4 se expresa principalmente en los granulocitos y monocitos de la sangre periférica. Sustratos de PAD4 en el núcleo son proteínas del núcleo histonas (H2A, H3 y H4) y nucleofosmina/B23, una proteína nucleolar que funciona en el ensamblaje de ribosomas, el transporte nucleocitoplásmico y la duplicación del centrosoma.
- 30 Moléculas de unión específica de acuerdo con la invención se dirigen contra un epitopo citrulinado en p15 y/o p17, dos polipéptidos caracterizados por sus pesos moleculares de 15 kDa y 17 kDa, respectivamente.

Se encontró que moléculas de unión específica de este tipo son particularmente adecuadas para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias.

- 35 "Condiciones inflamatorias" o "enfermedades inflamatorias", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquiera de un cierto número de afecciones o enfermedades que se caracterizan por cambios vasculares: edema e infiltración de neutrófilos (p. ej., reacciones inflamatorias agudas); infiltración de tejidos por células mononucleares; destrucción de tejido por parte de células inflamatorias, células del tejido conjuntivo y sus productos celulares; e intentos de reparación por sustitución del tejido conjuntivo (p. ej., reacciones inflamatorias crónicas).

- 40 Ejemplos representativos de tales condiciones incluyen enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina y enfermedades autoinmunes. Enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina se definen aquí como aquellas enfermedades en las que la citrulinación juega un papel en la patogénesis de la enfermedad. El que la citrulinación juegue o no un papel en la patogénesis de la enfermedad puede determinarse fácilmente por un experto en la materia utilizando tests rutinarios disponibles en la técnica. Por ejemplo, estas enfermedades se pueden caracterizar por la presencia de un nivel anormal de proteínas citrulinadas en el tejido afectado o relacionado con la enfermedad.
- 45 Esto puede realizarse por un ensayo inmunológico tal como una transferencia Western o un ELISA, en donde el tejido afectado se utiliza como un antígeno y la citrulinación de ese antígeno se puede detectar con la ayuda de un anticuerpo anti-citrulina tal como se describe en esta memoria.

- 50 Alternativamente, una persona experta en la técnica puede utilizar aplicaciones proteómicas tales como análisis por espectrometría de masas para comparar el nivel y el tipo de citrulinación en un tejido enfermo en comparación con uno sano de los pacientes afectados.

La enfermedad también puede ser caracterizada por la presencia de una respuesta inmune contra los péptidos o proteínas que contienen citrulina. Esto puede ser una respuesta humoral o una respuesta inmune celular tal como

una respuesta mediada por células T o células B. Los tests para la detección de anticuerpos anti-citrulina se han descrito en la técnica y están disponibles comercialmente.

Por consiguiente, la descripción se refiere a una molécula de unión específica para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina.

- 5 Tales enfermedades son, por ejemplo, artritis inflamatoria incluyendo artritis reumatoide y osteoartritis, esclerosis múltiple, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, hepatitis autoinmune, artritis idiopática juvenil, espondiloartropatía, síndrome de Down, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewy. Por consiguiente, la invención se refiere a una molécula de unión específica para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, 10 osteoartritis, esclerosis múltiple, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, hepatitis autoinmune, artritis idiopática juvenil, espondiloartropatía, síndrome de Down, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewy.

La descripción, en particular, se refiere a moléculas de unión específicas para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunes, más en particular, la artritis reumatoide o la osteoartritis.

- 15 La esclerosis múltiple o MS es un trastorno inflamatorio crónico del SNC, caracterizada por la destrucción mediada por autoinmunidad de la vaina de mielina. Las células de la vaina de mielina forman una estructura multi-bicapa alrededor de los axones que consisten en complejos lípido-proteína en una relación de aproximadamente 3: 1. Dos proteínas principales, MBP y proteína proteolípídica, representan el 85% de la fracción proteica. MBP es una proteína altamente catiónica, capaz de formar interacciones fuertes con fosfolípidos cargados negativamente tales como fosfatidilserina. En aproximadamente el 18% de las moléculas de MBP de seres humanos adultos sanos 6 (de 20 19) argininas están citrulinadas (Wood et al., J Biol Chem, vol 264, 5121-5127, 1989, Wood et al., Ann Neurol, vol 40, 18-24, 1996). Las moléculas de MBP restantes no contienen citrulina. En los pacientes con MS, la proporción de MBP-cit6 aumenta hasta el 45% de la MBP total. La carga positiva neta disminuida de MBP-cit6 provoca un despliegue parcial de moléculas de MBP y debilita su interacción con los fosfolípidos (Boggs et al., J Neurosci Res, 25 vol 57, 529-535, 1999, Pritzker et al., Biochemistry, vol 39, 5374-5381, 2000). Aunque MBP-cit6 es capaz de formar complejos de lípidos más rápidamente que MBP no citrulinada, los complejos que se forman no se empaquetan tan densamente como los formados con MBP no citrulinada (Boggs et al, J Neurosci Res, vol 57, 529-535, 1999, Beniac et al, J Struct Biol, vol 129, 80-95, 2000). MBP-cit6 es degradada 4 veces más rápidamente por parte de catepsina D que MBP no citrulinada (Cao et al., Biochemistry, vol 38, 6157-6163, 1999). En un caso raro de MS fulminante aguda (tipo Marburg), el 80% de las moléculas de MBP son en gran medida citrulinadas (MBPcit18) (Wood et al., Ann Neurol, vol 40, 18-24, 1996). La MBP-cit18 seriamente desplegada es degradada 45 veces más rápidamente por la catepsina D que MBP normal (Cao et al., Biochemistry, vol 38, 6157-6163, 1999). Ensayos clínicos con paclitaxel, el componente activo del fármaco anti-cáncer taxol, están en progreso (O'Connor et al., Ann Neurol, vol 46, 470, 1999). 35 Dosis bajas de paclitaxel pueden inhibir la citrulinación de MBP por PAD2 in vitro (Pritzker et al., Biochim Biophys Acta, vol1388, 154-160, 1998). El tratamiento con paclitaxel atenúa los síntomas clínicos e induce la re-mielinización de las vainas dañadas (Moscarello et al., Mult Scler, vol 8, 130138, 2002), lo que subraya la posible importancia de la PAD como un factor candidato en la enfermedad desmielinizante (Moscarello et al., J Neurochem, vol81, 335-343, 2002).

- 40 En la psoriasis, los queratinocitos proliferan muy rápidamente y se desplazan desde la capa basal a la superficie en sólo cuatro días. La piel no puede expulsar estas células con la suficiente rapidez, de modo que se acumulan en parches secos gruesos, o placas. En queratinocitos normales, la queratina K1 es citrulinada por PAD1 durante la diferenciación terminal. Este proceso hace que los filamentos de queratina se vuelvan más compactos, lo cual es esencial para el proceso de cornificación normal de la epidermis. Los queratinocitos en las placas psoriásicas hiperproliferativas no contienen queratina K1 citrulinada (Ishida-Yamamoto et al., J Invest Dermatol, vol 114, 701-705, 2000). No está claro si la proliferación incrementada de las células impide una citrulinación adecuada por PAD o si la inactividad de PAD permite la hiperproliferación y la acumulación de queratinocitos. Aunque el mecanismo es desconocido, una citrulinación aberrante en la epidermis psoriásica obviamente está relacionada con PAD1.

- 50 En una realización preferida, la composición de acuerdo con la invención está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una disolución acuosa, un gel, un hidrogel, una película, una pasta, una crema, un aerosol, un ungüento o una envoltura. En realizaciones adicionales, los métodos anteriores se utilizan para administrar las composiciones descritas en esta memoria por una ruta seleccionada de intra-articular, intraperitoneal, tópicar, rectal, intravenosa, oral, ocular o al margen de resección de tumores.

5 En determinadas realizaciones, un soporte farmacéuticamente aceptable comprende al menos un soporte seleccionado del grupo que consiste en una disolución de co-disolvente, liposomas, micelas, cristales líquidos, nanocristales, nanopartículas, emulsiones, micropartículas, microesferas, nanoesferas, nanocápsulas, polímeros o soportes poliméricos, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes formadores de complejos tales como ciclodextrinas o moléculas adsorbentes tales como albúmina, partículas tensioactivas y agentes quelantes. En realizaciones adicionales, un polisacárido comprende ácido hialurónico y derivados de los mismos, dextrano y derivados de los mismos, celulosa y derivados de los mismos (p. ej., metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de celulosa, acetato-butilato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetil-celulosa), quitosano y sus derivados, [beta]-glucano, arabinosilanos, carragenanos, pectina, glucógeno, fucoidano, condroitina, dermatano, heparano, heparina, pentosano, queratano, alginato, ciclodextrinas, y sales y derivados, incluyendo ésteres y sulfatos de los mismos.

10 En un aspecto adicional, el método de acuerdo con la descripción comprende suministrar una composición de acuerdo con la invención a un sitio diana, lo más notablemente una articulación sinovial.

15 En una realización específica de la presente descripción, la molécula de unión específica compite con anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 y RmmAb 22,101 para la unión a p15 y/o p17.

Estos anticuerpos se describen en este documento por la secuencia de aminoácidos primarios de sus cadenas pesadas y ligeras, véase la tabla 10.

Tabla 10

SEQ.ID.	Prot / ADN	Nombre
1	prot.	histona 3, h2bb [Mus musculus]
2	prot.	histona 3, h2bb [Mus musculus]
3	prot.	similar a histona H2B [Bos taurus]
4	prot.	histona grupo 1, H2bn [Bos taurus]
5	prot.	racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]
6	prot.	racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]
7	prot.	racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]
8	ADN	IgG1 humana de cadena pesada RhmAb2.102
9	ADN	cadena ligera lambda humana RhmAb2.102
10	ADN	cadena ligera kappa humana RhmAb2.110
11	ADN	dominio constante kappa humano
12	prot.	secuencia líder de ratón
13	prot.	VH Rhmab2.102
14	prot.	Fc de IgG1 constante humana
15	prot.	VL Rhmab2.102
16	prot.	dominio constante lambda humano
17	ADN	VL Rhmab2.108
18	ADN	VH Rhmab2.108 y Rhmab2.111
19	ADN	VL Rhmab2.111
20	ADN	VH Rhmab2.109
21	prot.	péptido nº 1 (histona 2A humana)
22	prot.	péptido nº 2 (histona 2A humana)
23	prot.	péptido nº 3 (histona 2A humana)
24	prot.	péptido nº 4 (histona 2A humana)
25	prot.	péptido nº 5 (histona 2A humana)
26	prot.	péptido nº 6 (histona 2A humana)
27	prot.	péptido nº 7 (histona 2A humana)
28	prot.	péptido nº 8 (histona 2A humana)
29	prot.	péptido nº 9 (histona 2A humana)
30	prot.	péptido nº 10 (histona 2A humana)
31	prot.	péptido nº 11 (histona 2A humana)
32	prot.	péptido nº 12 (histona 2A humana)
33	prot.	msFiba XH

34	prot.	msFib α XG
35	prot.	huFib α XH
36	prot.	huFib α XG
37	prot.	msFib β XG
38	prot.	msVim XS / XL
39	ADN	VL Rhmab2.109
40	ADN	VH Rhmab2.110
41	ADN	VL Rhmab2.110
42	ADN	VH Rhmab2.112
43	ADN	VL Rhmab2.112
44	ADN	VH Rmmab22.101
45	ADN	VL Rmmab22.101

5 Las moléculas de unión o anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales tal como se describe en esta memoria pueden ser seleccionados mediante procedimientos estándares. En resumen: se puede desarrollar un ensayo de unión tal como un ELISA, en el que los antígenos tal como se describen en esta memoria se inmovilizan sobre un soporte sólido. Los anticuerpos monoclonales, tal como se describen en esta memoria, pueden ser marcados y su interferencia con su unión a los antígenos inmovilizados puede ser determinada fácilmente mediante análisis rutinario. Estos y otros métodos más sofisticados son conocidos por el experto en la materia y pueden realizarse de forma rutinaria en un entorno de laboratorio ordinario.

10 En particular, los ensayos se pueden desarrollar fácilmente utilizando cualquiera de las proteínas antigénicas de acuerdo con SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 inmovilizadas sobre un soporte sólido. Anticuerpos monoclonales seleccionados de entre el grupo que consiste en RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111, RhmAb2.112 y RmmAb 22.101 se pueden marcar y poner en contacto con el antígeno inmovilizado en presencia y ausencia de un anticuerpo de ensayo. Si el anticuerpo de ensayo interfiere con la unión, es decir, reduce la señal obtenida con cualquiera de los anticuerpos marcados, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo compite con la unión del anticuerpo marcado. Un anticuerpo competidor de este tipo sería entonces adecuado para su uso en los métodos de la invención.

15 Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo para uso en el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide, en donde el anticuerpo es específicamente reactivo con un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38.

20 Las secuencias de ARNm primarias de las regiones variables del anticuerpo monoclonal (mAb) RhmAb2.101 han sido publicadas y fueron depositadas en la base de datos EMBL bajo los números de acceso tal como se muestran en la Tabla 1. La secuencia primaria de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, se dan a conocer en esta memoria en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 42.

25 Ratones monoclonales RmmAb 22.101 y RmmAb 22.102 se derivaban de hibridomas depositados en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, ALEMANIA y recibió el número de depósito de DSMZ ACC 3031 y ACC 3032, respectivamente. Después de la secuenciación, parecían tener una secuencia de ADN idéntica que se muestra en SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45.

30 La descripción, por lo tanto, también se refiere a un polipéptido que comprende una cadena pesada o ligera variable seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45. La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45. La invención también se refiere a un polipéptido que comprende una cadena pesada y ligera variable tal como está presente en Rmm22.101 y RmmAb22.102.

35 La descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con una cadena pesada y ligera variable tal como está presente en RmmAb22.101 y RmmAb22.102 que se muestra en SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45.

En otra realización preferida, la molécula de unión específica es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101, y RmmAb22.102.

5 En otra realización preferida, la molécula de unión específica comprende dominios VH y/o VL o derivados obtenidos a partir de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102.

10 El término "derivado" o "obtenido" en este contexto significa que la estructura primaria de los dominios VH y/o VL se puede determinar a partir de las secuencias de proteína y ácido nucleico descritas en esta memoria y se clonó y reordenó en un contexto diferente, por ejemplo el contexto de un anticuerpo humano que muestra un dominio VH o VL de ratón. Más en particular, el término "derivado" u "obtenido" a este respecto significa que se identifican los residuos esenciales responsables de las propiedades de unión específica de los dominios VH y/o VL en un anticuerpo particular, y que estos residuos esenciales u homólogos estructurales de los mismos se transfieren a continuación en el contexto de otro péptido.

15 Moléculas de unión específica de acuerdo con la descripción pueden ser generadas esencialmente de dos maneras. En primer lugar, se pueden derivar de los anticuerpos y sus secuencias tal como se presenta en esta memoria. La reactividad de los anticuerpos puede incluso ser mejorada por mutagénesis dirigida al sitio, barajeo de cadenas, PCR sexual o por otros medios para la derivación y optimización de anticuerpos conocida por la persona experta en la técnica. Alternativamente, las moléculas de unión específicas, en particular anticuerpos, se pueden obtener mediante cribado con cualquiera de los epítomos específicamente reactivos tal como se describe en esta memoria, en particular histona 2A deiminada, péptido 1 (SEQ ID NO: 21) y otros péptidos particularmente reactivos.

20

Una persona experta en la técnica puede utilizar las secuencias descritas en esta memoria para clonar o generar ADNc o secuencias genómicas, por ejemplo tal como se describe en los ejemplos que figuran más adelante. La clonación de estas secuencias en un vector de expresión eucariota apropiado tal como pcDNA3 (Invitrogen), o derivados del mismo, y la subsiguiente transfección de células de mamíferos (tales como células CHO) con combinaciones de los vectores que contienen una cadena ligera y una cadena pesada apropiados dará lugar a la expresión y secreción de los anticuerpos enumerados RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102. También, anticuerpos monoclonales de ratón RmmAb22.101 y RmmAb22.102 pueden expresarse directamente y secretarse por sus respectivas líneas de células de hibridoma tal como están depositadas (DSMZ números ACC 3031 y ACC 3032).

25

30 La persona experta también puede hacer análogos de las moléculas de unión específica tal como se describe en esta memoria, utilizando los dominios de unión específicos de las secuencias de anticuerpos y expresarlos en un contexto diferente tal como un polipéptido tal como una proteína de fusión. Esto es bien conocido en la técnica.

35 Se obtuvieron anticuerpos anti-citrulina monoclonales humanos y de ratón recombinantes tal como se describe en los Ejemplos 1, 13 y 14. Las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 se obtuvieron con una secuencia líder de ratón (SEQ ID NO: 12), y una región Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 14). Cadenas ligeras de anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 se obtuvieron con una secuencia líder de ratón (SEQ ID NO: 12) y una región constante lambda humana (SEQ ID NO: 16). El anticuerpo monoclonal RhmAb2.110 se obtuvo con una secuencia líder de ratón (SEQ ID NO: 12) y una región constante Kappa humana (SEQ ID NO: 11).

40 Anticuerpos anti-péptido-citrulina monoclonales de ratón RmmAb13.101, RmmAb13.102 y RmmAb13.103 se obtuvieron a partir de una fuente comercial (ModiQuest Research BV Nijmegen, Países Bajos; N° de Cat. MQ13.101, MQ13.102 y MQ13.103).

45 Los anticuerpos anti-citrulina se sometieron a ensayo en un modelo experimental, en el que la inflamación es inducida por la inyección de anticuerpos anti-colágeno en un ratón. Este modelo se conoce como la artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) (Nandakumar y Holmdahl, J Immunol Methods, vol 304, 126-136, 2005). Los anticuerpos anti-colágeno se obtuvieron de una fuente comercial (ModiQuest Research BV Nijmegen, Países Bajos; N° de Cat. MQ18.101).

Se confirmó que los anticuerpos monoclonales anti-citrulina de ratón RmmAb13.101, RmmAb13.102 y RmmAb13.103 potenciaban la gravedad de la artritis inducida por anticuerpos de colágeno tal como se ha descrito

también por Kuhn et al. (J. Clin Invest, vol 116, 961-871, 2006); y Hill et al. (J Exp Med, vol 205, 967-979, 2008). Esto se muestra en las figuras 1a y 1b.

Además, varios estudios en pacientes humanos indican que anticuerpos contra epítomos citrulinados añadidos a la patogénesis de RA (Masson-Bessière et al, J. Immunol, vol 166, 4177-4184, 2001; Vossenaar y van Venrooij, Arthritis Res Ther, vol 6, 107-111, 2004). Esto se muestra en las Figuras 1a y b, que muestran la "puntuación media de la artritis" y la "incidencia de la artritis", respectivamente, del mismo experimento.

Sorprendentemente, sin embargo, el anticuerpo monoclonal humano RhmAb2.102 reducía drásticamente los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA.

Los resultados obtenidos con RhmAb2.102 se muestran en las Figuras 1c y 1d. Los resultados obtenidos con RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 fueron incluso mejores en comparación con RhmAb2.102, tal como se muestra en la Figura 9.

El anticuerpo monoclonal humano RhmAb2.101 no tuvo efecto alguno en absoluto en los signos clínicos de la artritis en la dosis aplicada. El anticuerpo disponible comercialmente RhmAb2.201 se utiliza como un control de anticuerpo irrelevante en este experimento (ModiQuest Research BV, N° de Cat: MQR2.201). Este anticuerpo no reconoce epítomos citrulinados.

Los mismos experimentos con animales se realizaron también con los anticuerpos monoclonales de ratón RmmAb22.101 y RmmAb22.102 que reconocen un subconjunto similar de epítomos al de los anticuerpos humanos RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112.

Se obtuvieron resultados similares en los experimentos CAIA con animales como con los anticuerpos humanos RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112. Los anticuerpos monoclonales de ratón RmmAb22.101 y RmmAb22.102 suprimirán los signos clínicos de la artritis (Figura 10).

Las Figuras 1e y 1f muestran un experimento CAIA independiente en el que se ha evaluado la dosis clínica para RhmAb2.102. La dosis más baja que dio la inhibición máxima fue de 0,5 mg de Ab(anticuerpo)/ratón que corresponde a 28 mg/kg en inyección IP.

A partir de estos experimentos se concluye que los epítomos específicos reconocidos por los anticuerpos monoclonales seleccionados del grupo que consiste en RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102 desempeñan un papel importante en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias. Un enmascaramiento específico de estos epítomos puede, por lo tanto, ser una terapia eficaz de enfermedades inflamatorias, en particular la artritis reumatoide.

Con el fin de analizar adicionalmente el antígeno o los antígenos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales, éstos se sometieron a ensayo para determinar su reactividad hacia extractos de células de deiminadas utilizando Peptidilarginina deiminasa (enzima PAD) tal como se describe en el Ejemplo 3. Los borrones de transferencia Western que contienen hPAD2 o hPAD4 transflectaron lisados COS-1 que fueron deiminados post-líticamente se incubaron con los anticuerpos monoclonales RhmAb2.101 y RhmAb2.102. Se observó, que sólo tiras incubadas con RhmAb2.102 mostraron reactividad con un doblete de proteínas con un peso molecular de aproximadamente 15 y 17 kiloDalton.

El documento WO 2004/078098 describe anticuerpos específicos para los complejos de péptido citrulinado/MHC de clase II para inhibir la activación de células T. Estos anticuerpos no se unen al péptido separado o molécula MHC de clase II, sino sólo al complejo del péptido y la molécula MHC de clase II. Los anticuerpos descritos en esta memoria son diferentes de los anticuerpos descritos en el documento WO 2004/078098, ya que reconocen los péptidos y proteínas individuales tal como se describe en esta memoria. Además de ello, los anticuerpos reconocen un polipéptido en un borrón de transferencia Western que no podría ser un complejo entre un péptido y una molécula MHC de clase II, ya que el complejo entre una molécula de MHC y un péptido citrulinado nunca sobreviviría a las condiciones reductoras de un gel de SDS utilizado en el procedimiento de inmunotransferencia. Los epítomos reconocidos por las moléculas de unión, tal como se describe en esta memoria, son, por lo tanto, diferentes de los anticuerpos descritos en el documento WO 2004/078098. Además de ello, los anticuerpos, tal como se describen en esta memoria, no son específicamente reactivos con un complejo de un péptido y una molécula MHC de clase II.

Los experimentos y consideraciones descritos anteriormente llevaron a concluir que existe una clara correlación entre la capacidad de prevenir los signos clínicos de las enfermedades inflamatorias y la reactividad con epítomos citrulinados en p15 y p17.

5 Se obtuvieron datos similares cuando los anticuerpos monoclonales humanos RhmAb2.101 y RhmAb2.102 se utilizaron en experimentos de inmunoprecipitación tal como se detalla en el Ejemplo 5.

Inmunoprecipitaciones con RhmAb2.102, en lisados COS-1 deiminados tanto de PAD2 humana como PAD4 revelaron bandas de proteínas prominentes de p15 y p17.

La intensidad de reconocimiento de las proteínas p15 y p17, por lo tanto, parece que se correlaciona bien con las propiedades terapéuticas de estos anticuerpos (Figuras 1a-d).

10 El que un anticuerpo sea o no reactivo con p15 o p17 puede ser fácilmente establecido por la realización de análisis inmunoprecipitación o de transferencia Western como se detalla en los Ejemplos 4 y 5. Alternativamente, los experimentos de competición con RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102, se pueden realizar utilizando borrones de transferencias Western que contienen lisados COS-1 deiminados o proteínas p15 y/o p17 deiminadas purificadas en transferencia Western o ELISA.
15

Las proteínas p15 y p17 se caracterizaron, además, por espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz acoplada a tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) tal como se detalla en el Ejemplo 6. Dado que el genoma del mono verde africano no está completamente secuenciado, los autores de la invención han rastreado todas las demás bases de datos del genoma de mamíferos en cuanto a homología con los péptidos que se encuentran con MALDI-TOF MS. Proteínas que se encuentran con un alto grado de homología resultaron ser histonas. Esto se muestra en la Tabla 3 (Ejemplo 6).
20

La citrulinación de las histonas por acción enzimática de PAD está bien documentada y, por lo tanto, las histonas citrulinadas pueden muy bien ser producidas in vitro. Estas histonas citrulinadas pueden entonces ser utilizadas como un sustrato en un ensayo de unión enzimática para detectar y seleccionar para otras moléculas de unión específicas tales como péptidos y anticuerpos reactivos con epítomos en p15 y p17 citrulinadas, es decir, histonas. Preferiblemente, se seleccionan moléculas de unión específica que compiten con anticuerpos RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102 por la unión a p15 y/o p17.
25

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para significar que los términos y expresiones que siguen a la palabra quedan incluidos, pero no están excluidos términos y expresiones que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos está presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa habitualmente "al menos uno".
30

35 Con el fin de analizar adicionalmente qué histona o histonas deiminadas están involucradas en la acción terapéutica de RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102, histonas comerciales disponibles (H1, H2A, H2B, H3 y H4) se deiminaron con enzimas peptidilarginina deiminasa humana (PAD, EC 3.5.3.15) (huPAD2 o huPAD4). Histonas deiminadas así como no deiminadas se recubrieron en placas ELISA de 96 pocillos y se incubaron con diluciones en serie de RhmAb2.101 y RhmAb2.102. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y la Figura 2.
40

A partir de los resultados mostrados en la Figura 2 es evidente que histona 2A deiminada, Histona 3 e Histona 4 son reconocidas por el anticuerpo terapéutico RhmAb2.102, pero no, o con una afinidad significativamente menor, por RhmAb2.101 (Figuras 2a, 2b).

45 Además de ello, estos resultados demuestran que esta diferencia en la afinidad entre RhmAb 2.102 y RhmAb 2.101 es la más alta para H2A deiminada con PAD2 humana y/o PAD4, Histona 3 deiminada con PAD2 humana e Histona 4 deiminada con PAD2 humana y/o PAD4.

Estos datos se correlacionan bien con el efecto de estos anticuerpos sobre los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA, en el que RhmAb2.102 suprime los signos clínicos de artritis, mientras que RhmAb2.101 no tiene efecto sobre los signos clínicos de la artritis (Figuras 1c y 1d).

- 5 Por lo tanto, los autores de la invención han demostrado que un epítipo deiminado en H2A/p4 y H2A/p2 o sus miméticos estructurales juegan un papel crucial en la cascada inflamatoria RA. Lo mismo es cierto para los epítipos deiminados en H3/p2, H4/p2 y H4/p4, ya que RhmAb2.102 muestra una mayor afinidad por estas histonas en comparación con RhmAb2.101 (Figuras 2a, 2b).

Un imitador es, por ejemplo, una molécula con un nivel aceptable de actividad equivalente, que, en este caso, incluiría como ser reconocido con mayor afinidad por RhmAb2.102 en comparación con RhmAb2.101.)

- 10 Por lo tanto, la invención se refiere a una molécula de unión específica tal como se describe anteriormente, reactiva con un epítipo citrulinado en histona 2A o histona 4 humana deiminada en PAD4 humana o PAD 2 humana, o en histona H3 deiminada en PAD 2 humana.

- 15 Para detallar adicionalmente el epítipo citrulinado exacto en H2A que es reconocido por RhmAb2.102, se sintetizaron péptidos marcados con biotina tal como se muestran en la Tabla 4 que contienen potenciales sitios de deiminación de histona 2A. Estos péptidos se recubrieron en placas de neutravidina-ELISA de 96 pocillos y se incubaron con diluciones en serie de RhmAb2.101 y RhmAb2.102. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Tabla 6A Reactividad de las histonas deiminadas con RhmAb2.101, mostrada en la figura 2A

2.101	H1	H1/p2	H1/p4	H2A	H2A/p2	H2A/p4	H2B	H2B/p2	H2B/p4
10	0,141	0,151	0,126	0,14	3,141	0,522	0,105	0,216	0,114
2	0,072	0,09	0,084	0,089	1,473	0,159	0,085	0,12	0,087
0,4	0,067	0,08	0,083	0,085	0,426	0,11	0,069	0,077	0,069
0,08	0,064	0,072	0,072	0,076	0,128	0,073	0,067	0,067	0,064
0,016	0,061	0,064	0,072	0,073	0,076	0,073	0,065	0,062	0,064
0,0032	0,061	0,066	0,069	0,072	0,063	0,065	0,062	0,064	0,061
0,00064	0,06	0,067	0,069	0,071	0,059	0,064	0,059	0,06	0,061
0,000128	0,064	0,063	0,071	0,066	0,058	0,063	0,058	0,065	0,062
H3	H3/p2	H3/p4	H4	H4/p2	H4/p4	CFC-0	CFC-1	Sin revestimiento	
0,115	0,217	0,383	0,111	1,341	0,116	0,303	3,587	0,069	
0,075	0,087	0,146	0,093	0,412	0,073	0,103	3,26	0,055	
0,065	0,073	0,076	0,089	0,154	0,077	0,084	2,13	0,058	
0,074	0,067	0,069	0,066	0,084	0,065	0,066	0,807	0,067	
0,071	0,069	0,079	0,067	0,06	0,063	0,056	0,249	0,053	
0,072	0,079	0,076	0,072	0,067	0,066	0,056	0,097	0,057	
0,074	0,077	0,074	0,07	0,062	0,063	0,057	0,072	0,052	
0,079	0,104	0,104	0,073	0,08	0,063	0,056	0,065	0,051	

Tabla 7 Reactividad de péptidos seleccionados con anticuerpos monoclonales RhmAb2.102 y RhmAb2.101 como se indica.

2.101	péptido 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CFC-0	CFC-1	sin revestimiento	
		10 ng/pocillo	0,266	0,457	0,393	0,095	0,083	0,750	1,178	0,090	0,087	0,073	0,148	0,072	0,095	2,841
	2	0,102	0,136	0,121	0,048	0,051	0,218	0,459	0,053	0,053	0,069	0,064	0,053	0,071	2,717	0,055
	0,4	0,086	0,071	0,068	0,051	0,064	0,090	0,174	0,050	0,056	0,061	0,058	0,050	0,068	1,827	0,050
	0,08	0,062	0,054	0,053	0,056	0,051	0,062	0,080	0,051	0,052	0,052	0,051	0,050	0,065	0,951	0,051
	0,016	0,057	0,049	0,049	0,051	0,054	0,058	0,055	0,050	0,049	0,048	0,050	0,050	0,055	0,492	0,050
	0,0023	0,061	0,052	0,049	0,052	0,054	0,051	0,050	0,050	0,050	0,055	0,050	0,051	0,063	0,583	0,051
	0,00064	0,049	0,038	0,050	0,040	0,053	0,052	0,052	0,050	0,048	0,066	0,047	0,045	0,064	0,548	0,050
	0,000128	0,060	0,052	0,045	0,049	0,046	0,047	0,048	0,049	0,051	0,047	0,052	0,052	0,059	0,537	0,051
2.102	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CFC-0	CFC-1	sin revestimiento	
10	3,112	0,552	0,619	2,056	0,239	1,410	0,080	0,082	0,090	0,091	0,088	0,083	0,870	3,271	0,074	
2	3,048	0,270	0,286	1,300	0,111	0,752	0,059	0,060	0,063	0,070	0,067	0,067	0,242	3,206	0,053	
0,4	2,804	0,136	0,154	0,564	0,082	0,333	0,064	0,061	0,057	0,051	0,064	0,061	0,115	3,060	0,051	
0,08	2,039	0,086	0,091	0,192	0,066	0,123	0,062	0,060	0,060	0,058	0,064	0,060	0,088	2,656	0,050	
0,016	0,843	0,065	0,070	0,084	0,065	0,075	0,061	0,063	0,064	0,066	0,069	0,057	0,071	1,460	0,045	
0,0023	0,300	0,062	0,062	0,078	0,063	0,058	0,064	0,060	0,062	0,068	0,057	0,059	0,067	0,916	0,046	
0,00064	0,160	0,055	0,058	0,063	0,067	0,058	0,057	0,057	0,059	0,056	0,060	0,056	0,066	0,621	0,050	
0,000128	0,128	0,075	0,063	0,058	0,059	0,054	0,056	0,055	0,055	0,057	0,059	0,056	0,063	0,749	0,047	

Tabla 8 Reactividad de péptidos seleccionados con anticuerpo monoclonal RhmAb2.102 y RhmAb2.101 como se indica.

2.101 (ug/pocillo)		msFib α XH	msFib α XG	huFib α XH	huFib α XG	msFib β XG	msVim XS/XL	cfc1 XG	cf0	Neutra	blanco
10	0,120	0,177	3,778	2,538	0,282	3,780	0,154	0,088	0,069		
2	0,081	0,124	3,601	1,260	0,144	3,612	0,115	0,120	0,066		
0,4	0,074	0,107	2,497	0,457	0,123	2,581	0,109	0,098	0,061		
0,08	0,073	0,100	0,798	0,203	0,119	1,070	0,115	0,099	0,061		
0,016	0,087	0,112	0,249	0,132	0,129	0,459	0,126	0,135	0,064		
0,0023	0,102	0,118	0,151	0,119	0,128	0,325	0,123	0,137	0,069		
0,00064	0,130	0,121	0,254	0,123	0,134	0,322	0,123	0,124	0,062		
0,000128	0,114	0,139	0,146	0,119	0,147	0,292	0,136	0,113	0,059		
2.102 (ug/pocillo)		msFib α XH	msFib α XG	huFib α XH	huFib α XG	msFib β XG	msVim XS/XL	cfc1 XG	cf0	Neutra	blanco
10	0,154	0,179	3,028	2,727	3,802	3,892	0,334	0,088	0,066		
2	0,091	0,116	1,902	1,511	3,154	3,968	0,138	0,080	0,062		
0,4	0,076	0,090	0,773	0,521	1,670	3,794	0,111	0,075	0,060		
0,08	0,076	0,080	0,237	0,186	0,515	3,026	0,094	0,073	0,061		
0,016	0,081	0,080	0,107	0,103	0,174	1,223	0,102	0,089	0,061		
0,0023	0,085	0,123	0,125	0,125	0,120	0,506	0,124	0,103	0,060		
0,00064	0,088	0,124	0,116	0,125	0,133	0,345	0,152	0,134	0,060		
0,000128	0,089	0,120	0,119	0,115	0,118	0,288	0,139	0,119	0,059		

Se observó que el péptido 1 (AAASGXGKQGGK, SEQ ID NO: 21) fue reconocido por el anticuerpo terapéutico RhmAb2.102, pero no por RhmAb2.101 (Tabla 4 y Figuras 3a, 3b). Lo mismo es cierto para los epítomos deiminados en péptidos 4 y 6 (Tabla 4), dado que RhmAb2.102 muestra una mayor afinidad por estos péptidos que RhmAb2.101 (Figuras 3a, 3b). Con ello, los autores de la invención han demostrado con ello que el epítomo deiminado o los equivalentes estructurales o imitadores de los mismos en los péptidos 1, 4 y 6 juegan un papel crucial en la cascada inflamatoria RA. Este patrón de reconocimiento de anticuerpos es muy similar al patrón de reconocimiento de H2A/p4 y H2A/p2. Por lo tanto, concluyeron que las moléculas de unión específicas de acuerdo con la invención también pueden estar definidas por su reactividad hacia los péptidos 1, 4 y 6; SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 26, respectivamente. Cada uno de estos péptidos que contienen citrulina o derivados de los mismos, individualmente, o una combinación de tales péptidos o estructuras que contienen una o más de tales secuencias de péptidos, pueden utilizarse para generar moléculas de unión específicas tales como anticuerpos de acuerdo con la invención. Tales anticuerpos pueden entonces ser seleccionados hacia cualquiera de los otros antígenos tal como se describe en esta memoria para la reactividad óptima.

Tabla 4: Péptidos que contienen citrulina en histona 2A

Péptido Número	Secuencia ID NO:	Secuencia de aminoácidos
1	Secuencia ID NO: 21	AAASGXGKQGGK
2	Secuencia ID NO: 22	AKAKSXSSRAGL
3	Secuencia ID NO: 23	KSRSSXAGLQFP
4	Secuencia ID NO: 24	QFPVGXVHLLR
5	Secuencia ID NO: 25	VGRVHLLRKGN
6	Secuencia ID NO: 26	VHLLXKGNYS
7	Secuencia ID NO: 27	GNYSEXVGAGAP
8	Secuencia ID NO: 28	AGNAAXDNKKTR
9	Secuencia ID NO: 29	DNKKTXIIPRHL
10	Secuencia ID NO: 30	TRIIPXHLQLAI
11	Secuencia ID NO: 31	LQLAIXNDEELN
12	Secuencia ID NO: 32	NKLLGXVTIAQG

15 X denota un residuo citrulina

Péptidos que contienen fibrinógeno y vimentina marcados con biotina y citrulina (Tabla 5) también se sometieron a ensayo en cuanto a la reactividad con los anticuerpos terapéuticos. Los péptidos se recubrieron en placas de 96 pocillos con neutravidina-ELISA. Posteriormente, diluciones seriadas de RhmAb2.101, RhmAb2.102 se aplicaron a las placas recubiertas. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y la Figura 4.

20 **Tabla 5: Péptidos que contienen fibrinógeno y citrulina vimentina**

Nombre péptido	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
msFib α XH	SEQ ID NO: 33	LSEGGGVRGPRVVEHXQSQCK D
msFib α XG	SEQ ID NO: 34	LSEGGGVXGPRVVERHQSQCK D
huFib α XH	SEQ ID NO: 35	LAEGGGVVGPRVVEHXQSACK D
huFib α XG	SEQ ID NO: 36	LAEGGGVXGPRVVERHQSACK D
msFib β XG	SEQ ID NO: 37	EPTDSL DAXGHRPVDRR
msVim XS / XL	SEQ ID NO: 38	YVTXSSAVXLXSSVP

X = citrulina

Se observó que el péptido fibrinógeno β de ratón (SEQ ID NO: 37) es reconocido por RhmAb2.101 y RhmAb2.102 (Figura 4a.). Una vez más, RhmAb2.102 mostró una mayor afinidad en comparación con RhmAb2.101 (Figuras 4a, 4b). Además solamente RhmAb2.102 reconoció el péptido vimentina de ratón (Ejemplo 9). Es muy probable que además de los péptidos mencionados anteriormente, también los epítomos deiminados en el péptido msFib β (SEQ ID NO: 37) y msVim (SEQ ID NO: 38) jueguen un papel crucial en la cascada inflamatoria de RA. Sin embargo, con ello no se excluye que también otros epítomos en fibrinógeno y vimentina jueguen un papel en los efectos anti-inflamatorios de los anticuerpos terapéuticos de los autores de la invención.

La descripción, por lo tanto, se refiere también a una molécula de unión específica tal como se describió anteriormente que es específicamente reactiva con un epítipo en péptidos msFib β o msVim (SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38) y a su uso.

5 Además, los autores de la invención han demostrado que los epítopos citrulinados aparecen *de novo* en el tejido inflamado. En un modelo experimental de ratón para la artritis reumatoide fueron capaces de demostrar que los péptidos citrulinados eran inmunoprecipitables de las patas delanteras inflamadas de ratones afectados utilizando anticuerpo monoclonal humano 102 (RhmAb2.102).

10 Por lo tanto, se realizó un experimento típico CAIA en el que a ratones (3 ratones por grupo) se les inyectó i.p. una mezcla de 8 anticuerpos anti-colágeno (2,8 mg/ratón) el día 0. Tres días más tarde los ratones recibieron otra inyección i.p. que contenía 25 ug de LPS. La puntuación se realizó como se describió anteriormente. Durante este experimento cada día un grupo de ratones fue sacrificado, y las patas se analizaron en cuanto a la presencia de citrulina mediante análisis de transferencia Western y técnicas de inmunohistoquímica.

15 Para cada uno de los grupos de ratones, las patas delanteras se agruparon y se hicieron extractos. Se realizaron inmunoprecipitaciones (IP) en estos extractos utilizando 20 microgramos RhmAb2.102 por cada IP. Los precipitados fueron sometidos a electroforesis en SDS-page y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante técnicas de transferencia Western. El borrón de la transferencia se tiñó primero con Ponceau S para la detección total de proteínas. La tinción con Ponceau S se lleva a cabo para verificar que para cada IP se ha utilizado la misma cantidad de anticuerpo. Se pudieron observar cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos pronunciadas en las mismas cantidades.

20 Posteriormente, los residuos citrulina presentes en el borrón de la transferencia se han modificado químicamente de acuerdo con Senshu et al. (Senshu et al, Anal Biochem, vol 203, 94-100, 1992). La modificación química puede ser visualizada utilizando un anticuerpo que reconoce la modificación química de residuos citrulina (Senshu et al, Anal Biochem, vol 203, 94-100, 1992). Fibrinógeno deiminado se utilizó como un control positivo en este experimento. Una inmunoprecipitación sin extractos se utilizó como control negativo en estos experimentos.

25 A partir del día 4, aparecieron bandas marcadas en los borrones de transferencia en las posiciones correspondientes a las proteínas con pesos moleculares de 50, 15 y 17 kiloDalton. Estas bandas se hicieron más pronunciadas el día 5 y eran más intensos el día 6.

30 La incidencia de la artritis del experimento fue de 100%, con ratones que tienen puntuaciones regulares de la artritis, alcanzando 5+ el día 6 (Figs. 5A y 5B). La cantidad de proteína precipitada aumenta en el tiempo, lo cual es visible de los días 4 a 6. Sobre la base de la especificidad para citrulina de RhmAb2.102 y la presencia de las señales en el borrón de transferencia obtenido con el anticuerpo anti-citrulina modificado químicamente, se puede concluir que los ratones sometidos a CAIA tienen niveles detectables de citrulina en sus articulaciones inflamadas.

35 En los experimentos CAIA descritos anteriormente, se inyectaron anticuerpos anti-citrulina el día 3 después de la inyección de anticuerpo anti-colágeno, cuando la inflamación en las patas de los ratones todavía estaba ausente o era muy baja. Esto evitó la aparición de síntomas clínicos y, por lo tanto, es útil como un tratamiento de la inflamación, en particular un tratamiento profiláctico.

40 Por lo tanto, los autores de la invención han querido estudiar si RhmAb2.102 también podría curar los síntomas clínicos, una vez que se habían producido. Esto se hizo mediante el tratamiento de animales el día 7 después de la inyección anti-colágeno cuando las puntuaciones medias de la artritis de los 4 patas de todos los ratones alcanzaron la puntuación arbitraria de aproximadamente 4. Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, RhmAb2.102 no suprime la hinchazón observada, sino que más bien estabilizó la presente inflamación/hinchazón. Los animales fueron vigilados durante 35 días después de que las puntuaciones inflamatorias entre el placebo y los ratones tratados con RhmAb2.102 eran iguales (Figura 6B y Ejemplo 10). La Figura 6A muestra la puntuación media de la artritis de todas las patas de cada uno de los grupos, mientras que la Figura 6B muestra la puntuación media de la artritis de las patas traseras derechas de los animales que se han utilizado para el análisis histológico el día 35.

45 La histología en las patas traseras derechas de todos los animales se ha realizado con el fin de investigar si el tratamiento con RhmAb2.102 el día 7 podría proteger a los ratones de una lesión articular permanente (Figura 7). La Figura 7A muestra que la inflamación macroscópica en las patas traseras derecha entre los grupos experimentales el día 35 del experimento era similar. Lo más sorprendentemente, sin embargo, se redujeron todos los parámetros

conocidos para la erosión articular. Al puntuar el influjo de células inflamatorias (D), la erosión del cartílago (B), el agotamiento del cartílago PG (E), la muerte de condrocitos (F) y la erosión ósea (C) se observa una drástica disminución en el grupo experimental que ha sido tratado el día 7 con RhmAb2.102, indicando que RhmAb2.102 tiene un fuerte potencial terapéutico en lo que respecta a la prevención de lesiones en las articulaciones durante la inflamación (ejemplo 10). Por lo tanto, la invención se refiere a un método para prevenir o tratar la lesión articular mediante la administración de una molécula de unión tal como se describe en esta memoria a un paciente en necesidad de un tratamiento de este tipo.

Se han realizado otros experimentos CAIA para investigar el efecto terapéutico del tratamiento con RhmAb2.102 los días 5, 6 y 7, respectivamente (Figura 8). En este experimento, RhmAb2.102 se ha inyectado i.v. a fin de suministrar el anticuerpo rápidamente a los sitios de inflamación. En este experimento se han incluido el tratamiento profiláctico el día 3 y un grupo control no tratado. Los procedimientos experimentales se han realizado como en el Ejemplo 10, con la única diferencia de inyecciones con 1 mg de RhmAb2.102 por ratón los días 3, 5 y 6. Tal como se esperaba, RhmAb2.102 el día 3 inhibió la respuesta inflamatoria. El tratamiento de los ratones con inyecciones i.v. de RhmAb2.102 el día 5, 6 ó 7 estabilizó la inflamación (Figura 8) como también se observa en la Figura 6. Es de destacar que los signos de inflamación no se redujeron, mientras que se redujeron todos los parámetros de la erosión articular. Esto demuestra que la erosión articular y la inflamación son dos entidades separadas que se pueden tratar por separado.

Proteínas deiminadas adicionales, que se unen preferentemente a RhmAb2.102, se han identificado por análisis de espectrometría de masas. Además, proteínas deiminadas que se unen preferentemente a RhmAb2.102 y no, o con menor medida, a RhmAb2.101 también han sido identificadas por análisis adicional de espectrometría de masas. Lisados de células de riñón embrionario humano (HEK293) deiminadas con PAD4 humano se inmunoprecipitaron con RhmAb2.101 o RhmAb2.102 (Ejemplo 11) y se sometieron a un sistema nano-LC de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas de resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier LTQ de alto rendimiento, avanzado (LTQ nLC FTMS ULTRA) (Ejemplo 12). Su resolución de masa ultra-alta, la precisión de masa y la sensibilidad en combinación con los cálculos del **índice de abundancia proteica modificado exponencialmente** (emPAI) permitió identificar las proteínas deiminadas que se unen (preferentemente) a RhmAb2.102. Esto se muestra en la Tabla 7 (Ejemplos 11 y 12).

En resumen, los autores de la invención han demostrado en esta memoria que una molécula de unión específicamente reactiva con un epítipo en una molécula seleccionada del grupo que consiste en p15, p17, más en particular un epítipo citrulinado en histona 2A humana deiminada con PAD4 y/o PAD2 humana, un epítipo citrulinado en histona 4 humana deiminada con PAD4 humana, un epítipo citrulinado en histona H4 humana deiminada con PAD2 humana, una histona H3 humana deiminada con PAD2 humana, o una proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas de la tabla 9, e incluso más en particular un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 pueden utilizarse en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias tal como se especifica en esta memoria. El que una molécula de unión dada sea específicamente reactiva con las moléculas mencionadas anteriormente, puede ser fácilmente determinado por el análisis de la capacidad de la molécula de unión de competir con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102 para la unión a un epítipo en p15 o p17 o cualquiera de los epítipos citrulinados mencionados anteriormente.

Habiendo demostrado la eficacia de la composición de unión de acuerdo con la invención, resultará ahora evidente para la persona experta que las enfermedades inflamatorias también pueden tratarse o prevenirse por provocar una respuesta inmune, en donde las moléculas de unión específica de acuerdo con la invención se generan en el cuerpo del propio paciente (in vivo). Una respuesta inmune de este tipo puede ser generada para prevenir que se produzca la enfermedad inflamatoria (profilaxis, vacunas profilácticas) o para mejorar o disminuir las consecuencias de una enfermedad inflamatoria, es decir, la terapia.

Por lo tanto, la descripción también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias por provocar una respuesta inmune in vivo, en el que las moléculas de unión específica se generan reactivas con un epítipo seleccionado del grupo que consiste en un epítipo citrulinado en p15, p17, un epítipo citrulinado en humano PAD4 y/o PAD2 denominado histona 2A humana deiminada con PAD4 y/o PAD2 humana, una histona 4 humana deiminada con PAD4 y/o PAD2 humana, histona H3 humana deiminada con PAD2 humana, y un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38.

Las vacunas o agentes terapéuticos de acuerdo con la descripción pueden comprender efectivamente un epítipo citrulinado específicamente reactivo con una molécula de unión de acuerdo con la descripción. Más en particular, el epítipo citrulinado puede ser un epítipo citrulinado en histona 2A humana deiminada con PAD4 y/o PAD2 humana, una histona 4 humana deiminada con PAD4 y/o PAD2 humana, histona H3 humana deiminada con PAD2 humana, o un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38.

Por consiguiente, un cierto número de enfermedades inflamatorias relacionadas con la citrulina puede ser tratado impedido, que pueden seleccionarse del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedad de Alzheimer, la hepatitis autoinmune, artritis idiopática juvenil, espondiloartropatía, síndrome de Down, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy. Particularmente preferido es la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide.

Dado que esta realización de la descripción se refiere a una respuesta inmune in vivo, una molécula de unión específica preferida es un anticuerpo.

La persona experta será consciente del hecho de que es ventajoso el uso de anticuerpos en la presente invención que no activan o que no activan por completo el sistema inmunológico tales como la activación de células T o la activación del complemento. Por lo tanto, se prefiere el uso de una porción Fc de una IgG4 o IgG2 humana cuando la invención ha de ser puesta en práctica en los seres humanos.

Los péptidos y proteínas tal como se mencionan en esta memoria también pueden ser utilizados como antígenos para la detección de anticuerpos específicos con el fin de diagnosticar enfermedades inflamatorias, más preferiblemente la artritis reumatoide.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Se utilizó un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la gravedad de los síntomas de la artritis. Se indica la puntuación media de la artritis (Figuras 1a, 1c y 1e) y la incidencia de la artritis (Figuras 1b, 1d y 1f). Grupos de 5-6 ratones fueron tratados el día 0 a través de inyección i.p. con anticuerpos anti-colágeno. Los ratones utilizados en los experimentos mostrados en las Figuras 1a y 1b recibieron 1,6 mg de una mezcla de anticuerpos anti-colágeno, mientras que los ratones utilizados en las Figuras 1c-f recibieron 2,4 mg. LPS (25 µg/ratón), junto con un anticuerpo anti-citrulina o de control (RhmAb2.201) se administraron el día 3 a través de inyección i.p. Todos los anticuerpos se administraron a razón de 1 mg/ratón, a menos que se indique lo contrario en el gráfico. Los animales han sido puntuados todos los días hasta el día 13.

Figura 2: Se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de a) RhmAb2.101 y b) RhmAb2.102 para histonas recombinantes humanas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) deiminadas con huPAD2 o huPAD4. Histonas deiminadas así como no deiminadas se inmovilizaron sobre placas ELISA de 96 pocillos (0,3 µg/pocillo). CFC-1 y CFC-0 se recubrieron a la misma concentración y sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente, para la reactividad anti-citrulina específica y como controles de revestimiento. Los pocillos no recubiertos se utilizaron para testar la unión no específica de los anticuerpos. Pocillos recubiertos se incubaron con series de dilución de anticuerpos que oscilaban entre 10 µg/pocillo y 0,000128 µg/pocillo durante 1 hora a TA (eje z). La detección de anticuerpos anti-citrulina unidos se realizó mediante la incubación de los pocillos con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de incubación con sustrato TMB. La DO resultante (eje y) es una medida para la unión de anticuerpos. H1 = Histona 1 recombinante; H1/p2 = Histona 1 huPAD2 recombinante; H1/p4 = Histona 1 huPAD4 recombinante y así sucesivamente (eje x).

Figura 3: Se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de a) RhmAb2.101 y b) RhmAb2.102 para péptidos que contienen citrulina derivados de las histonas H2A humanas. Péptidos que contienen biotina y citrulina derivados de histona 2A se inmovilizaron sobre placas ELISA de 96 pocillos revestidas con neutravidina (0,3 µg/pocillo). CFC-1 y CFC-0 se recubrieron a la misma concentración y sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente, para la reactividad anti-citrulina específica y como controles de revestimiento. Los pocillos no recubiertos se utilizaron para testar la unión no específica de los anticuerpos. Pocillos recubiertos se incubaron con series de dilución de anticuerpos que oscilaban entre 10 µg/pocillo y 0,000128 µg/pocillo durante 1 h a TA (eje z). La detección de anticuerpos anti-citrulina unidos se realizó mediante la incubación de los pocillos con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de incubación con sustrato TMB. La DO resultante (eje y) es una medida para la unión de anticuerpos.

Figura 4: Se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de a) RhmAb2.101 y b) RhmAb2.102 para péptidos que contienen citrulina derivados de fibrinógeno y vimentina. Péptidos que contienen biotina y citrulina derivados de fibrinógeno y vimentina se inmovilizaron sobre placas ELISA de 96 pocillos revestidas con neutravidina (0,3 µg/pocillo). CFC-1 y CFC-0 se recubrieron a la misma concentración y sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente, para la reactividad anti-citrulina específica y como controles de revestimiento. Los pocillos no recubiertos se utilizaron para testar la unión no específica de los anticuerpos. Pocillos recubiertos se incubaron con series de dilución de anticuerpos que oscilaban entre 10 µg/pocillo y 0,000128 µg/pocillo durante 1 h a TA (eje z). La detección de anticuerpos anti-citrulina unidos se realizó mediante la incubación de los pocillos con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de incubación con sustrato TMB. La DO resultante (eje y) es una medida para la unión de anticuerpos.

Figura 5: Se utilizó un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para investigar la aparición de citrulina en las patas. Grupos de 3 ratones fueron tratados el día 0 con 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno a través de inyección i.p., seguido de una inyección i.p. adicional con LPS (25 µg/ratón) el día 3. La puntuación media de la artritis y la incidencia de la artritis se muestran en las Figuras 5A y 5B, respectivamente.

Figura 6: Se utilizó un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto terapéutico de RhmAb2.102 cuando se administra el día 7 después de la inyección de anticuerpos anti-colágeno. Se indican la puntuación media de la artritis de todas las patas (Figura 6A) y la puntuación media de la artritis de las patas traseras derechas (Figura 6B). Grupos de 5 ratones fueron tratados el día 0 a través de inyección i.p. con 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno. LPS (25 µg/ratón) se administró el día 3 a través de inyección i.p. y se inyectaron RhmAb2.102 (1 mg/ratón) o placebo a través de la misma vía el día 7. Se puntuó a los animales todos los días hasta el día 35. Se observó que RhmAb2.102 al menos estabilizaba la presente inflamación.

Figura 7: El análisis histológico se ha realizado en laminillas de tejido teñidas con hematoxilina/eosina y safranina O de las patas traseras derechas de todos los animales CAIA que han sido tratados el día 7 con RhmAb2.102 o placebo (Figura 7). Se han puntuado los siguientes parámetros (escala arbitraria de 0-3) en las laminillas de tejidos teñidas: erosión del cartílago (B), erosión del hueso (C), influjo de células inflamatorias (D), agotamiento PG del cartílago (E) y la muerte de condrocitos (F). La Figura 7A muestra la inflamación macroscópica en las patas traseras derechas entre los grupos experimentales el último día del experimento (día 35). Cada uno de los puntos representa a un solo animal. Las líneas horizontales indican la puntuación media dentro de un grupo experimental. Se puede concluir que la inyección de RhmAb2.102 protege a los ratones contra la lesión articular permanente.

Figura 8: Se utilizó un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto terapéutico de RhmAb2.102 cuando se administra los días 3, 5, 6 y 7 después de la inyección de anticuerpos anti-colágeno. Grupos de 5 ratones fueron tratados el día 0 a través de inyección i.p. con 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno. LPS (25 µg/ratón) se administró el día 3 a través de inyección i.p. RhmAb2.102 (1 mg/ratón) se inyectó i.v. el día 3, 5, 6 ó 7. Se ha puntuado a los animales todos los días hasta el día 19. El gráfico representa la puntuación media de la artritis para cada uno de los grupos experimentales. Se puede extraer la conclusión de que al menos RhmAb2.102 estabilizó la inflamación a un nivel equiparable con el nivel al inicio de la terapia. Rombos: control, Círculos: Día 7, Círculos en blanco: Día 6, Cuadrados: Día 5 y Triángulos: Día 3.

Figura 9: Se utilizó el modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto antiinflamatorio de RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 cuando se administra el día 3 después de la inyección de anticuerpos anti-colágeno. Se indica la puntuación de la artritis de todas las patas. Grupos de 3 ratones fueron tratados el día 0 con inyección i.p. de 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno. LPS (25 µg/ratón) se administró el día 3 a través de inyección i.p., y el mismo día se inyectaron a través de inyección i.v. RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 (1 mg/ratón) o placebo. Los animales fueron puntuados todos los días hasta el día 14. Todos los nuevos anticuerpos RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112 mostraron un efecto antiinflamatorio más alto que RhmAb2.102.

Figura 10: Se utilizó el modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto antiinflamatorio de anticuerpos RhmAb2.102, RhmAb22.101 y RhmAb22.102. Grupos de 3 ratones fueron tratados el día 0 con inyección i.p. de 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno. LPS (25 µg/ratón) así como RhmAb2.102, RhmAb22.101 y RhmAb22.102 (6 mg/ratón) y placebo se administraron asimismo el día 3 a través de inyección i.p. Los animales fueron puntuados en cuanto a la inflamación todos los días hasta el día 10. Todos los anticuerpos ensayados, RhmAb2.102, RmmAb22.101 y RmmAb22.102, protegieron a los ratones contra la inflamación en sus patas. Sólo se muestran los datos de RhmAb2.102 y RmmAb22.101.

Figura 11: Se utilizó un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de A) RhmAb2.102, B) RhmAb2.108, C) RhmAb2.109, D) RhmAb2.110, E) RhmAb2.111, F) RhmAb2.112, G) RmmAb22.101 y H) RmmAb22.102 de histonas recombinantes humanas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) deiminadas con huPAD2 o huPAD4. Histonas deiminadas, así como histonas no deiminadas y BSA fueron inmovilizados sobre placas ELISA de 96 pocillos (0,3 µg/pocillo). CFC-1, CFC-0, SEQ ID NO: 21 se recubrieron a la misma concentración y sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente, para la reactividad anti-citrulina específica y como controles de revestimiento. Pocillos no recubiertos se utilizaron para testar la unión no específica de los anticuerpos. Los pocillos recubiertos se incubaron con series de dilución de anticuerpos que oscilan desde 2,5 ug/pocillo a 0,004 ug/pocillo durante 1 h a TA (eje z). La detección de anticuerpos anti-citrulina unidos se realizó mediante la incubación de los pocillos con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de incubación con sustrato TMB. La DO resultante (eje y) es una medida para la unión de anticuerpos. H1 = Histona 1 recombinante; H1/p2 = Histona 1 recombinante huPAD2; H1/p4 = Histona 1 recombinante huPAD4 y así sucesivamente (eje x).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Anticuerpos monoclonales recombinantes humano y de ratón.

Anticuerpos monoclonales contra antígenos citrulinados de pacientes con RA se seleccionaron inicialmente por medio de presentación de fagos, tal como se describe (Raats et al., J Rheumatology, vol 30, 1696-711, 2003). En síntesis, los repertorios de autoanticuerpos de tres pacientes con RA fueron aislados de su repertorio de células B, y se utilizaron para generar bancos de fragmentos de anticuerpos. Estos bancos se sometieron a cuatro rondas de selección por afinidad contra el péptido cíclico citrulinado CFC1-cyc tal como se describe en el documento WO98/22503. Clones de anticuerpos fueron seleccionados en base a su fuerte reactividad con CFC1-cyc y la falta de reactividad con el CFC0-cyc no citrulinado (documento WO98/22503).

Las secuencias codificadoras de anticuerpos descritas por Raats *et al.*, (J Rheumatology, vol 30, 1696-711, 2003) se sintetizaron de acuerdo con Stemmer et al. (Gene, vol 164, 49-53, 1995), y posteriormente se clonaron en vectores de expresión de mamíferos que codifican isotipos de anticuerpos humanos y de ratón. Los anticuerpos humanos eran del isotipo IgG1 lambda y se denominaron RhmAb2.101, RhmAb2.102.

RhmAb2.101 se sintetizó de acuerdo con el protocolo de Stemmer et al., (Gene, vol 164, 49-53, 1995) basado en la secuencia del clon Ra3 (Raats et al., J Rheumatology, vol 30, 1696-711, 2003) y consiste en un VH derivado de la familia de la línea germinal 3-21, en combinación con un VL derivado de la familia de la línea germinal lambda 1b.

RhmAb2.102 se sintetizó de acuerdo con Stemmer et al. (Gene, vol 164, 49-53, 1995) y comprende una cadena pesada de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 8, en combinación con una cadena ligera de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 9. La cadena pesada de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 8 comprende una globulina conductora de ratón de acuerdo con SEQ ID NO: 12, seguido de la cadena pesada de anticuerpo variable de acuerdo con SEQ ID NO: 13, seguido de la inmunoglobulina IgG1 humana de dominio constante de acuerdo con SEQ ID NO: 14. La cadena ligera de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 9 comprende una globulina conductora de ratón de acuerdo con SEQ ID NO: 12, seguido de la cadena ligera variable del anticuerpo de acuerdo con SEQ ID NO: 15, seguido por el dominio constante lambda humano de inmunoglobulina de acuerdo con SEQ ID NO: 16.

Las secuencias primarias de ARNm de los dominios variables (VH y VL) del anticuerpo monoclonal RhmAb2.101 han sido publicados y fueron depositados en la base de datos EMBL con los números de acceso como se muestra en la tabla 1. Secuencias de anticuerpo humano de tamaño completo se generaron utilizando dominios conductor y constante humanos idénticos tal como se describe para el anticuerpo RhmAb2.102.

Tabla 1

mAb	Base de datos de referencia	Número de acceso	Descripción
RhmAb2.101	EMBL: AJ430751	AJ430751	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (gen IGVH), clon Ra3
RhmAb2.101	EMBL: AJ430766	AJ430766	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (gen IGVH), clon Ra3

Los anticuerpos de control RmmAb13.101, RmmAb13.102 y RmmAb13.103 contra fibrinógeno citrulinado y RhmAb2.201 contra el producto de escisión de 40 kD apoptótico de la proteína U1-70k humana, se obtuvieron comercialmente de ModiQuest Research BV, Schoutstraat 58, 6525 XV Nijmegen, Países Bajos (Nº de Cat., MQ13.101, MQ13.102, MQ13.103 y MQR2.201).

5 Ejemplo 2: Modelo experimental para la inflamación

El modelo de ratón de la artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) comercialmente disponible de ModiQuest Research BV (Nº de Cat.: MQ18.101) se ha utilizado de acuerdo con las especificaciones del fabricante para inducir la artritis en ratones (http://www.modiquestresearch.nl/shop/files/18.101-50MG_2007.08.22.pdf). Para ese fin, el día 0 a ratones macho DBA/J1 (5-6 ratones/grupo) de 8 semanas de edad se les inyectó i.p. una mezcla de 8 anticuerpos anti-colágeno. (Los ratones utilizados en las figuras 1a y 1b recibieron 1,6 mg mezcla de anticuerpos anti-colágeno, mientras que los ratones utilizados en las figuras 1c-f recibieron 2,4 mg). El día 3, los ratones recibieron otra inyección i.p. que contenía 25 µg de LPS mezclados con 1 mg de anticuerpos anti-citrulina (a menos que se indique lo contrario). LPS desencadena una inflamación. Hasta el día 13 del experimento los animales de experimentación fueron puntuados diariamente en cuanto a signos de inflamación en sus patas. La puntuación se ha realizado de acuerdo con la tabla 2. La puntuación máxima de la artritis por animal es de 8.

Se confirmó que anticuerpos anti-citrulina monoclonales de ratón RmmAb13.101, RmmAb13.102 y RmmAb 13.103 eran capaces de mejorar la gravedad de la artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Una mezcla de estos anticuerpos tenía incluso una respuesta más acusada. Esto confirma esencialmente resultados anteriores que los anticuerpos anti-citrulina son capaces de aumentar/inducir la artritis (Kuhn et al, J. Clin Invest, vol 116, 961-871, 2006; Hill et al., J Exp Med, vol 205, 967-979, 2008). Estos resultados se muestran en las Figuras 1a y b, que muestran la "puntuación media de la artritis" y la "incidencia de la artritis", respectivamente, del mismo experimento.

Anticuerpo monoclonal humano RhmAb2.102, redujo o incluso suprimió los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA, mientras que RhmAb2.101 no tuvo efecto alguno en absoluto a la dosis testada (Figuras 1c y 1d).

25 Tabla 2

1-2 dedos de las patas hinchados	0,25
3-4 dedos de las patas hinchados	0,50
Almohadilla plantar o tobillo ligeramente hinchado	0,50 a 0,75
Almohadilla plantar o tobillo +/- dedos de las patas ligeramente hinchados	1,00
Dedos de las patas hinchados + almohadilla plantar ligeramente hinchada	1,25
Dedos de las patas hinchados + almohadilla de la pata hinchada	1,5
Almohadilla plantar hinchada + tobillo hinchado	2,00

La decisión de administrar anticuerpos anti-citrulina el día 3 después de la inyección de anticuerpo anti-colágeno se basó en los datos del experimento descritos anteriormente en esta memoria, que demuestran que los epítopos citrulinados aparecieron en las patas de ratones con artritis inducida experimentalmente aproximadamente el día 4.

Ejemplo 3: Preparación de extracto celular deiminado, electroforesis en SDS-page y transferencia Western.

30 Células COS-1 ($8 \cdot 10^5$) fueron transfectadas transitoriamente con 2 µg de huPAD2 o vector de expresión huPAD4 utilizando el dispositivo de nucleofección AMAXA (programa D-005) junto con el V-kit, y las células se sembraron en 20 ml de medio en un T75.

35 72 horas más tarde las células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 15 µl de tampón de lisis enfriados con hielo (Tris 20 mM pH 7,4, β-mercaptoetanol 10 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10%, inhibidores de proteasa).

Las muestras de células se trataron con ultrasonidos 4 veces durante 15 segundos en hielo. El lisado se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El lisado celular se deiminó durante 30 minutos a 2 horas a 37°C mediante la adición de CaCl_2 y DTE a una concentración final de 10 y 5 mM, respectivamente. Lisados celulares deiminados fueron almacenados a -20°C.

Se añadió tampón de muestra 10x (Tris 0,25 M pH 6,8, 8% de SDS, 35% de glicerol, 2,5% de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol) a los lisados celulares deiminados y se hirvió durante 5 minutos. Lisado correspondiente a aproximadamente $5 \cdot 10^5$ células se cargó en cada una de las pistas de un SDS-PAGE (15% de geles) y se separó, seguido de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond C extra (Amersham Biosciences). La transferencia y la carga fueron verificadas por tinción Ponceau S.

Ejemplo 4: Anticuerpos anti-citrulina terapéuticos reconocen p15 y p17

Borrones de transferencia preparados en el Ejemplo 3 se cortaron en tiras y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con 5% (p/v) de leche en polvo baja en grasa en PBS-Tween (tampón de lavado) para bloquear todos los sitios no específicos. A continuación, los borrones de transferencia se lavaron 5 veces durante 5 minutos con tampón de lavado y las tiras se incubaron durante 1 hora adicional a TA con 4 ml de tampón de lavado que contiene 20 μ g de anticuerpo anti-citrulina. A continuación, las tiras se lavaron 5 veces durante 10 min con tampón de lavado y se incubaron con IgG anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa (Dako) (1 hora a TA) en tampón de lavado (1:2000). Las tiras se lavaron después 3 veces durante 10 min con tampón de lavado, seguido de un lavado de 2 veces con PBS para separar por lavado todo el anticuerpo no unido.

Bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando sustrato quimioluminiscente (PIERCE), y se expusieron a películas de autorradiografía Kodak BioMax XAR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.).

Se observó, que las tiras incubadas con RhmAb2.102 mostraron reactividad con un doblete de proteínas con un peso molecular de aproximadamente 15 y 17 kiloDalton.

Ejemplo 5 Inmunoprecipitación de antígenos:

Para fines de inmunoprecipitación, 20 μ g de anticuerpos anti-citrulina junto con 30 μ L de proteína A-Sepharose fast flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) se añadieron a 330 μ L de lisado celular y se incubaron durante 2 horas a 4°C mientras se gira. Las perlas de Sepharose con proteínas inmuno-unidas se lavaron posteriormente cuatro veces en IPP150 (Tris 10 mM/HCl pH 8, NaCl 150 mM, NP40 al 0,1%, Tween-20 al 0,1%). Se añadió tampón de muestra 2x (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, ditiotretitol 200 mM, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol) a las perlas, y las proteínas se sometieron a SDS-PAGE al 15%. El gel se tiñó durante la noche a TA en disolución de tinción (sulfato de amonio al 10% p/v, ácido fosfórico al 2% p/v (85%), CBB G-250 al 0,1% p/v, metanol al 20% v/v) al tiempo que se balanceaba suavemente. Todas las bandejas de tinción se sellaron con parafilm para evitar la evaporación de metanol. Al día siguiente se realizó una eliminación de la tinción de fondo mediante la incubación de los geles en milli-Q H₂O hasta que la tinción deseada era visible. La disolución de la eliminación de la tinción (mili-Q H₂O) fue reemplazada 2-3 veces, tras lo cual se tomaron imágenes del gel.

Inmunoprecipitaciones con RhmAb2.102 en lisados de COS-1 deiminados tanto con PAD2 como PAD4 humana revelaron bandas de proteínas p15 y p17 prominentes que no podían o apenas podían ser detectadas en el RhmAb 2.101. La tasa de reconocimiento de las proteínas p15 y p17, por lo tanto, se correlaciona bien con las propiedades terapéuticas de estos anticuerpos (Figuras 1a-d).

Ejemplo 6: Análisis de espectrometría de masas de p15 y p17.

Las bandas en p15 y p17 de los geles SDS-page del Ejemplo 3 se escindieron del gel y se analizaron por MALDI-TOF MS. En síntesis, trozos de gel escindidos se lavaron 2 veces con 50 μ L de bicarbonato de amonio 25 mM, y se incubaron durante 30 min para cada una de las etapas de lavado. Un lavado de 15 min se repitió como anteriormente con la adición de acetonitrilo al 30% v/v. Todo el líquido se separó y 25 μ L de bicarbonato de amonio 25 mM + 25 μ L de acetonitrilo se añadieron y se incubaron durante 15 min. De nuevo se separó todo el líquido y los geles se incubaron durante 30 min con 50 μ L de acetonitrilo. Todo el líquido se retiró y los trozos se deshidrataron por incubación durante 2 h a 37°C. Después de la deshidratación, se dejó que los trozos de gel se hincharan de nuevo mediante la adición de 5 μ L de disolución de tripsina (~ 15 ng de tripsina/ μ L en bicarbonato de amonio 25 mM/n-octil- β -D-glucopiranosido 5 mM) y se incubaron en hielo durante 1 hora. Se separó disolución de tripsina en exceso y los trozos de gel se incubaron durante 14 h a 37°C con 5 μ L de bicarbonato de amonio 25 mM/n-octil- β -D-glucopiranosido 5 mM. Los péptidos se extrajeron mediante incubación con 4 μ L de acetonitrilo al 50%/ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%/n-octil- β -D-glucopiranosido 5 mM durante 1 h a TA. Las muestras se sometieron a ultrasonidos durante 2 min en un baño de agua de sonicación, el líquido se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la etapa de extracción. La muestra se secó en una centrifuga de vacío y se sometió a MALDI-TOF MS.

Todos los fragmentos identificados en el análisis MALDI-TOF MS eran atribuibles a las proteínas histonas (Tabla 3).

Tabla 3 Datos de MALDI-TOF

Descripción	Péptido	SEQ ID NO:
racimo de histona 3, H2bb [Mus musculus]	KAMGIMNSFVNDIFERI	Seq id no: 1
racimo de histona 3, H2bb [Mus musculus]	RKESYSIYVYKV	Seq id no: 2
similar a histona H2B [Bos taurus]	KAMGIMNSFVNDIFKRI	Seq id no: 3
racimo de histona 1, H2bn [Bos taurus]	KAMGNMNSFVNDIFERI	Seq id no: 4
racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]	RKTVTAMDVVYALKR	Seq id no: 5
racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]	RDAVTYTEHAKR	Seq id no: 6
racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]	RISGLIYEETRG	Seq id no: 7

Ejemplo 8: Anticuerpo anti-citrulina terapéutico RhmAb2.102 reconoce H2A/p4.

5 Histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 recombinantes humanas (100 µg) se incubaron durante 3 horas con o sin 53,4 mU de huPAD2 o huPAD4 a 37°C. Histonas deiminadas, así como histonas no deiminadas se recubrieron en placas ELISA de 96 pocillos (0,3 µg/pocillo) mediante incubación durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon mediante incubación durante 1 hora con PBS-T + albúmina de suero bovino (BSA) al 1% a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de RhmAb2.101 o RhmAb2.102 en PBS-T + BSA al 1% a partir de una concentración de 10 µg/pocillo. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de 5 lavados con PBS-T y 3 etapas de lavado con PBS. Pocillos incubados con RhmAb2.101 se incubaron durante 15 min y los pocillos incubados con RhmAb2.102 se incubaron durante 10 min con sustrato TMB antes de detener la reacción con H₂SO₄ 2M. La densidad óptica se midió a 450 nm y es una medida de la afinidad de los anticuerpos utilizados.

Ejemplo 7: Anticuerpo anti-citrulina terapéutico RhmAb2.102 reconoce péptido 1

Placas ELISA de 96 pocillos se recubrieron con neutravidina (0,1 µg/pocillo) mediante incubación durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon mediante una incubación de 1 hora con PBS-T + albúmina de suero bovino (BSA) al 1% a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con citrulina derivada de histona y la biotina que contiene los péptidos (0,3 µg/pocillo). Después de otros 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de RhmAb2.101, RhmAb2.102 o RhmAb2.104 en PBS-T + BSA al 1% a partir de una concentración de 10 µg/pocillo. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de 5 lavados con PBS-T y 3 etapas de lavado con PBS. Los pocillos se incubaron durante 5 min con sustrato TMB antes de detener la reacción con H₂SO₄ 2M. La densidad óptica se midió a 450 nm y es una medida de la afinidad de los anticuerpos utilizados.

Ejemplo 9: Anticuerpos anti-citrulina terapéuticos reconocen péptidos de citrulina derivados de fibrinógeno y vimentina.

Placas ELISA de 96 pocillos se recubrieron con neutravidina (0,1 µg/pocillo) mediante incubación durante la noche a 4 grados C. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon mediante una incubación de 1 hora con PBS-T + albúmina de suero bovino (BSA) al 1% a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con citrulina derivada de fibrinógeno y vimentina que contiene los péptidos (0,3 µg/pocillo). Después de otros 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de RhmAb2.101 o RhmAb2.102 en PBS-T + BSA al 1% a partir de una concentración de 10 µg/pocillo. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de 5 lavados con PBS-T y 3 etapas de lavado con PBS. Los pocillos se incubaron durante 5 min con sustrato TMB antes de detener la reacción con H₂SO₄ 2M. La densidad óptica se midió a 450 nm y es una medida de la afinidad de los anticuerpos utilizados.

Ejemplo 10: Potencial terapéutico de RhmAb2.102

El modelo de ratón de la artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) comercialmente disponible de ModiQuest Research BV (Nº de Cat.: MQ18.101) se ha utilizado de acuerdo con las especificaciones del fabricante

para inducir la artritis en ratones (http://www.modiquestresearch.nl/shop/files/18.101-50MG%20_2007.08.22.pdf). Para ese fin, el día 0 a ratones macho DBA/J1 (5 ratones/grupo) de 8 semanas de edad se les inyectó i.p. una mezcla de 8 anticuerpos anti-colágeno. (2,8 mg/ratón). El día 3, los ratones recibieron otra inyección que contenía 25 ug de LPS. LPS desencadena la inflamación. El día 7, cuando la puntuación media de la artritis era de alrededor de 4 (Figura 6A) un grupo recibió una inyección i.v. que contenía 1 mg de RhmAb2.102, si el otro grupo recibió una inyección i.v. con contenido en placebo.

Los animales fueron puntuados diariamente para detectar signos de inflamación en sus patas. La puntuación se ha realizado de acuerdo con la Tabla 2. La puntuación máxima de la artritis por animal es 8. RhmAb2.102 estabilizó la inflamación (Figura 6A).

10 Todas las patas traseras derechas se han utilizado para el análisis histológico. El tejido se fijó durante 4 días en formaldehído al 4%, se descalcificó en ácido fórmico al 5% y, posteriormente, se deshidrató y embebió en parafina. Secciones frontales estándar de 7 µm se montaron en portaobjetos SuperFrost (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania). Se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H y E) para estudiar la inflamación articular (influjos de células, Figura 7D). La gravedad de la inflamación en las articulaciones se puntuó en una escala de 0-3 (0 = sin células, 1 = celularidad leve, 2 = celularidad moderada y 3 = celularidad máxima). La Figura 7A muestra la inflamación macroscópica el día 35. Para estudiar el agotamiento de proteoglicano (PG) a partir de la matriz del cartílago (Figura 7E), las secciones se tiñeron con safranina O (SO), seguido de tinción de contraste con verde rápido. El agotamiento de PG se determinó utilizando una escala arbitraria de 0-3, que oscila desde cartílago normal, totalmente teñido a cartílago desteñido, totalmente agotado de PGs. La muerte de los condrocitos (Figura 7F) se puntuó en una escala de 0 - 3 que oscila desde ninguna pérdida de núcleos de condrocitos hasta superficie del cartílago completamente vacía. La erosión de cartílago y hueso (Figuras 7B y C) se calificaron en una escala de 0 - 3 que oscila desde ninguna lesión a la pérdida completa de la estructura del cartílago o hueso. Los cambios histopatológicos en la articulación se puntuó en cinco secciones semiseriados de la articulación, separada 70 µm. La puntuación se realizó a ciegas, sin conocimiento previo de las condiciones experimentales.

25 Aunque la inflamación macroscópica en las patas traseras derechas entre los grupos era idéntica el día 35 (Figuras 6A y 7A), se observa una disminución drástica en el grupo experimental que recibe RhmAb2.102 en comparación con el grupo control cuando se mira en cualquiera de los siguientes parámetros para la erosión de la articulación: el influjos de células inflamatorias (Figura 7D), la erosión del cartílago (Figura 7B), el agotamiento de PG del cartílago (Figura 7E), la muerte de los condrocitos (Figura 7F) y la erosión del hueso (Figura 7C). Este resultado apoya fuertemente el potencial terapéutico de RhmAb2.102.

Ejemplo 11: Preparación de extracto de HEK293 deiminado con huPAD4 e inmunoprecipitación con RhmAb2.101 o RhmAb2.102

35 Se recogieron células HEK293, se lavaron una vez con PBS, se centrifugaron y 5.105 células se resuspendieron en 15 µl de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris 20 mM pH 7,4, β-mercaptoetanol 10 mM, NaCl 100 mM, 10% de glicerol, inhibidores de la proteasa).

Las muestras de células se trataron con ultrasonidos 4 veces durante 15 segundos en hielo. El lisado se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El lisado celular se deiminó durante 2 horas a 37°C mediante la adición de 1 U de PAD4 humana por cada 2 mg de proteína (ModiQuest Research BV; N° de Cat.: MQ16.203), CaCl₂ 10 mM y DTT 5 mM.

40 La deiminación de lisados se verificó sometiendo los lisados de HEK293 deiminados a SDS-Page (12,5% de geles) seguida por transferencia Western. Las transferencias Western se han inmunoteñido con anticuerpos RhmAb2.101 o RhmAb2.102 y se encontraron positivas. Borradores de transferencia tratados con un anticuerpo irrelevante no mostraron tinción alguna.

45 Posteriormente, se han realizado inmunoprecipitaciones (IP) en lisados de HEK293 deiminados con anticuerpos RhmAb2.101 o RhmAb2.102. En síntesis, 30 µl de proteína A Sepharose Fast Flow se lavaron 5 veces con 1 ml de IPP500 (Tris 10 mM/HCl pH8,0, NaCl 500 mM, NP40 al 0,1% y Tween-20 al 0,1%) y se acoplaron a 20 µg de RhmAb2.101, 20 µg de RhmAb2.102 o no se acoplaron (control negativo). Perlas de proteína A Sepharose/mezclas de anticuerpos han sido incubadas durante 1 h a temperatura ambiente bajo rotación constante. Las perlas se sometieron a 3 lavados con 1 ml de IPP500, un lavado con 1 ml de IPP150 (Tris 10 mM/HCl pH 8,0, NaCl 150 mM, NP40 al 0,1% y Tween-20 al 0,1%), y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente con 300 µl de lisado de HEK293 deiminado durante 2 horas bajo rotación constante. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de IPP150,

después de lo cual una pequeña parte se utilizó para la electroforesis SDS-PAGE para determinar si tuvo éxito el procedimiento IP con las células HEK293. Las proteínas inmunoprecipitadas en RhmAb2.101, RhmAb2.102 y perlas de control se eluyeron con 50 µl de tampón de elución (citrate de Na 100 mM pH 3,0), se neutralizaron con 10 µl de Tris 1 M/HCl pH 9,04 y se almacenaron a -20°C hasta la espectrometría de masas nLC LTQ FTMS ULTRA (Ejemplo 12).

Ejemplo 12: Análisis de espectrometría de masas de proteínas HEK293 deiminadas con huPAD4 e inmunoprecipitadas con RhmAb2.101 y RhmAb2.102

Para separar los PEG de las proteínas inmunoprecipitadas, éstas se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 15% y se procesaron en breve. Las proteínas se cortaron del gel y se digirieron en gel con tripsina tal como se describe en el Ejemplo 6. Las muestras se diluyeron 50 veces antes de someterlas a análisis nLC LTQ FTMS ULTRA.

Las identificaciones de péptidos y proteínas se extrajeron de los datos por medio del programa de búsqueda Mascot, utilizando la base de datos NCBI nr_20081022 con la taxonomía Homo sapiens. Se permitieron las siguientes modificaciones en la búsqueda: carbamidometilación de cisteínas (C) (fijas), oxidación de metionina (M) (variable) y desamidación de asparagina (N), arginina (R) y glutamina (Q) (variable). La deiminación no podía ser utilizada como una herramienta de búsqueda. Este problema podría ser eliminado, ya que la desamidación y la deiminación resultaron ambas en una diferencia de 1 dalton de masa si se compara con argininas no modificados.

La validación de la identificación de proteínas se realizó mediante una secuencia de comandos de desarrollo propio. En síntesis, el software clasifica identificaciones de proteínas en base al número de secuencias de péptidos identificados de forma única, racimos de proteínas que comparten el mismo conjunto de péptidos y valida las proteínas con los siguientes criterios:

Proteínas con 1 péptido deben tener una puntuación de péptidos: > 49

Proteínas con más de 1 péptido deben tener una puntuación de péptidos: > 29

Con los criterios de validación utilizados, los péptidos han sido identificados en las 3 muestras (muestra 1: precipitado de HEK293 con RhmAb2.101; muestra 2: precipitado de HEK293 con Rhm2.102; muestra 3: precipitado de HEK293 con perlas vacías).

El emPAI (Índice de Abundancia de Proteínas Modificado Exponencialmente) se calculó para todas las proteínas validados. El emPAI proporciona una cuantificación aproximada, libre de marcadores, relativa de las proteínas en una mezcla basada en la cobertura de proteínas por el péptido en un resultado de búsqueda de base de datos. Esta técnica ha permitido a los autores de la invención identificar proteínas deiminadas que (preferentemente) se unen a RhmAb2.102. Esto se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9 datos nLC LTQ FTMS ULTRA

Proteína ID	Proteína	Relación 102/101
gi 4503841 ref NP_001460.1	ADN helicasa II dependiente de ATP, subunidad 70 kDa [Homo sapiens]	~
gi 4504279 ref NP_002098.1	histona H3, familia 3A [Homo sapiens]	~
gi 4504263 ref NP_003512.1	familia de histona H2B, miembro E [Homo sapiens]	~
gi 16306566 ref NP_003518.2	histona H2B [Homo sapiens]	~
gi 10800130 ref NP_066409.1	histona 1, H2ad [Homo sapiens]	~
gi 4501955 ref NP_001609.1	familia poli(ADP-ribosa) polimerasa, miembro 1 [Homo sapiens]	~
gi 60097902 ref NP_002007.1	filagrina [Homo sapiens]	~
gi 13399298 ref NP_064455.1	precursor de isoforma a de polipéptido 1 similar a inmunoglobulina lambda	~
gi 113414893 ref XP_001127175.1	PREDICHO: similar a lactotransferrina [Homo sapiens]	~
gi 62122917 ref NP_001014364.1	filagrina 2 [Homo sapiens]	~
gi 4557581 ref NP_001435.1	proteína 5 de unión a ácidos grasos (asociado a psoriasis) [Homo sapiens]	~
gi 13775212 ref NP_112583.1	proteína T de unión a factor 1 modulado en psoriasis [Homo sapiens]	~
gi 21614544 ref NP_002955.2	proteína AB de unión a calcio S100 [Homo sapiens]	~
gi 4758170 ref NP_004397.1	suprimido en precursor de isoforma a en tumores de cerebro malignos 1 [Homo sapiens]	~
gi 4503143 ref NP_001900.1	preproteína catepsina D [Homo sapiens]	~
gi 77539758 ref NP_001029249.1	racimo de histonas 2, H4b [Homo sapiens]	30,2
gi 4501883 ref NP_001604.1	alfa 2 actina [Homo sapiens]	3,2
gi 12056468 ref NP_068831.1	placoglobina de unión [Homo sapiens]	2,8
gi 4501885 ref NP_001092.1	beta actina [Homo sapiens]	2,7
gi 58530840 ref NP_004406.2	isoforma I de desmoplaquina [Homo sapiens]	2,2

gi 57864582 ref NP_001009931.1	hormerina [Homo sapiens]	1,7
gi 74136883 ref NP_114032.2	isoforma a de ribonucleoproteína nuclear U heterogénea [Homo sapiens]	1,0
gi 34419635 ref NP_002146.2	proteína 6 de 70kDa (HSP70B ¹) de choque térmico [Homo sapiens]	1,0
gi 50845388 ref NP_001002858.1	isoforma 1 de anexina A2 [Homo sapiens]	1,0
gi 113425263 ref XP_001133831.1	PREDICHO: similar a proteína L29 ribosomal de 60 S (proteína HIP de unión a heparina de la superficie celular [Homo sapiens]	1,0
gi 4885431 ref NP_005337.1	proteína 1B de 70kDa de choque térmico [Homo sapiens]	0,8
gi 117190254 ref NP_001070911.1	isoforma b de ribonucleoproteína C nuclear heterogénea [Homo sapiens]	0,7
gi 32483416 ref NP_066554.2	neurofilamento, polipéptido pesado de 200 kDa [Homo sapiens]	0,7
gi 4506629 ref NP_000983.1	proteína ribosomal L29 [Homo sapiens]	0,5
gi 5729877 ref NP_006588.1	isoforma 1 de proteína 8 de 70 kDa de choque térmico [Homo sapiens]	0,5
gi 4503471 ref NP_001393.1	factor 1 alfa 1 de alargamiento de la traducción eucariótico [Homo sapiens]	0,5
gi 16751921 ref NP_444513.1	preproteína dermicidina [Homo sapiens]	0,4
gi 4502027 ref NP_000468.1	precursor de albúmina [Homo sapiens]	0,4
gi 34098946 ref NP_004550.2	proteína 1 de unión a elemento sensible a nucleasa [Homo sapiens]	0,0

Ejemplo 13. Generación/selección de una familia de anticuerpos anti-inflamatorios

Bancos de scFv derivados de seres humanos se cribaron frente a formas deiminadas con PAD2 o PAD4 de Histona-2A humana, Histona-4, péptido 1 (AAASGXGKQGGK, SEQ ID NO: 21) y frente al péptido CFC-1 en un método similar tal como se describe en Raats et al., 2003 (Raats, J.M.H., Wijnen, E.W., Pruijn, G.J.M., Van den Hoogen, F.H.M. y W.J. van Venrooij. 2003. J. Rheum 30, 1696-1711).

Anticuerpos seleccionados que mostraban reactividad dependiente de citrulina con CFC-1 y/o péptido 1 (AAASGXGKQGGK, SEQ ID 21) y/o Histona 2a y/o Histona 4 deiminada con PAD, fueron rastreados en cuanto a la reactividad frente a un conjunto de proteínas citrulinadas y/o péptidos derivados de las mismas (Ejemplo 12, Tabla 9), frente a isoformas de Histona deiminadas humanas con PAD2 y PAD4 y frente a péptidos derivados de Histona humana deiminada. Al mismo tiempo, se realizó una inmunoprecipitación en extractos de células humanas deiminadas con PAD2 y PAD4 y el fluido sinovial de pacientes con RA.

Los anticuerpos que inmunoprecipitaron bandas de p15 y/o p17, y/o anticuerpos con perfiles de reactividad ELISA contra epítomos citrulinados (isoformas de Histona deiminadas humanas con PAD2 y PAD4 y/o CFC-1 y/o péptido 1 (AAASGXGKQGGK, SEQ ID 21, y/o epítomos citrulinados derivados de las proteínas enumeradas en 9 equiparable con RhmAb2.102, se clonaron posteriormente en formato IgG1 humana. Anticuerpos IgG humanos de tamaño completo fueron testados en cuanto a su potencial anti-inflamatorio profiláctico y/o terapéutico en un modelo de ratón CAIA, tal como se describe en esta memoria.

Este procedimiento de rastreo proporcionó anticuerpos con potencial antiinflamatorio profiláctico y/o terapéutico en el modelo de ratón CAIA con alta frecuencia.

Ejemplos de nuevos anticuerpos seleccionados de acuerdo con el método anterior son RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, se describen en esta memoria en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 42. La cadena ligera de inmunoglobulina RhmAb2.110 codificada por SEQ ID NO: 10 comprende una globulina conductora de ratón de acuerdo con SEQ ID NO: 12, seguido de la cadena ligera del anticuerpo variable de acuerdo con SEQ ID NO: 41, seguido del dominio constante de inmunoglobulina kappa humana de acuerdo con SEQ ID NO: 11.

Posteriormente, se utilizó el modelo de artritis inducida por colágeno de anticuerpos (CAIA) para testar el efecto antiinflamatorio de RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 y RhmAb2.112, en comparación con RhmAb2.102. Para este fin, todos los anticuerpos fueron producidos transitoriamente en células HEK293. Grupos de 3 ratones DBA/J1 fueron tratados el día 0 con una inyección i.p. de 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno (MS18.101). Se administraron LPS (25 µg/ratón), así como RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111, RhmAb2.112 y RhmAb2.102 (1 mg/ratón) y placebo mediante inyección i.p. el día 3. Todos los animales han sido puntuados diariamente en cuanto a la inflamación hasta el día 10.

En este experimento todos los nuevos anticuerpos generados mostraron una respuesta inflamatoria mejor en comparación con RhmAb2.102, RhmAb2.1109, RhmAb2.110, abolieron por completo la inflamación, mientras que RhmAb 2.112, la abolió casi, y RhmAb 2.111 y rhmAb 2.108 redujo fuertemente los signos de inflamación en los animales ensayados. Figura 9.

Ejemplo 14: Anticuerpos monoclonales de ratón.

Anticuerpos contra un péptido sintético que contiene citrulina de acuerdo con la invención se han desarrollado en ratones DBA/J1. El día 125 después del comienzo del proceso de inmunización se tomaron y se analizaron muestras de suero para una respuesta del antígeno específica para la citrulina. Todos los ratones mostraron un título de suero específico para el antígeno específico en los momentos ensayados.

Con el fin de producir líneas celulares de hibridoma, los bazos se diseccionaron después del último estímulo, se recogieron esplenocitos del bazo y se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón (NS-1) de acuerdo con procedimientos de ModiQuest BV. La especificidad del anticuerpo en los sobrenadantes de hibridoma se ha rastreado en antígeno que contiene citrulina, así como en el equivalente no citrulinado.

Esto resultó en los clones de hibridoma (DSMZ n°s de acceso ACC 3031 y ACC 3032), produciendo RmmAb22.101 y RmmAb22.102, respectivamente; SEQ ID NO 44 y SEQ ID NO 45.

Posteriormente, el modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) se utilizó para testar el efecto antiinflamatorio de RmmAb22.101 y RmmAb22.102 en comparación con RhmAb2.102. Grupos de 3 ratones DBA/J1 fueron tratados el día 0 con una inyección i.p. de 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno (MQ18.101). Se administraron LPS (25 µg/ratón), así como RmmAb22.101, RmmAb22.102 y RhmAb2.102 (6 mg/ratón) y placebo mediante inyección i.p. el día 3. Todos los animales han sido puntuados diariamente en cuanto a la inflamación hasta el día 10.

Anticuerpos RhmAb2.102, RmmAb22.101 y RmmAb22.102 protegían completamente a los ratones contra la inflamación en sus patas. Figura 10.

Ejemplo 15: Nuevos anticuerpos anti-citrulina terapéuticos muestran patrones de reconocimiento similares a epítopos citrulinados en comparación con RhmAb 2.102.

De manera similar a los experimentos descritos en los Ejemplos 7 y 8 los anticuerpos RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111, RhmAb2.112, RmmAb22.101 y RmmAb22.102 recién generados se analizaron en ELISA en cuanto a su reactividad en diversos objetivos deiminados en comparación con RhmAb 2.102.

Histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 humanas recombinantes (100 µg) se deiminaron tal como se describe en el Ejemplo 7.

Histonas deiminadas así como no deiminadas se recubrieron en placas ELISA de 96 pocillos (0,3 µg/pocillo) mediante incubación durante la noche a 4°C.

A continuación de las histonas deiminadas también se ensayaron anticuerpos en un conjunto de péptidos biotinilados. Ambas en sus formas citrulinadas, así como no citrulinadas. Se realizó un recubrimiento de péptidos tal como se describe en el ejemplo 8.

Todos los pocillos recubiertos se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T) y se bloquearon mediante una incubación de 1 hora con PBS-T + albúmina de suero bovino (BSA) al 1% a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de los anticuerpos en PBS-T + BSA al 1% a partir de una concentración de 2,5 µg/pocillo. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con el HRP anti-humana de conejo (1:2000) durante 1 hora a TA, seguido de 5 lavados con PBS-T y 3 etapas de lavado con PBS. La tinción durante 10 min con sustrato TMB antes de detener la reacción con H₂SO₄ 2 M. La densidad óptica se midió a 450 nm y es una medida relativa de la afinidad de los anticuerpos utilizados. Esto demostró claramente que todos los anticuerpos terapéuticos tienen un patrón de tinción muy similar en comparación con el anticuerpo terapéutico RhmAb2.102. Sólo los anticuerpos monoclonales de ratón no muestran reactividad alguna con el péptido Cfc1. Todos los anticuerpos terapéuticos tienen una muy alta reactividad con la de un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 21, así como con Histona 2A/p2, Histona 2A/p4 e Histona 4/p2, y muestran una ligera reactividad con Histona 3/p2.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ModiQuest BV
- <120> Agentes Anti-Inflamatorios
- <130> 134 WO
- <150> EP09178658.2
- < 151> 10-12-2009
- <160> 45
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 1

Lys Ala Met Gly Ile Met Asn Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg
1 5 10 15

Ile

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 2

Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Ile Tyr Val Tyr Lys Val
1 5 10

<210> 3

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Bos Taurus

<400> 3

Lys Ala Met Gly Ile Met Asn Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ile

<210> 4

20 <211> 17

<212> PRT

<213> H2bn Bos Taurus

<400> 4

ES 2 587 083 T3

Lys Ala Met Gly Asn Met Asn Ser Phe Val Asn Asp Ile Phe Glu Arg
1 5 10 15

Ile

<210> 5

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Arg Lys Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg
1 5 10 15

<210> 6

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg
1 5 10

15 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

20 Arg Ile Ser Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly
1 5 10

<210> 8

<211> 1431

<212> ADN

<213> ser humano

25 <400> 8

ES 2 587 083 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcccag 60
gtacagctgc agcagtcagg gggaggcctg gtcaggcccg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct cgggattcaa cctcagcacc aattttatga actgggtccg ccagagtcca 180
gggaaggggc tggagtggat ctcatccatt agttggactg gtgatgatat atatgaggca 240
gactcactga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagaacac agtgtatctg 300
caactgagca gcctgacacc ggacgacacg gctgtctatt actgtgcgag agtgcgccag 360
tatcgtgatg gtagggggta tgtcgttaat gacgctcttg atatttgggg ccaagggaca 420
atggtcaccg tgtcgtcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 480
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggtgcc tggtaagga ctacttcccc 540
gaaccggtga cgggtcgtg gaactcaggc gccctgacca gggcgtgca caccttcccc 600
gctgtcctac agtccctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 660
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 720
gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca 780
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtaaggt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggtgta atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaagccct cccagcccc 1080
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagcccogag aaccacaggt gtacaccctg 1140
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1431

<210> 9

<211> 705

5 <212> ADN

<213> ser humano

<400> 9

ES 2 587 083 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcccag 60
 tctgtgttga ctacagccgc ctcaatgtct gcggccccag gacagaaggt cacgatctcc 120
 tgctctggaa gcagctccaa cattggcaat aattatgtat cctggtatca gcaagtccca 180
 ggaacagccc ccaaactcct cttttatgac gacaataaga gaccctccgg aattcccggc 240
 cgattctctg gctccaagtc tgccacgtcc gccaccctgg gcatcaccgg actccaggct 300
 ggggacgagg cagattatta ctgcggtatca tgggatgata acctgagtggt tgtgcttttc 360
 ggcggagggg ccaagctgac cgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 420
 ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt 480
 gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tgggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaaaca agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 600
 ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgccca ggtcacgcat 660
 gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gtcca 705

<210> 10

<211> 699

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<400> 10

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattccgac 60
 atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag aatcaccatc 120
 acttgccggg caagtcagag cattagcaac tatttaaatt ggtatcagca gaaaccaggg 180
 aaagtcacct agctcctgat ctatgctgca tccagcttgc aaagtggggt ccagcaagg 240
 ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc agtctcacca tcagcagtct gcaacctgaa 300
 gatttcgcaa cttactactg tcaacagagt tacagtacc ctctgacttt cggcggaggg 360
 accaaggtgg aatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt ccgccaatct 420
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagc ggagagtggt 699

<210> 11

<211> 321

ES 2 587 083 T3

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 11

```
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcata ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag      120
tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag      300
agcttcaaca ggggagagtg t                                     321
```

5 <210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15
```

10 Val His Ser

<210> 13

<211> 127

<212> PRT

<213> ser humano

15 <400> 13

ES 2 587 083 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Leu Ser Thr Asn
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Arg Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Trp Thr Gly Asp Asp Ile Tyr Glu Ala Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Arg Gln Tyr Arg Asp Gly Arg Gly Tyr Val Val Asn Asp
100 105 110

Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 14

ES 2 587 083 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

ES 2 587 083 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 15

ES 2 587 083 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Ala Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp Asp Asn Leu
85 90 95

Ser Val Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 16

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

ES 2 587 083 T3

<210> 17

<211> 330

<212> ADN

<213> homo sapiens

5 <400> 17

cagtcctgtgt	tgacgcagcc	gccctcaatg	tctgcggccc	caggacagaa	ggtcacgatac	60
tcctgctctg	gaagcagctc	caacattggc	aataattatg	tatcctggta	tcagcaagtc	120
ccaggaacag	ccccaaaact	cctcatttat	gacgacaata	agagaccctc	cgggaattccc	180
ggccgattct	ctggctccaa	gtctgccacg	tccgccaccc	tgggcatcac	cggactccag	240
gctggggacg	aggccgatta	ttactgcgga	tcatgggatg	ataacctgag	tgttctgctt	300
ttcgcgggag	ggaccaagct	gaccgtccta				330

<210> 18

<211> 381

<212> ADN

10 <213> homo sapiens

<400> 18

caggtacagc	tgcagcagtc	agggggaggc	ctggtcaggc	cgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctccggatt	caacctcagc	accaatttta	tgaactgggt	ccgccagagt	120
cgaggggaag	ggctggagtg	gatctcatcc	attagttgga	ctggatgatga	tatatatgag	180
gcagactcac	tgaagggcgg	atcaccgtc	tccagagaca	acgccaagaa	cacagtgtat	240
ctgcaactga	gcagcctgac	accggacgac	acggctgtct	attactgtgc	gagagtgcgc	300
cagtatcgtg	atggtagggg	gtatgtcgtt	aatgacgctc	ttgatatttg	gggccaaggg	360
acaacggtca	ccgtgtcgtc	a				381

<210> 19

<211> 330

15 <212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 19

ES 2 587 083 T3

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctccgtg tctgcgaccc caggacagaa ggtctccatc 60
tcctgctctg gaagcggcgc caacattggc aatacttatg tctcctggta ccaacaactc 120
ccaggatcag cccccaaact cctcatttac gacgataatc agcgaccctc tgggattcct 180
gaccgattct ctggcgccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcgc cgggctccag 240
actggggacg aggccgacta tttctgcgga gcatgggaca gtagcctgag tgcttttgc 300
ttcggatctg ggaccagct caccgtttta 330

<210> 20

<211> 366

5 <212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 20

caggtgcagc tgcaggagtc tggcccaggg gtggtgaagc cttcggagac gctgtctcta 60
acctgcaatg tctccgggta ctccatcagt gatggctact actggggctg gatccggcag 120
ccccagggga ggggactgga gtggattgga agtgtctatt ataatcgaaa caccttctac 180
aattcgtccc tcgagagtcg agtcagtctt tcaactgaca cttccaagaa ccacctctcc 240
ctgacgatga gcgatgtgac cgccgcagac acagccgttt atttctgttc gagagggcga 300
tccaaatttg gtccaaatga tgcttttgaa atttggggcc aaggggaccac ggtcaccgtg 360
tcgtca 366

<210> 21

10 <211> 12

<212> PRT

<213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

15 < 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

<400> 21

Val His Arg Leu Leu Xaa Lys Gly Asn Tyr Ser Glu
 1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

5 <213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

10 <400> 27

Gly Asn Tyr Ser Glu Xaa Val Gly Ala Gly Ala Pro
 1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

15 <213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

20 <400> 28

Ala Gly Asn Ala Ala Xaa Asp Asn Lys Lys Thr Arg
 1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

25 <213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

5 <400> 29

Asp	Asn	Lys	Lys	Thr	Xaa	Ile	Ile	Pro	Arg	His	Leu
1				5					10		

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

10 <213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

15 <400> 30

Thr	Arg	Ile	Ile	Pro	Xaa	His	Leu	Gln	Leu	Ala	Ile
1				5					10		

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

20 <213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

< 223> X = citrulina

25 <400> 31

<213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (8)..(8)

5 < 223> X = citrulina

<400> 34

Leu Ser Glu Gly Gly Gly Val Xaa Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His
1 5 10 15

Gln Ser Gln Cys Lys Asp
20

<210> 35

<211> 22

10 <212> PRT

<213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (15)..(15)

15 < 223> X = citrulina

<400> 35

Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Xaa His
1 5 10 15

Gln Ser Ala Cys Lys Asp
20

<210> 36

<211> 22

20 <212> PRT

<213> ser humano

<220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (8)..(8)

< 223> X = citrulina

<400> 36

Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Xaa Gly Pro Arg Val Val Glu Arg His
1 5 10 15

Gln Ser Ala Cys Lys Asp
20

5 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> ser humano

<220>

10 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (9)..(9)

< 223> X = citrulina

<400> 37

Glu Pro Thr Asp Ser Leu Asp Ala Xaa Gly His Arg Pro Val Asp Arg
1 5 10 15

Arg

15 <210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> ser humano

<220>

20 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA

< 222> (4)..(11)

< 223> X = citrulina

<400> 38

ES 2 587 083 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggcattagc aactatthaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtcc ctaagctcct gatctatgct gcaccagct tgcaaagtgg ggtcccagca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcagtctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctgac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 42

<211> 369

5 <212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 42

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcccagga ctggtgaagt ctccggagac cctgtctctc 60
 acctgccatg tctccggtta ctccatcagc gatggttact actggggctg gatccggcag 120
 tccccagga agggactgga gtggattggg agtaggcac c atggggggaa cgccacctc 180
 tacaatccgt cacacaagag tcgagtcagc ctcttaattg acacctcaa gaaccagttg 240
 tcctgaaga tgcactctgt gaccgcccga gacacggcca tttactactg tgcgagaggg 300
 ctcatatcg atggttgga cgatgctttt gagatctggg gccgagggac cacggtcacc 360
 gtgtcgtca 369

<210> 43

10 <211> 330

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 43

tcctatgtgc tgactcagcc accctcaacg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaggttctc caacatcggg cttaataatg taaactggtg tcagcaactc 120
 ccagaaacgg cccccaaact cctcatctat agtagtgatc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tggttgggtg 300
 ctccggcgag gaaccaagct gaccgtccta 330

15 <210> 44

ES 2 587 083 T3

<211> 367

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 44

	cggatccagt	tggtgcagtc	tggacctgaa	ctgaagaagc	ctggtgaggc	agtcaagatc	60
	tcctgtaagg	cttctggata	taccttcaca	aactatggta	tgcactggat	gaaacagact	120
	ccagaaagg	atthtaggtg	gatgggctgg	ataaacacct	acagtggaga	ggcaacatat	180
	gttgatgact	tcaagggacg	cttcgccttc	tctttgggaa	cctctgccag	cactgcctat	240
	ttgcagatca	acaacctcaa	gaatgacgac	acggctacat	atthctgtht	aagaggetat	300
5	acttaccaaa	gthctgacga	agggggcgac	tactggggcc	agggcaccgc	tctcacagtc	360
	tcctcag						367

<210> 45

<211> 338

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 45

	gatgthgtga	tgaccagac	tcactcact	thgtcgthta	ccactggaca	accagcctcc	60
	atctcttgca	agtcaagtca	gagcctcttg	gatagtgatg	gaaagacata	thtgaattgg	120
	thgtthcaga	ggccaggcca	gtctccaaag	cgctaatat	atctggtgtc	taactggac	180
	tctggagtcc	ctgacaggtt	cactggcagt	ggatcaggga	cagatthcac	actgaaaatc	240
	agcagagtgg	aggtgagga	thtgggaatt	tattattgct	ggcaaggtac	acatthtccg	300
	tacacgttcg	gaggggggac	caatthggaa	ataaaacg			338

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo, específicamente reactivo con un epítopo citrulinado sobre
- a. histona 2A humana deiminada con PAD4 humana y/o
 - b. histona 2A humana deiminada con PAD2 humana y/o
 - 5 c. histona 4 humana deiminada con PAD4 humana y/o
 - d. histona 4 humana deiminada con PAD2 humana y/o
 - e. histona 3 humana deiminada con PAD2 humana,
- para uso en la prevención o el tratamiento de artritis reumatoide,
- 10 - en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión específico codificado por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 42, o
- en donde el anticuerpo se produce por parte de líneas celulares de hibridoma depositadas ante la DSMZ bajo el número de acceso ACC 3031 o ACC 3032.
- 15 2. Anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es específicamente reactivo con un epítopo citrulinado en un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38.
3. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos recombinantes, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs), regiones de unión a antígeno de fragmento (Fabs) y anticuerpos de dominio sencillo (sdabs).
- 20 4. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 3, en donde el anticuerpo es:
- a. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 18 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 17, o
 - 25 b. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 20 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 39, o
 - c. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 40 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 41,
 - 30 d. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 18 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 19, o
 - e. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 42 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 43, o
 - 35 f. un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma depositada ante la DSMZ bajo el número de acceso ACC 3031 o ACC 3032.

5. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 44 en combinación con una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por SEQ ID NO: 45.
- 5 6. Anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 17.
7. Anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 19.
- 10 8. Anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 39.
- 15 9. Anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 41.
10. Anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 42 y una cadena ligera que comprende un dominio variable codificado por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 43.
- 20 11. Anticuerpo, tal como se produce por líneas celulares de hibridoma depositadas ante la DSMZ bajo el número de acceso ACC 3031 o ACC 3032.

Fig. 1

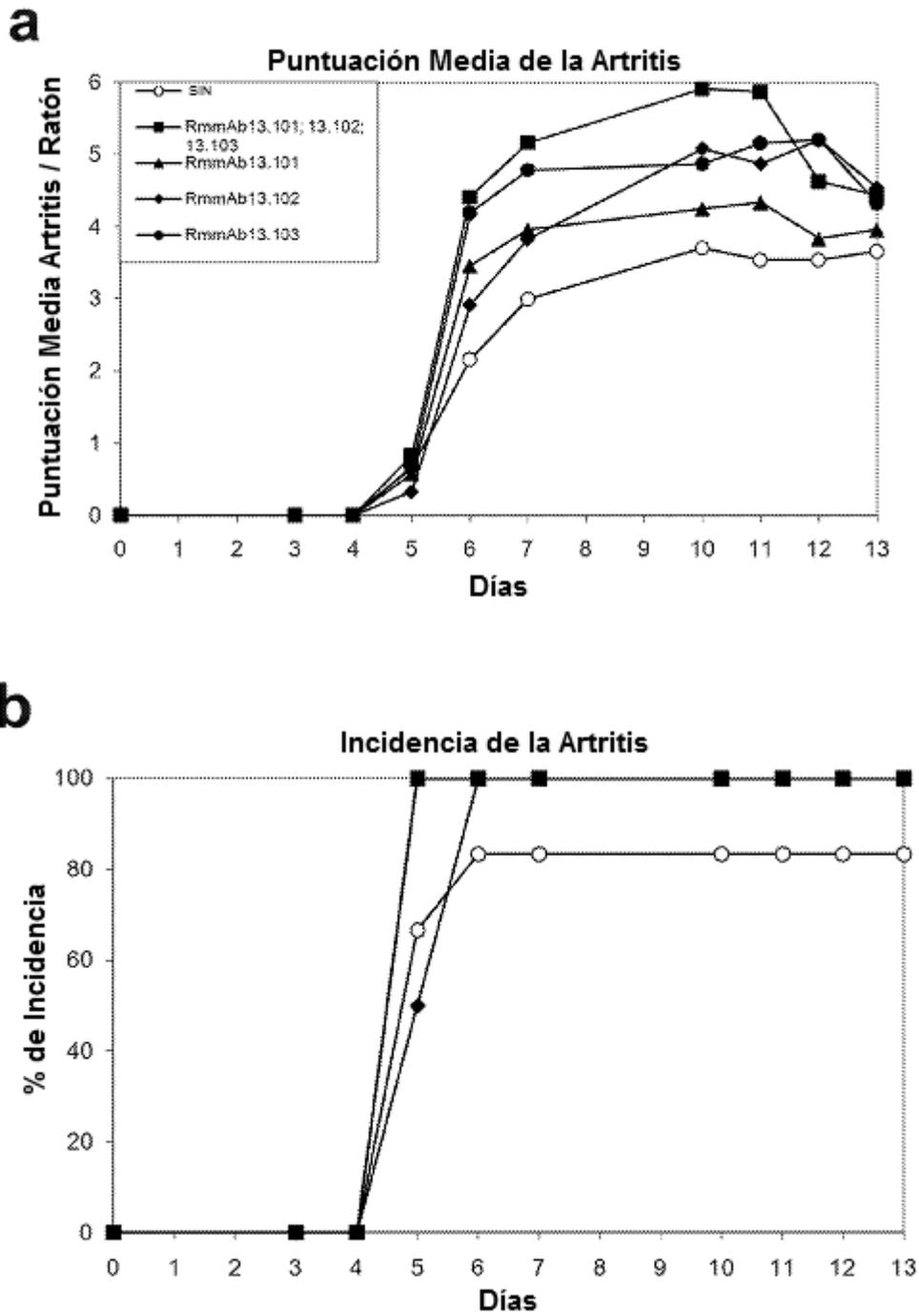


Fig. 1

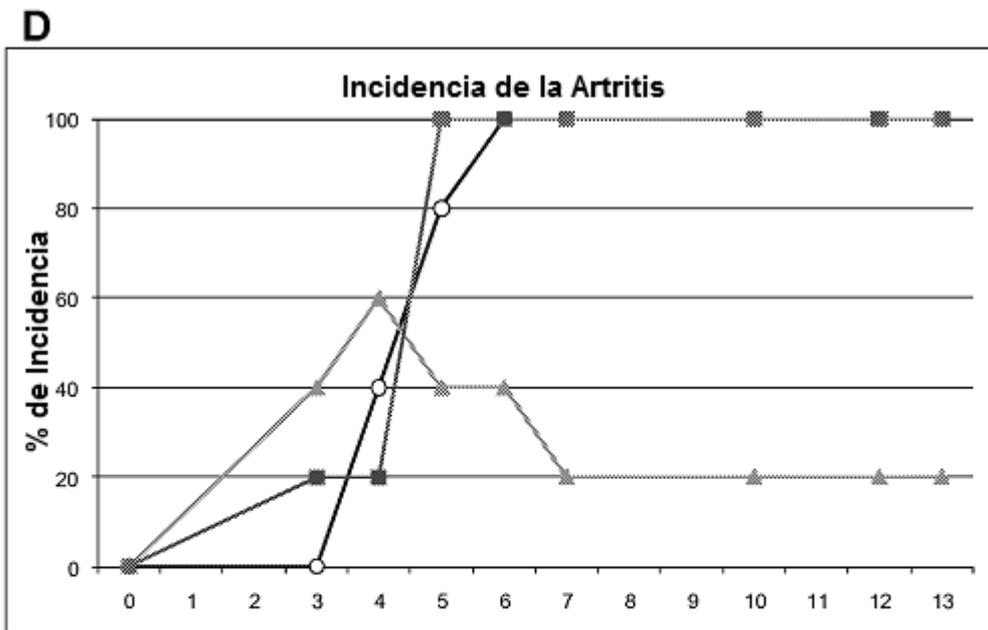
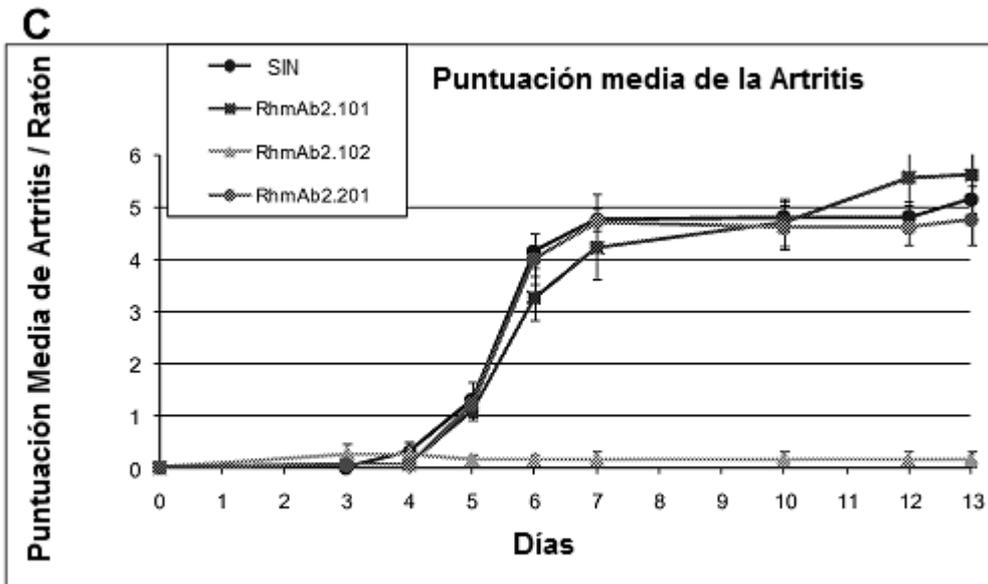
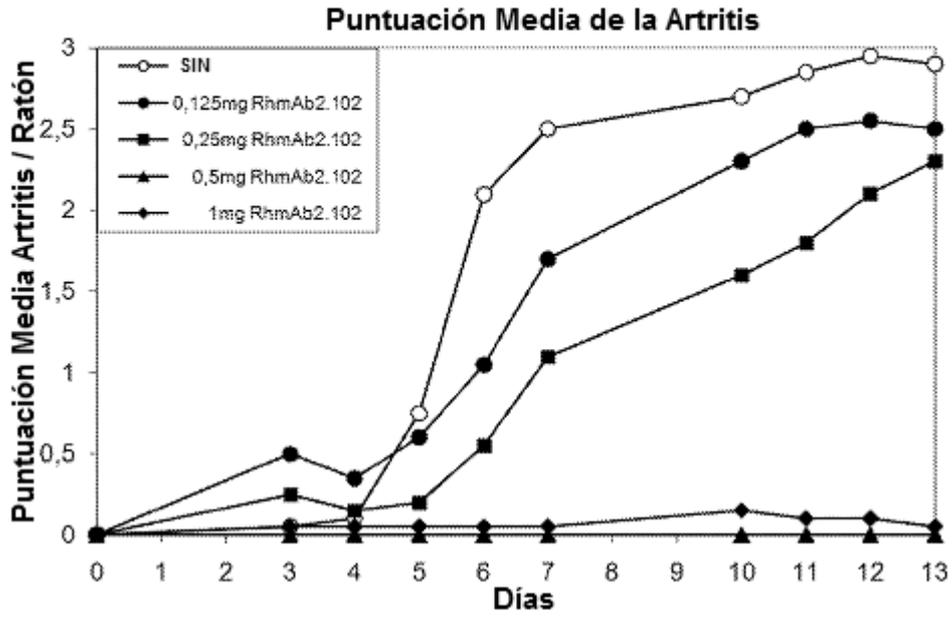
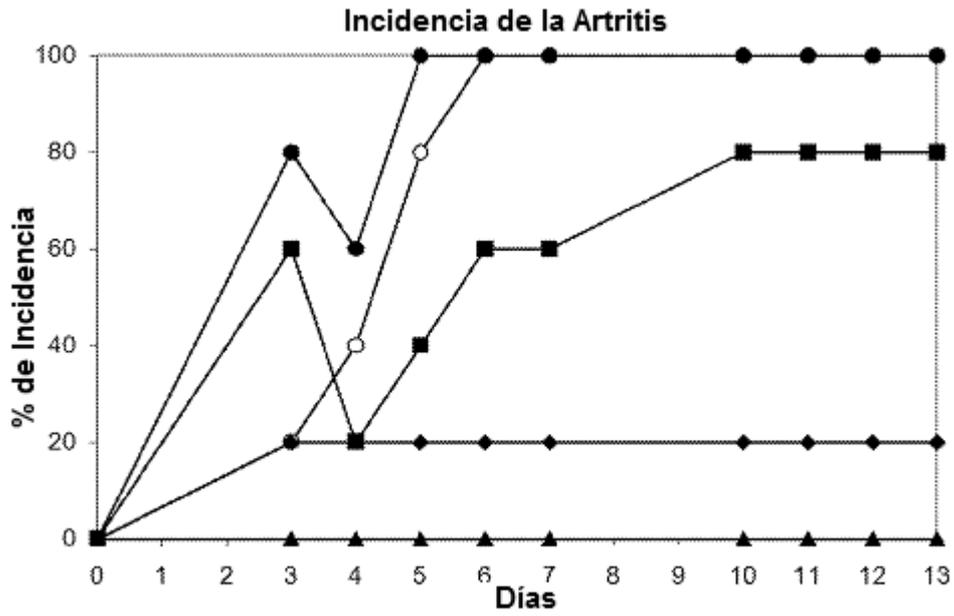


Fig. 1

e



f



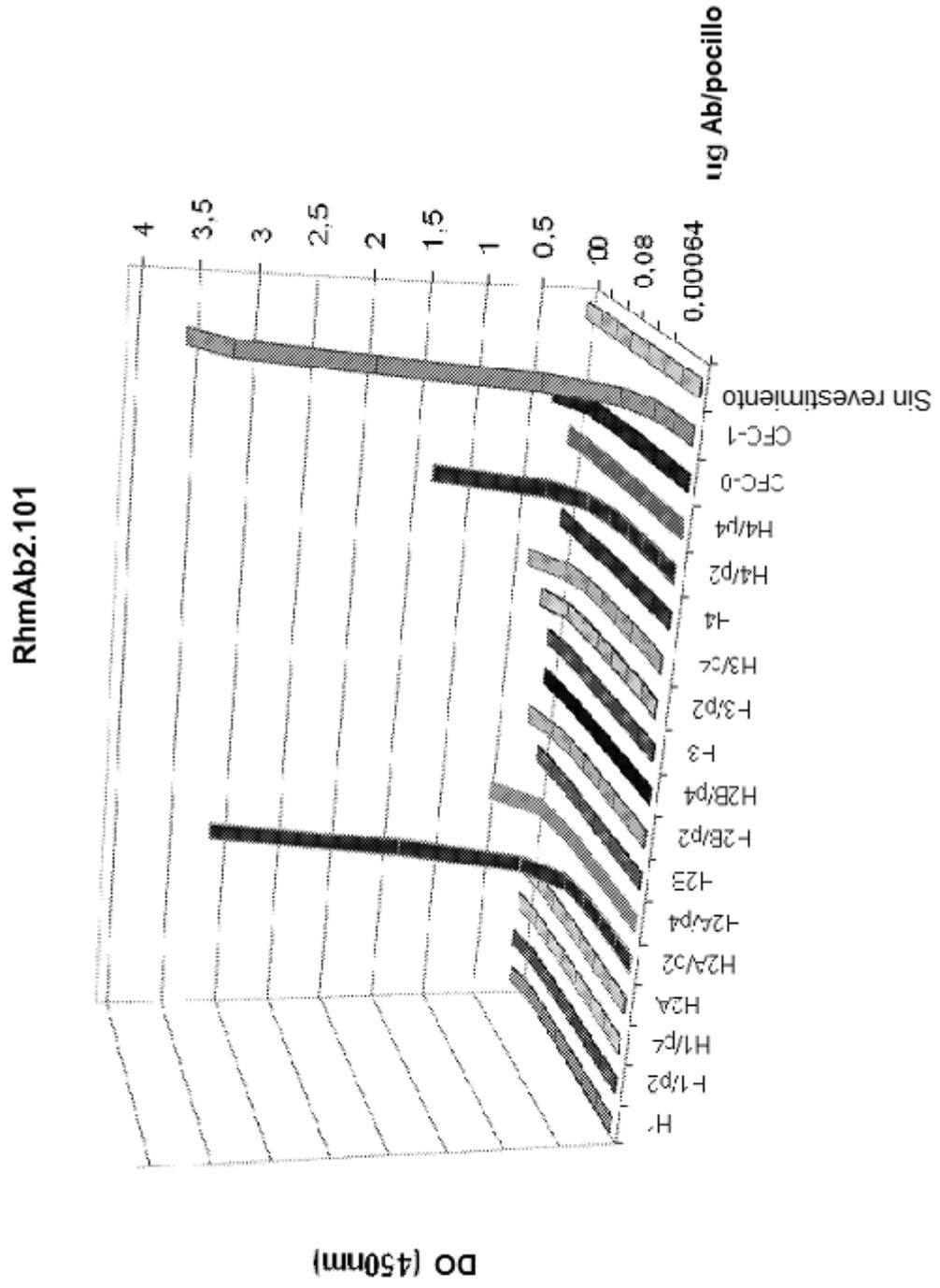


Fig. 2A

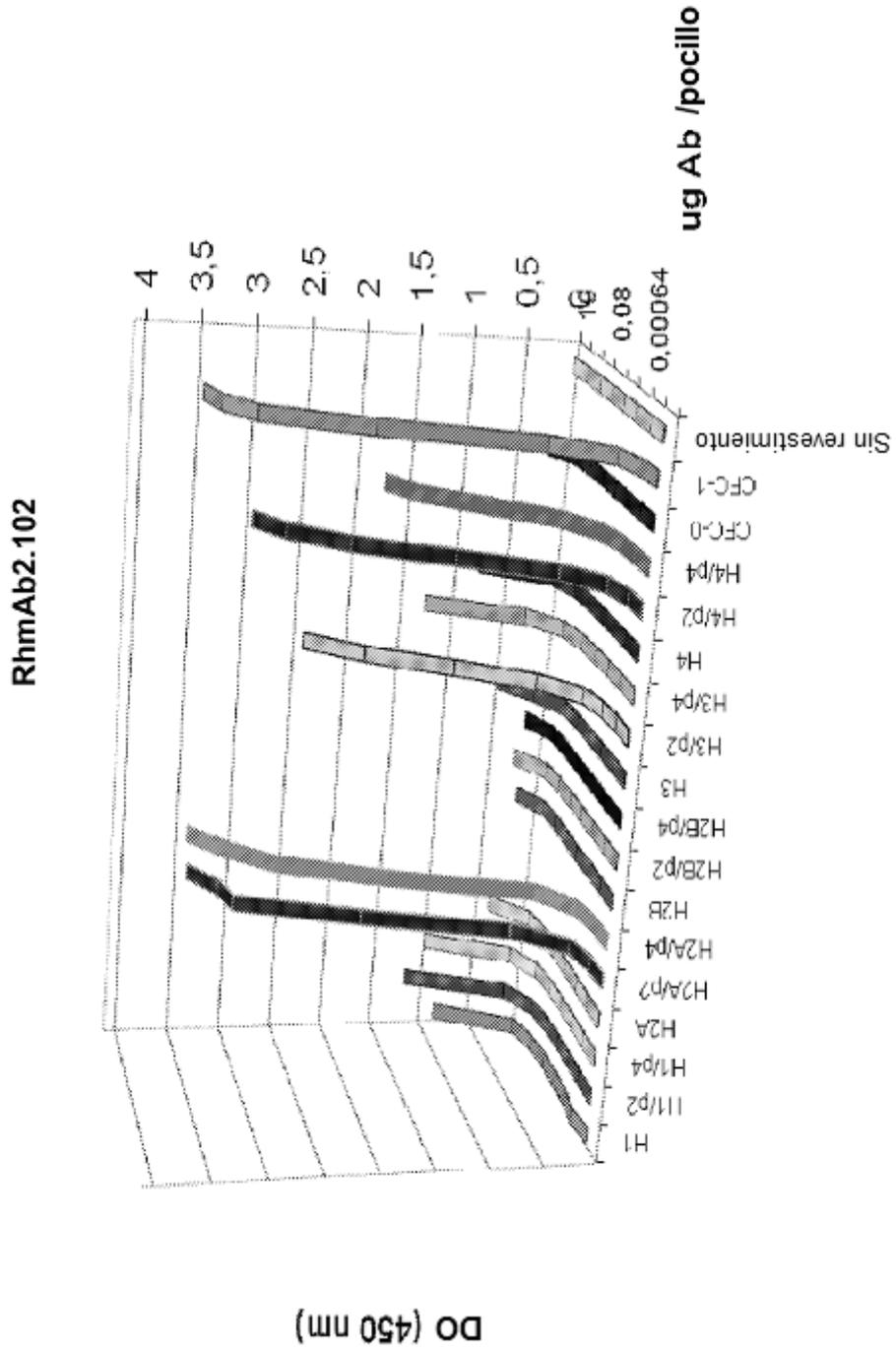


Fig. 2B

RhmAb2.101

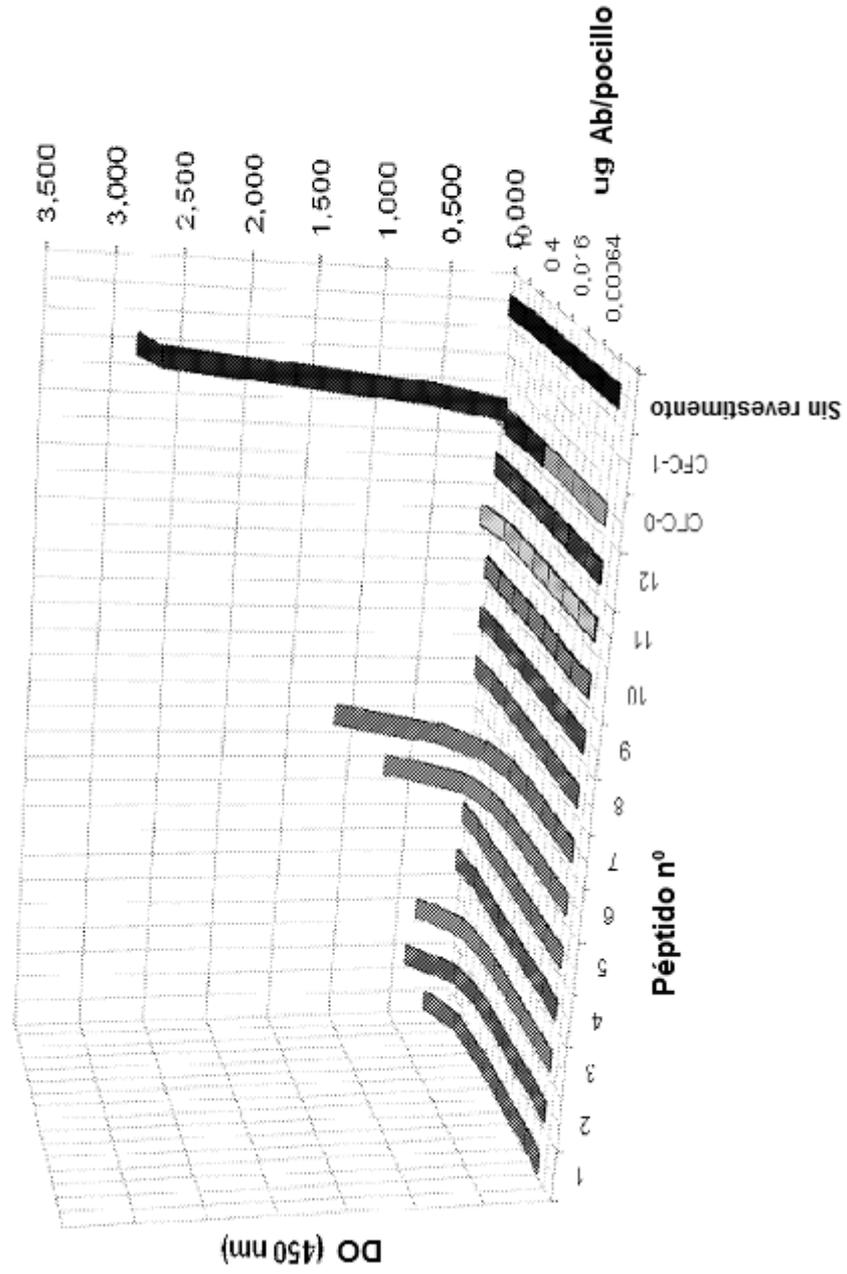


Fig. 3A

RhmAb2.102

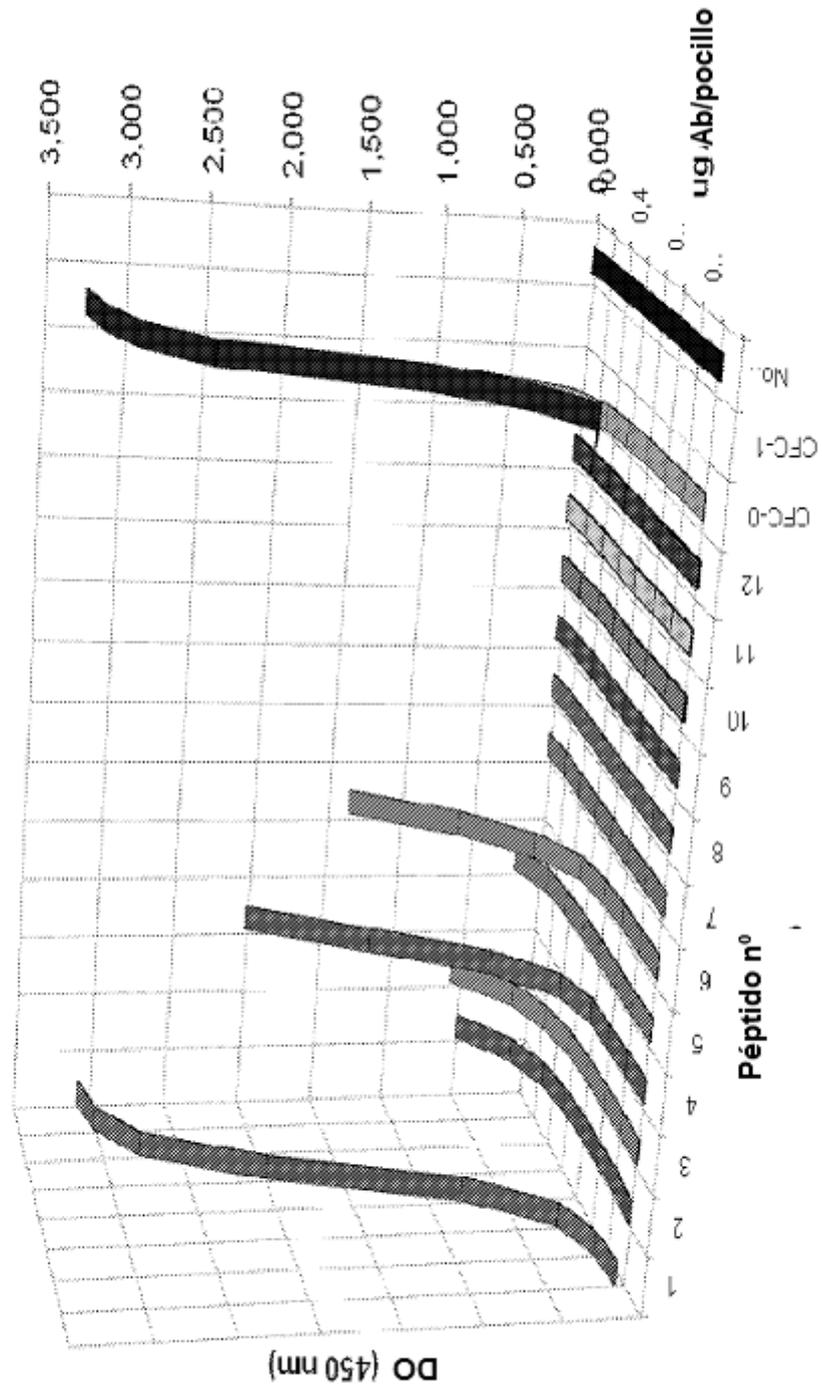


Fig. 3B

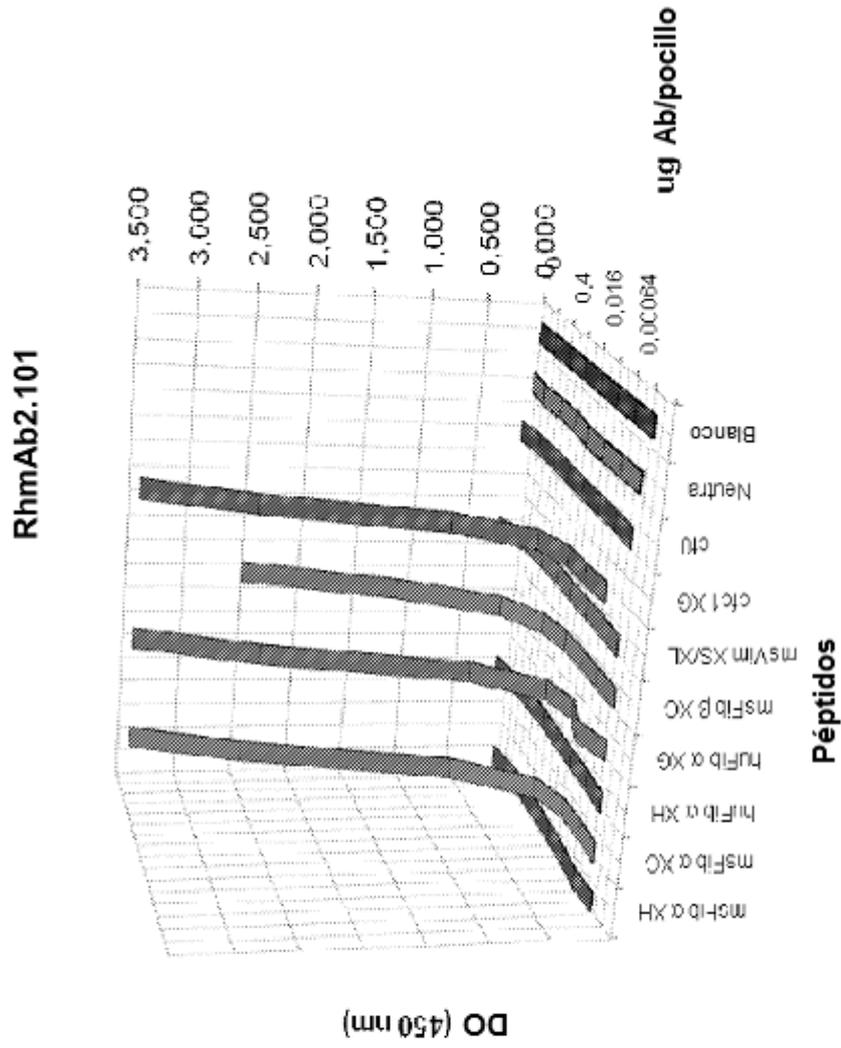


Fig. 4A

Fig. 4B

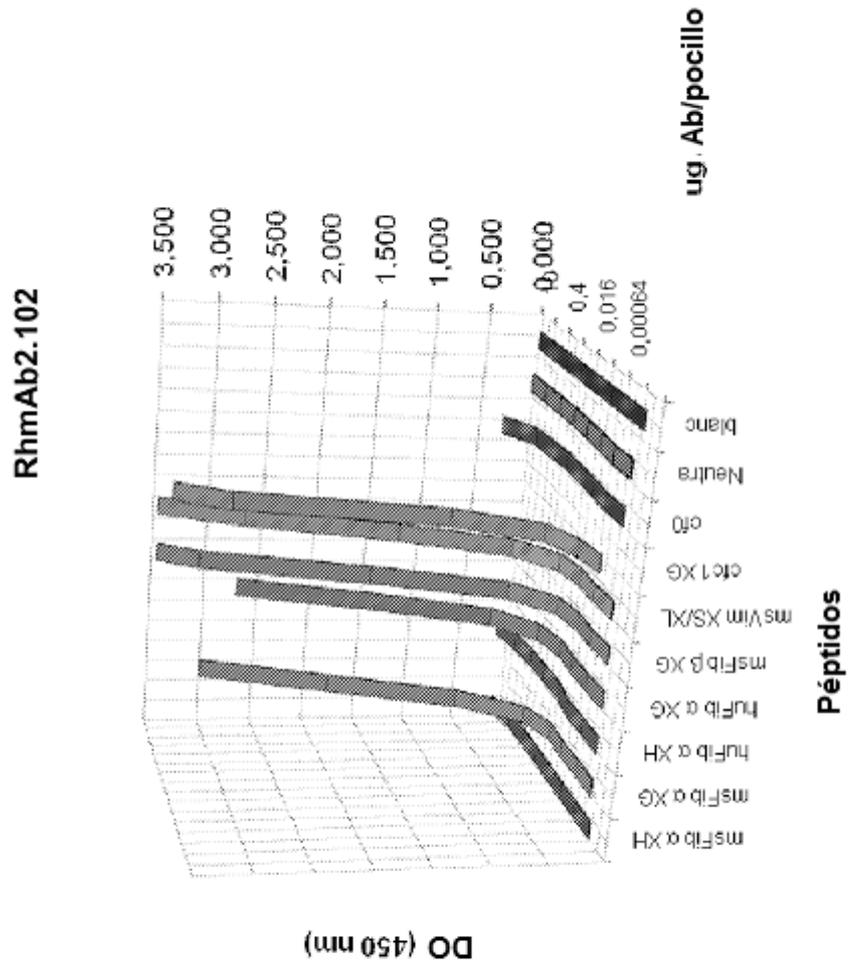


Fig. 5A

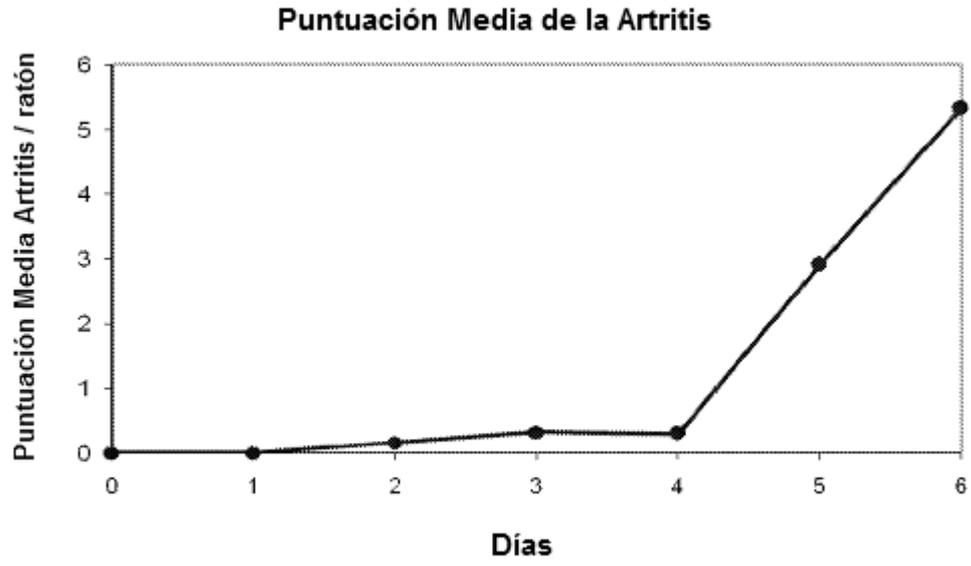


Fig. 5B

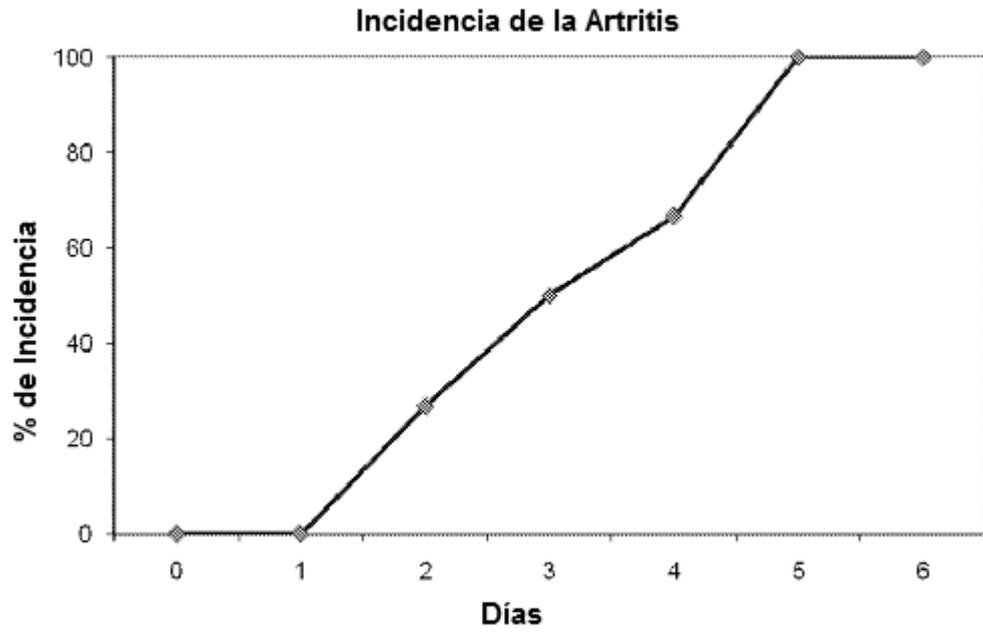
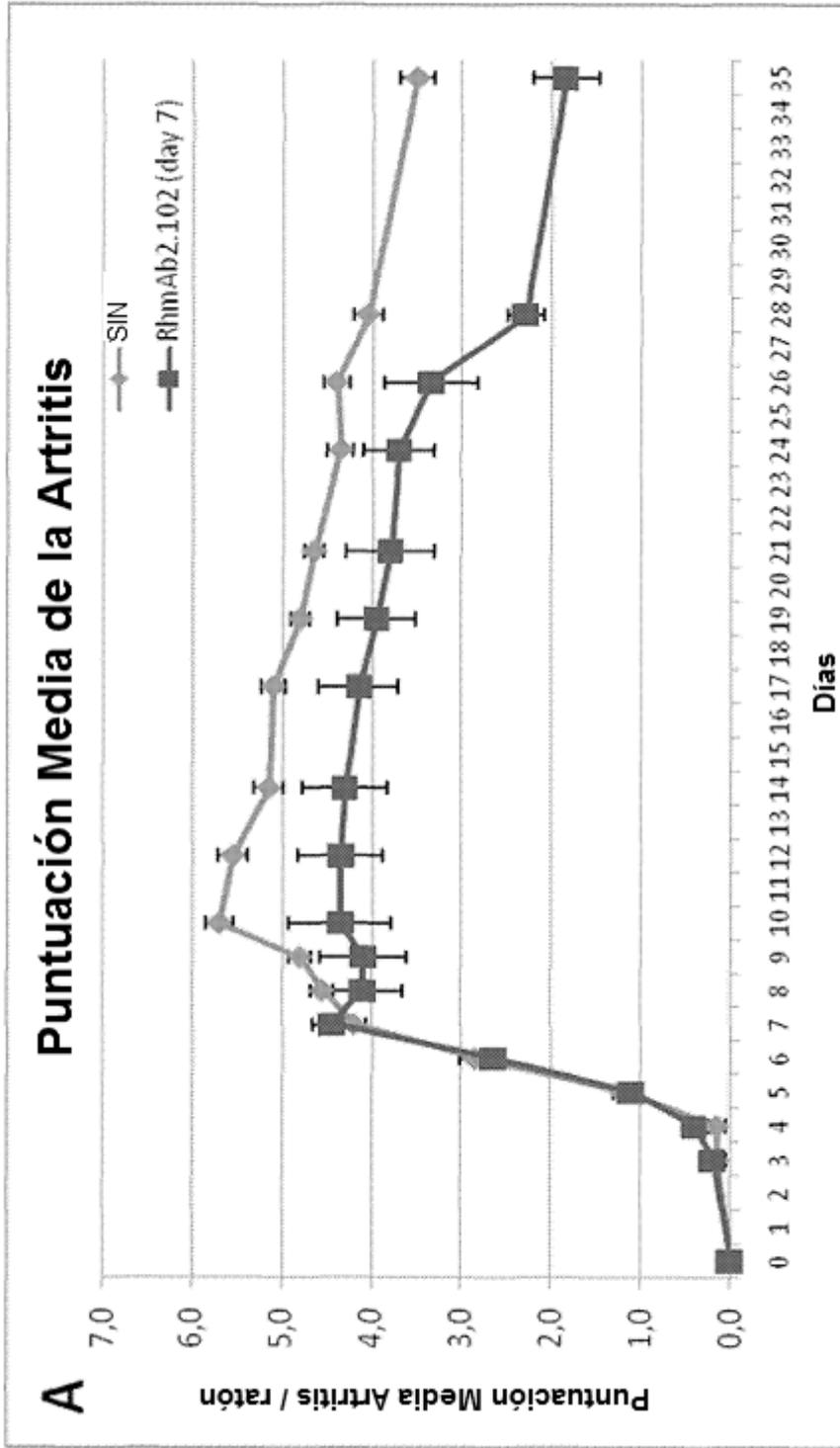


Fig. 6



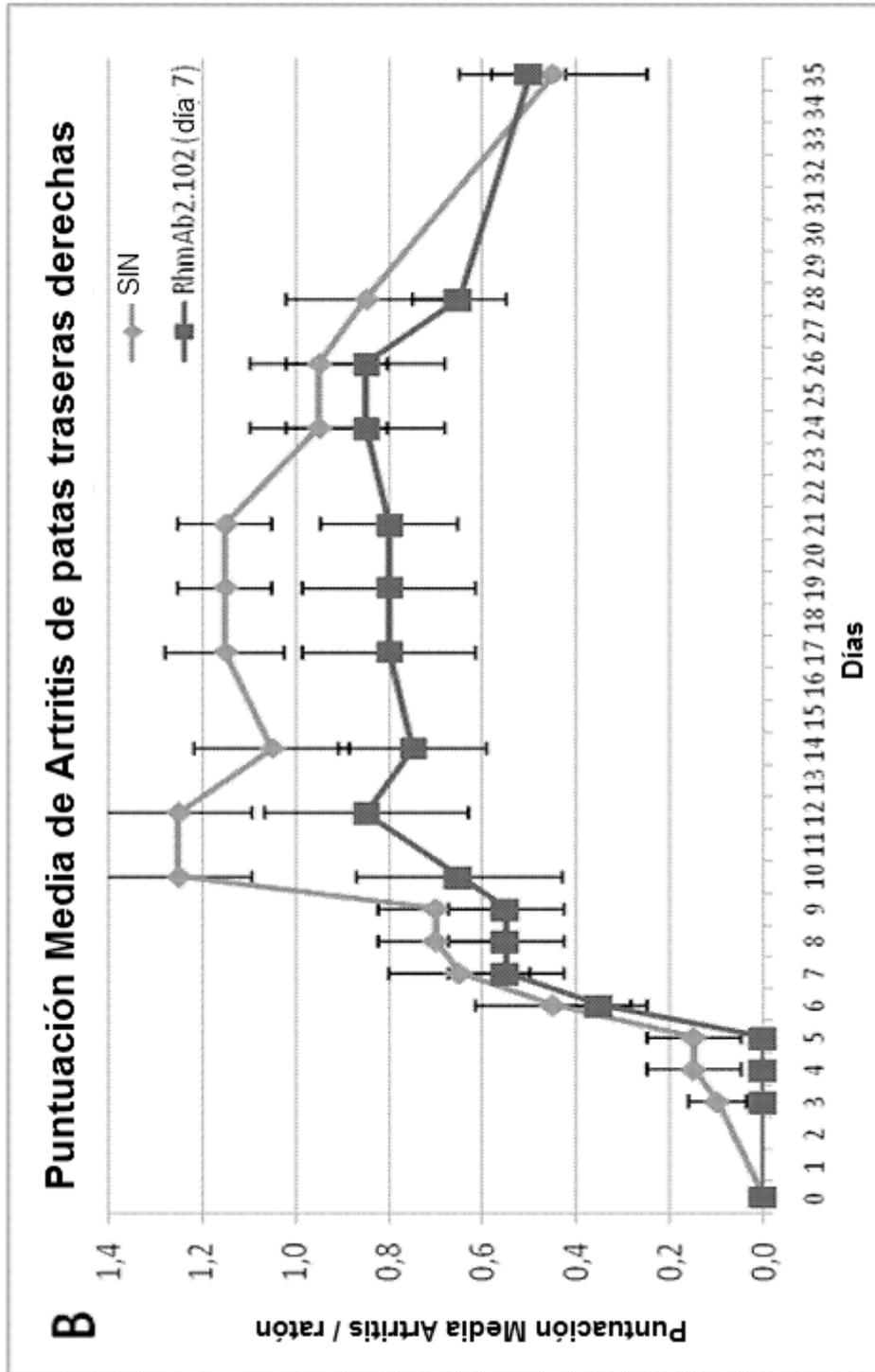
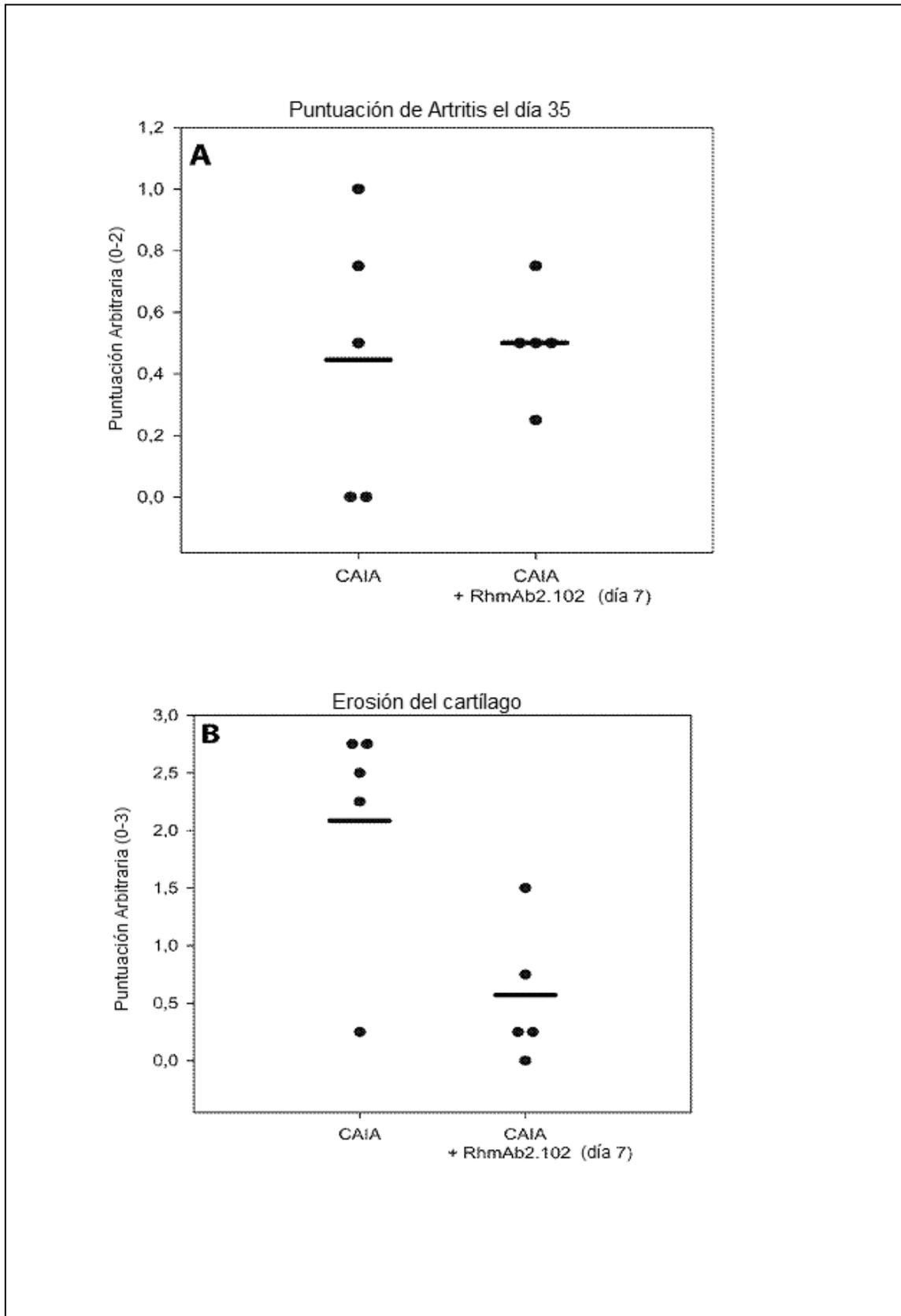
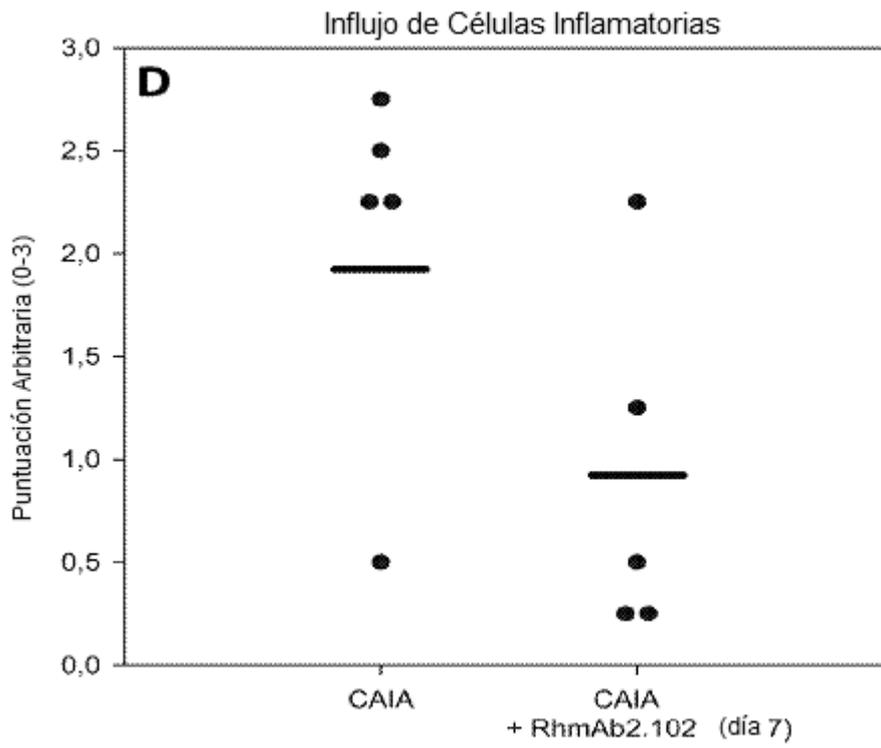
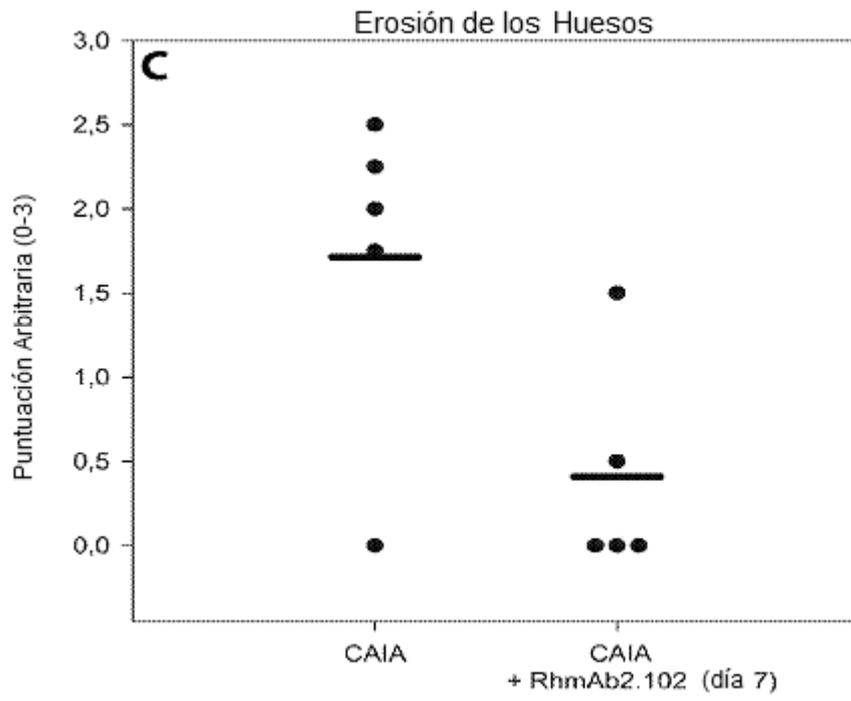
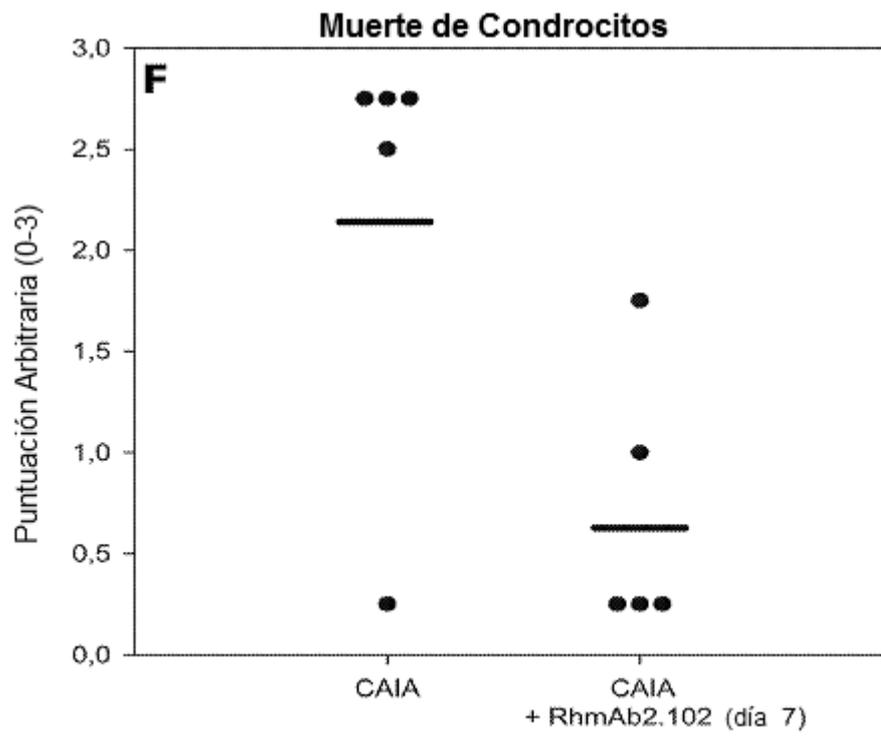
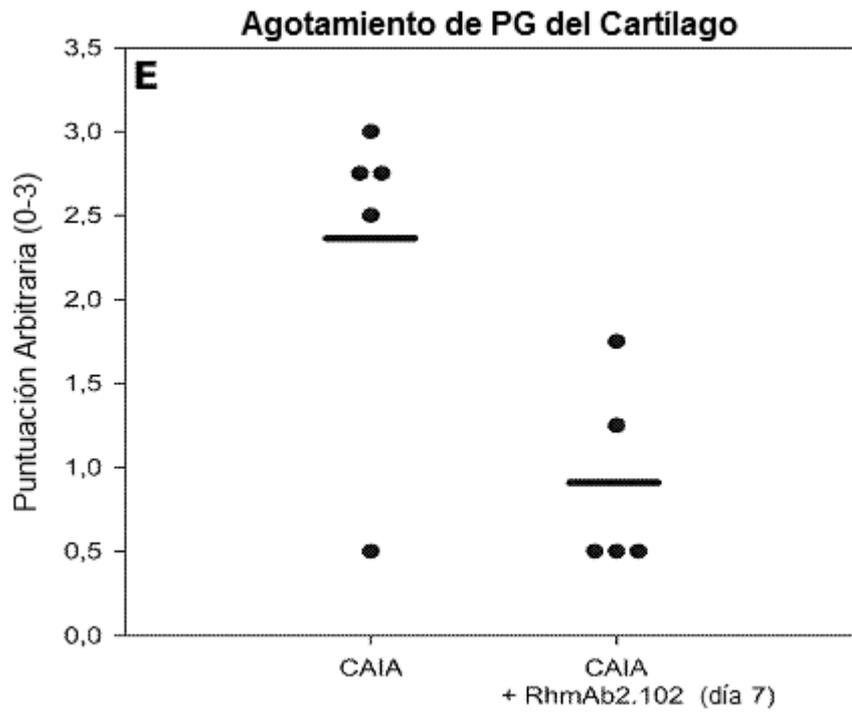


Figura 7







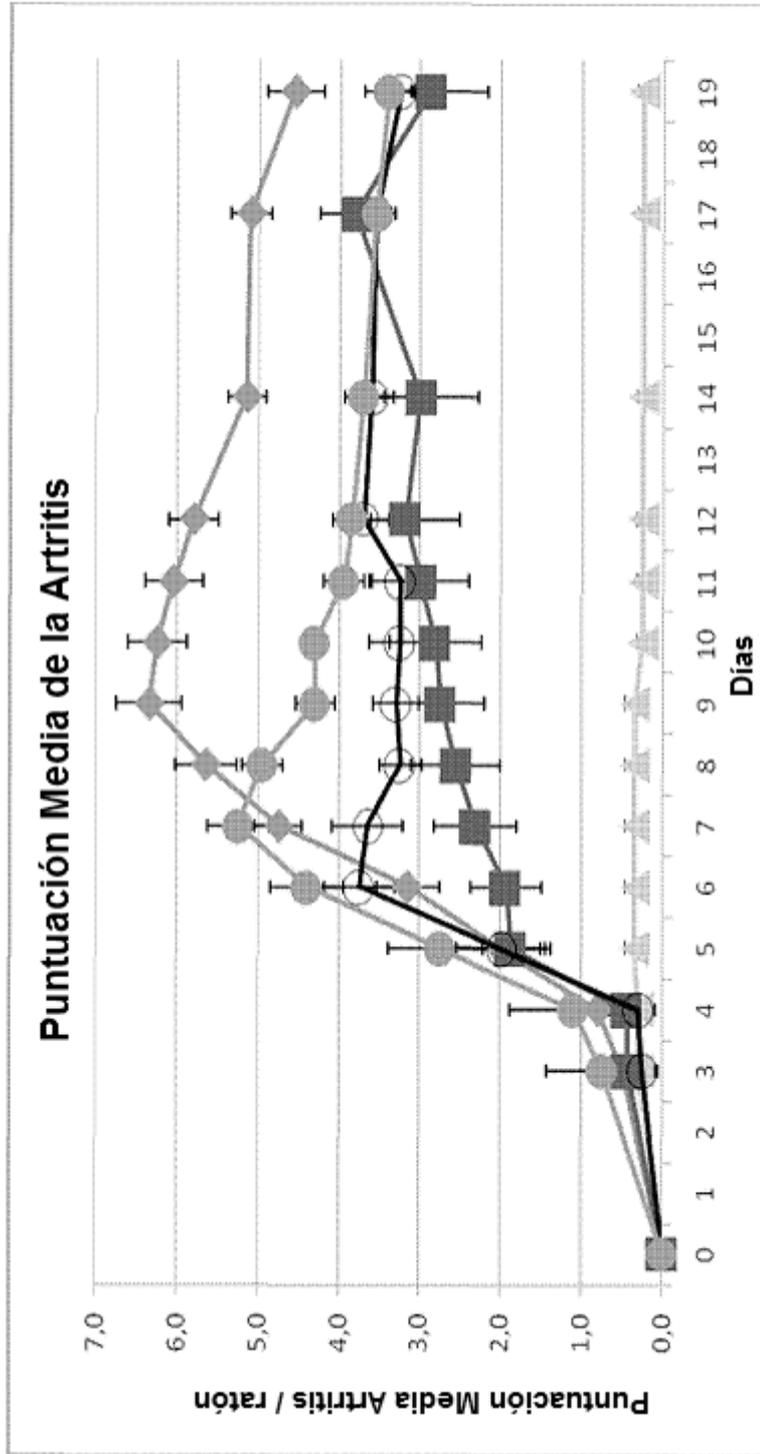


Figura 8

Figura 9

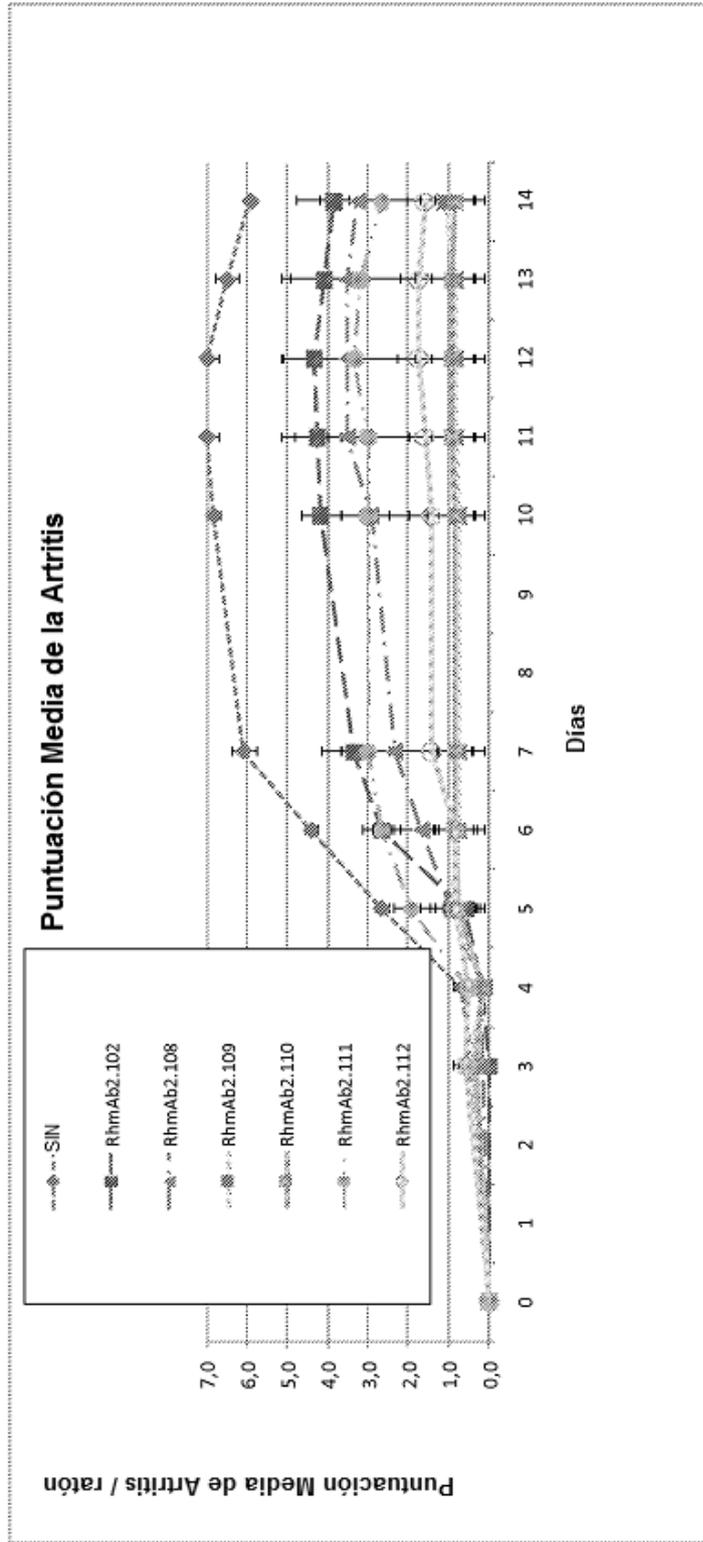


Figura 10

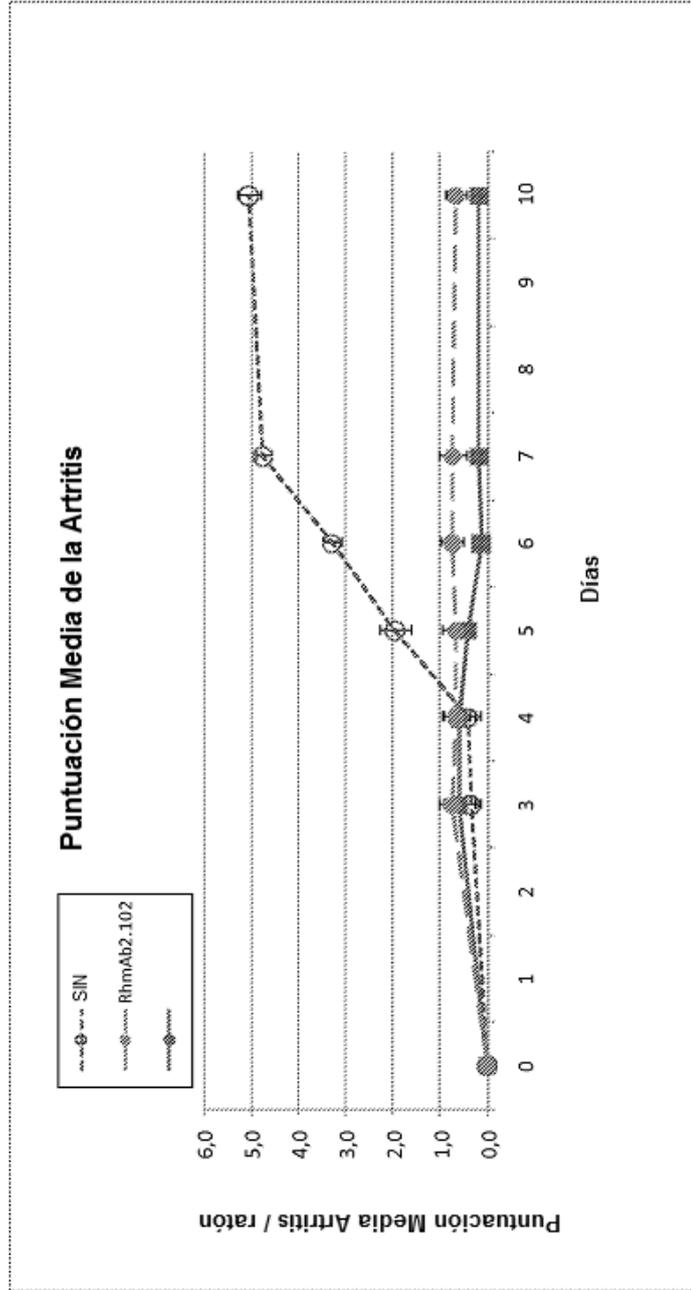
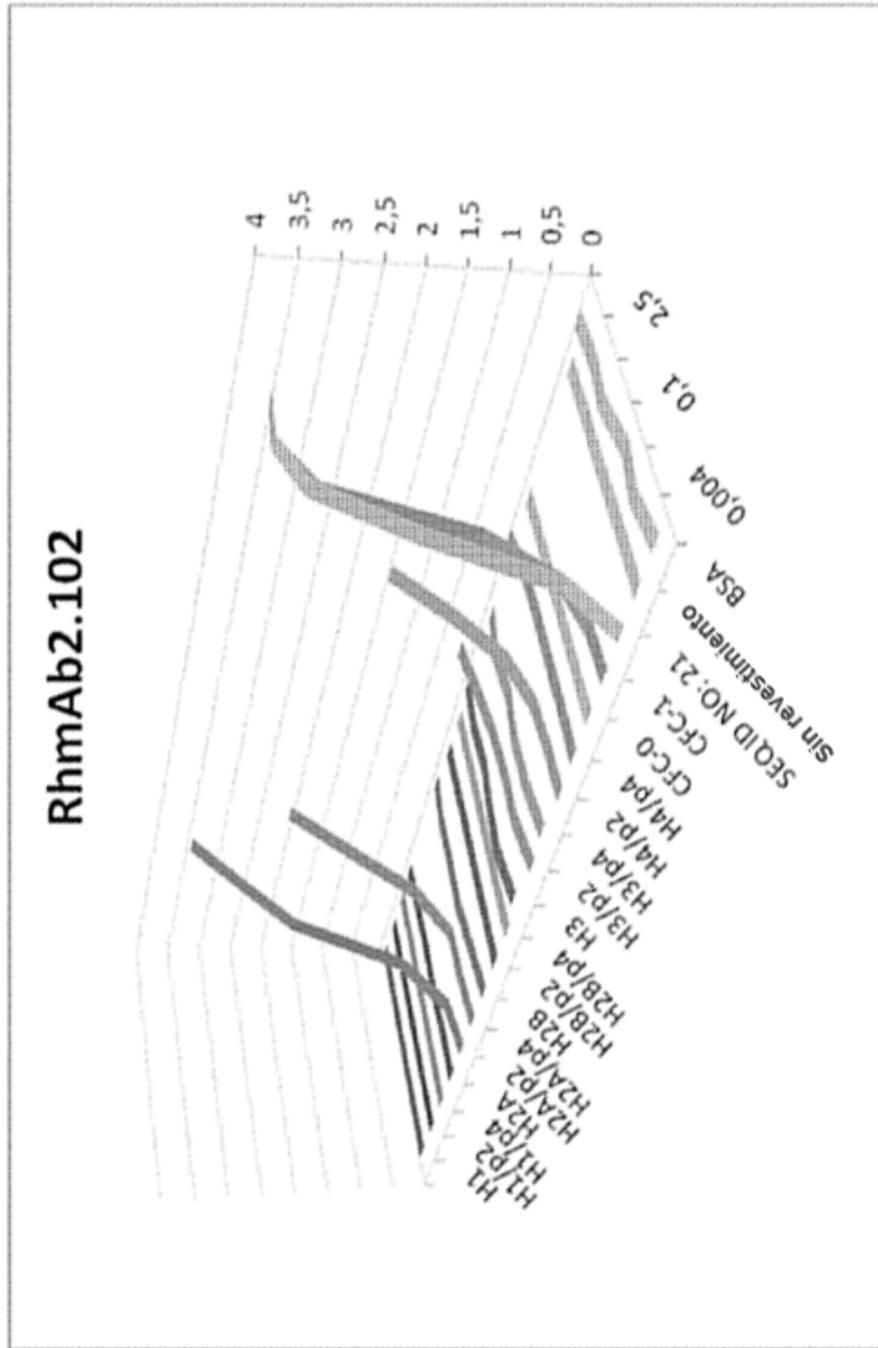


Figura 11A



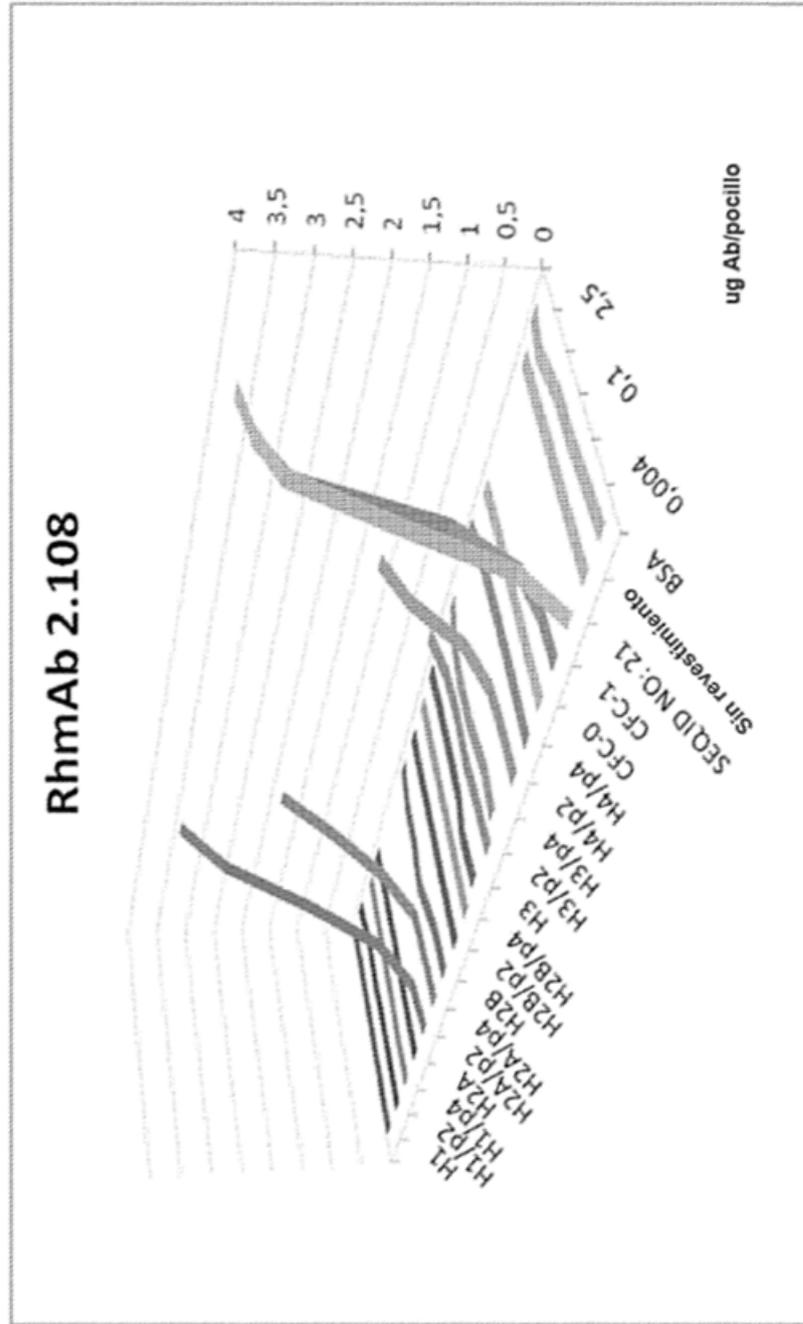
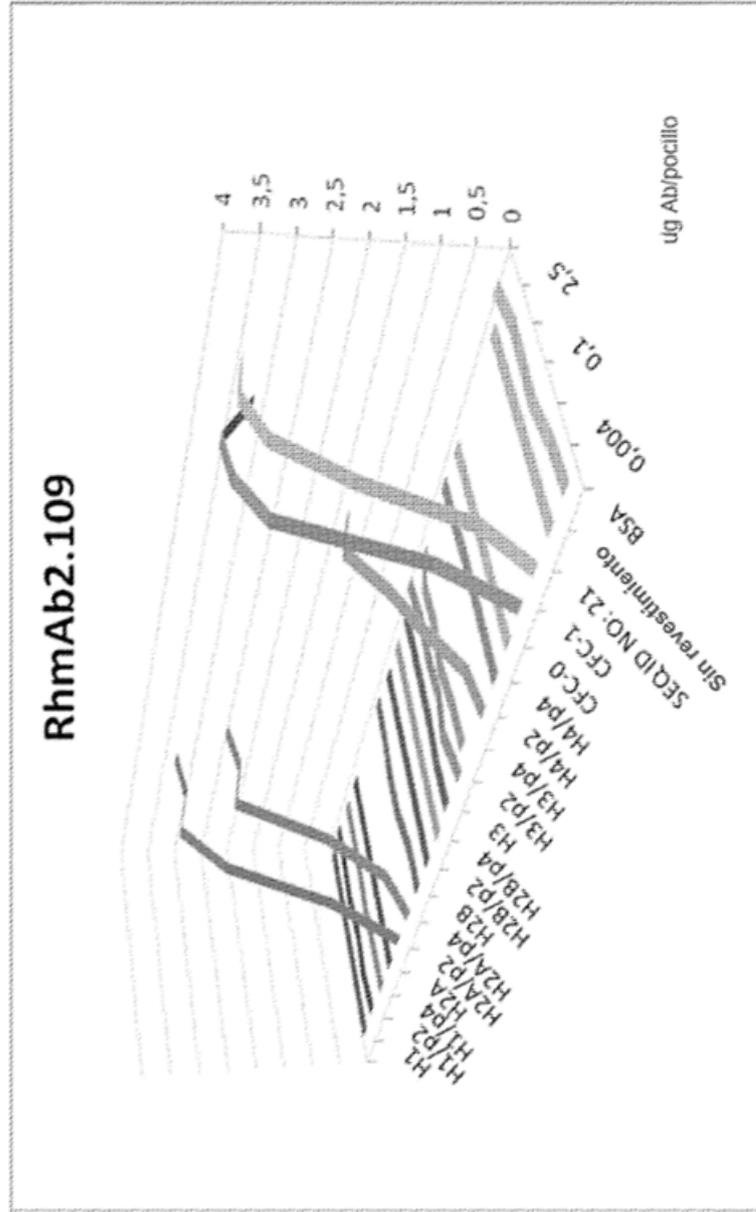


Figura 11B

Figura 11C



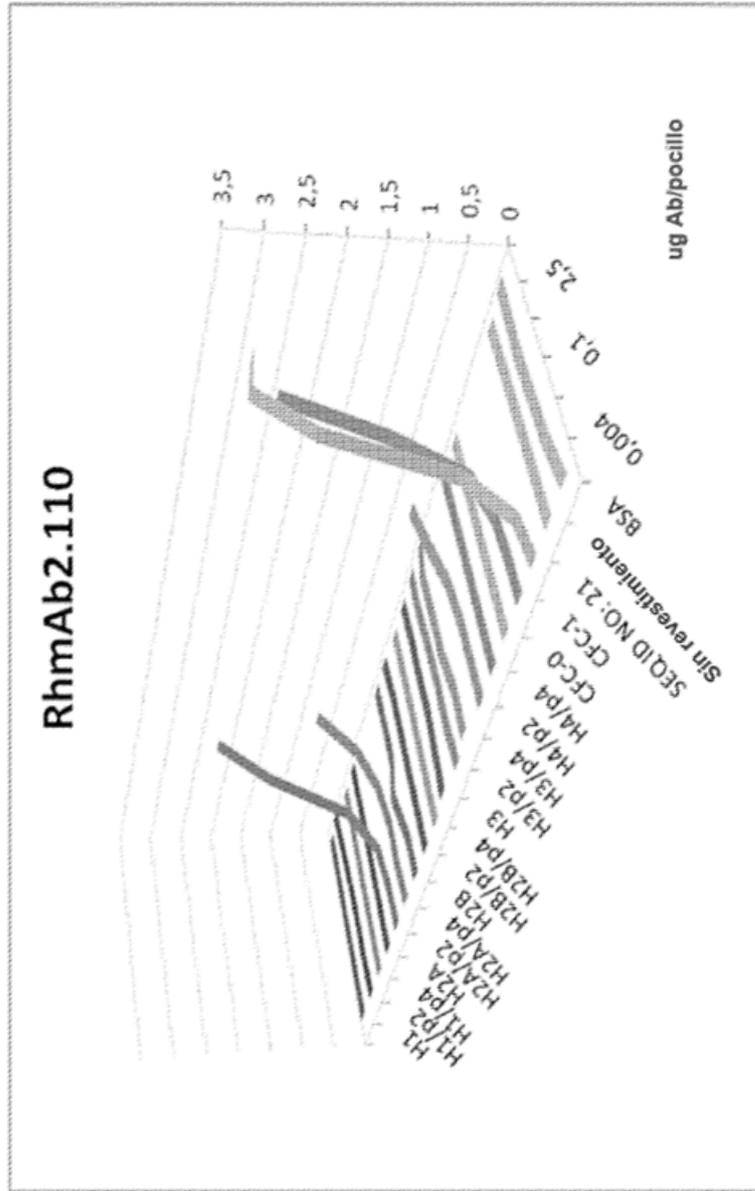


Figura 11D

Figura 11E

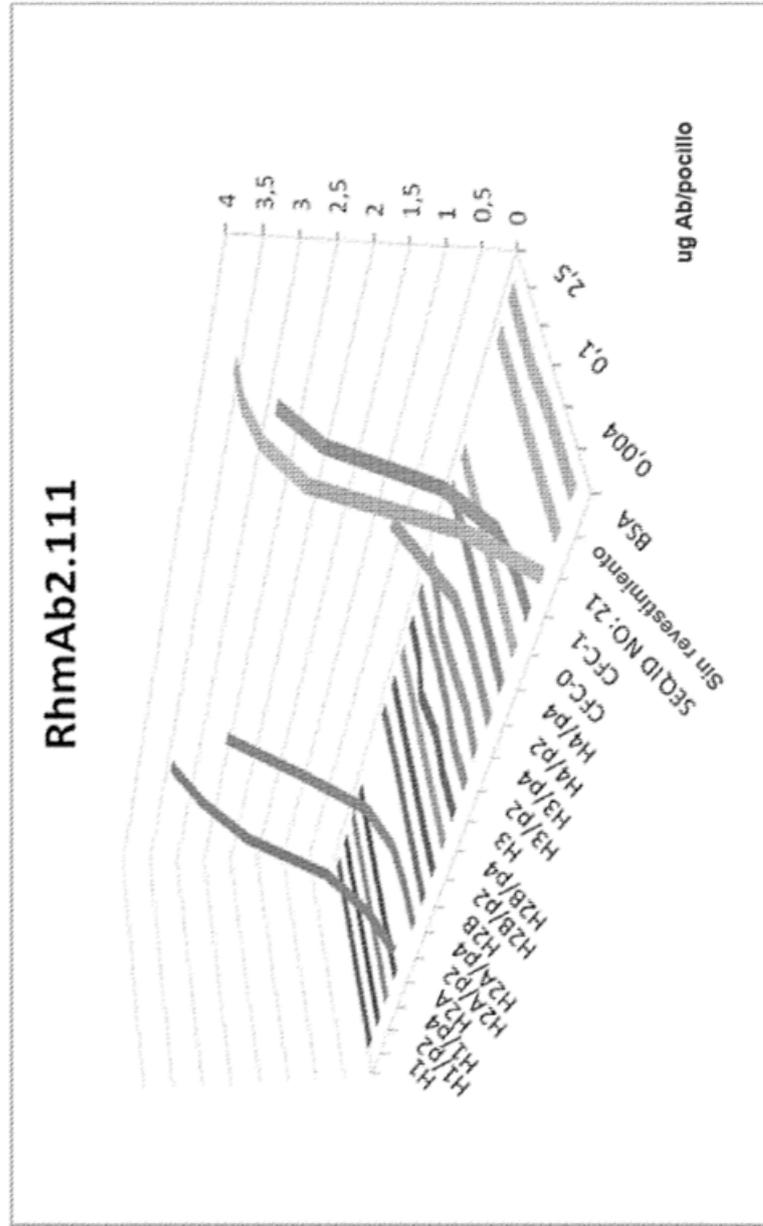


Figura 11G

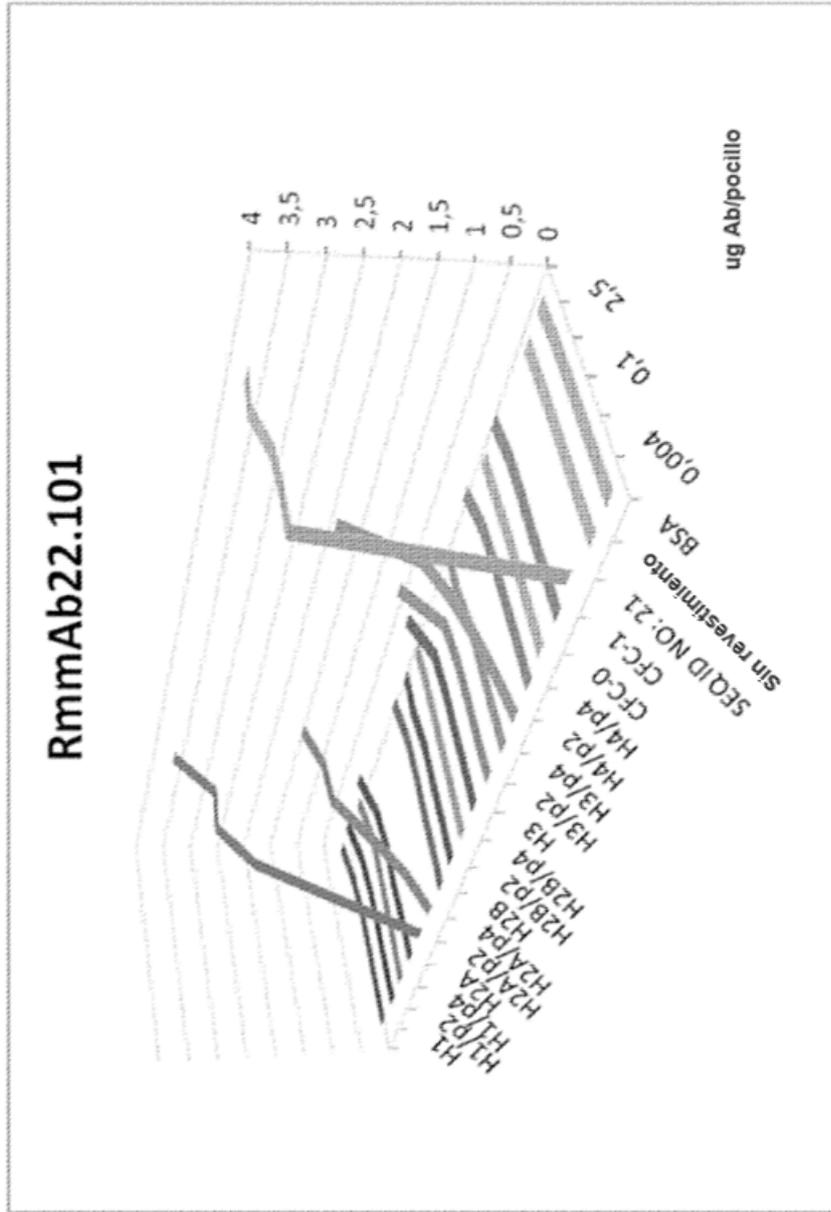


Figura 11H

