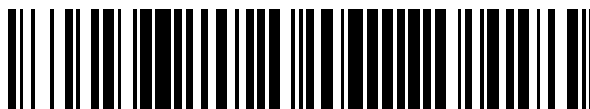


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 127**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2009 PCT/EP2009/056862**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09757582 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2294086**

54 Título: **Agentes anti-inflamatorios**

30 Prioridad:

04.06.2008 EP 08157547

17.12.2008 EP 08171920

18.03.2009 EP 09155484

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2018

73 Titular/es:

MODIQUEST B.V. (100.0%)

Kloosterstraat 9

5349 AB Oss, NL

72 Inventor/es:

RAATS, JOZEF MARIA HENDRIK y
CHIRIVI, RENATO GERARDUS SILVANO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 652 127 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

Campo de la invención

5 Esta descripción 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 descripción se refiere a composiciones y métodos para prevenir o tratar afecciones inflamatorias tales como enfermedades relacionadas con la citrulina, preferiblemente enfermedades inflamatorias. La descripción proporciona moléculas de unión específicas dirigidas contra epítomos que contienen citrulina para uso en la terapia y prevención de afecciones inflamatorias.

10 Antecedentes de la invención

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).

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.

25 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., collagenasa, estromelisinina)), 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.

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 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.

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).

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).

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).

La solicitud de patente WO 2004/078098 describe anticuerpos específicos para los complejos de péptido citrulinado/MHC de clase II para inhibir la activación de células T, siendo el concepto que el anticuerpo no se une al péptido separado de la molécula MHC de clase II, sino sólo al complejo del péptido y la molécula MHC de clase II.

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 descripción proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con un epítipo citrulinado en p15 y/o p17 para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias.

La descripción también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad inflamatoria, 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 epítipo de citrulina en p15 y/o p17.

Las composiciones y los métodos de la presente descripción incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables de moléculas de unión específicos reactivas con residuos citrulina. En particular, las moléculas de unión son específicamente reactivas con epítopos citrulinados en dos polipéptidos identificados en esta memoria, denominados p 15 y p 17.

Estos y otros aspectos de la presente descripción 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 descripción proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con un epítipo citrulinado en p15 y/o p17 para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias.

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.

La expresión "reacciona específicamente con citrulina" o "reactivo con un epítipo citrulinado" o "reactivo con un epítipo de citrulina" en este contexto significa que el anticuerpo reacciona con una estructura tal como un péptido o

molécula similar a 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 o molécula similar a un péptido se debe interpretar como estructuras que son capaces 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.

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 o partes de los mismos, tales como fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs), regiones de unión al antígeno de fragmento (Fabs), anticuerpos de dominios sencillos (sdabs), también conocidos como anticuerpos VHH, nanocuerpos (anticuerpos de dominio sencillo derivados de camélidos) o fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo derivados de IgNAR de tiburón denominados VNAR u otros componentes activos de los mismos, Anticalinas o aptámeros (ADN o ARN). En una realización preferida, una molécula de unión específica es una proteína de fusión que comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o un aptámero, tal como un aptámero en forma de ADN o ARN. En una realización aún más preferida, la molécula de unión específica comprende anticuerpos, o derivados de los mismos, tales como fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio sencillo o partes activas de los mismos. La descripción, por consiguiente, se refiere en particular a moléculas de unión específica tal como se han descrito anteriormente que son péptidos o anticuerpos.

El término "anticuerpos" o "anticuerpo" se refiere a una proteína o polipéptido capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se suele denominar "antígeno". Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas) son proteínas gamma globulina que se encuentran 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.

Los anticuerpos 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 tipo de leucocito denominado una célula B. Existen varios tipos diferentes de cadena pesada del anticuerpo y varios tipos diferentes de anticuerpos, que se agrupan 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.

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.

La única parte del antígeno reconocido por un anticuerpo se denomina epítipo. Estos epítopos 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.

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.

El término "Anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria incluye anticuerpos de cadena sencilla, regiones de fragmento de unión al antígeno, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de dominio sencillo y similares.

La expresión "o parte del mismo" 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.

En esta memoria se describen todo tipo de moléculas de unión específica y derivados de las mismas tales como anticuerpos, proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión específico de un anticuerpo, aptámeros, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo, otros dominios de unión proteínicos tales como las anticalinas, y moléculas pequeñas que se unen específicamente a epítopos citrulinados. Los anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos son preferidos para el uso tal como se describe en esta memoria. Preferiblemente, se utilizan anticuerpos IgG1 (p. ej., IgG1 λ) que tienen una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera λ . Sin embargo, otros isotipos de anticuerpos humanos también se dan a conocer en esta memoria, incluyendo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE en combinación con una cadena ligera κ o λ . También pueden utilizarse en los métodos tal como se describen en esta memoria 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.

Las "moléculas de unión específica reactivas con un epítipo citrulinado" se han 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, sin embargo, puede ser generada por modificación post-traducciona de un residuo arginina por peptidilarginina deiminasa (PAD).

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 Ca²⁺ 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 (EC 3.5.3.6) en bacterias. Estas enzimas no son Ca²⁺ dependientes.

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 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 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 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 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.

Moléculas de unión específica tal como se describen en esta memoria se dirigen contra un epítipo 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.

"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).

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. 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.

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.

La descripción proporciona una molécula de unión específica para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina.

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. La descripción proporciona una molécula de unión específica para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, 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, proporciona moléculas de unión específicas para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunes, más en particular, la artritis reumatoide o la osteoartritis.

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 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, 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 cathepsina 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 cathepsina 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). Dosis bajas de paclitaxel pueden inhibir la citrulinación de MBP por PAD2 in vitro (Pritzker et al., Biochim Biophys Acta, vol 1388, 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, vol 81, 335-343, 2002).

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.

- 5 En una realización preferida, la composición tal como se describe en esta memoria 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, tópica, rectal, intravenosa, oral, ocular o al margen de resección de tumores.
- 10 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
- 15 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,
- 20 alginato, ciclodextrinas, y sales y derivados, incluyendo ésteres y sulfatos de los mismos.

El método tal como se describe en esta memoria comprende suministrar una composición tal como se describe en esta memoria a un sitio diana, lo más notablemente una articulación sinovial.

- En una descripción específica según se proporciona en esta memoria, la molécula de unión específica compite con anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RmmAb1.102, RhmAb2.103, RmmAb1.103, RhmAb2.104, RmmAb1.104, RhmAb2.105 y RhmAb2.107 para la unión a p15 y/o p17.
- 25

- Las secuencias de ARNm primarias de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales RhmAb2.101, RhmAb2.103, y RhmAb2.104, RmmAb1.101, RmmAb1.103 y RmmAb1.104 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, RmmAb1.102, RhmAb2.105 y RhmAb2.107 se dan a conocer en esta memoria en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42.
- 30

- La descripción, por lo tanto, proporciona un polipéptido que comprende una cadena pesada o ligera variable de acuerdo con la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42. La descripción también proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42.
- 35

En otra realización preferida, la molécula de unión específica es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RmmAb1.102, RhmAb2.103, RmmAb1.103, RhmAb2.104, RmmAb1.104, RhmAb2.105 y RhmAb2.107.

- 40 En otra realización preferida, la molécula de unión específica comprende dominios VH y/o VL derivados a partir de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RmmAb1.102, RhmAb2.103, RmmAb1.103, RhmAb2.104, RmmAb1.104, RhmAb2.105 y RhmAb2.107.

- Moléculas de unión específica tal como se describen en esta memoria 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 epítopos específicamente reactivos tal como se describe en esta memoria, en particular histona 2A tratada con PAD4, péptido 1 (SEQ ID NO: 21) y otros péptidos particularmente reactivos.
- 50

El término “derivado” a este respecto quiere decir 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 se transfieren a continuación en el contexto de otro péptido.

- 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 doble de células de mamíferos (tales como células CHO) con
- 55

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 RhmAb2.101, 2.102, 2.103, 2.104, 2.105 y/o 2.107, y RmmAb1.101, 1.102, 1.103, 1.104.

5 Esta 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.

Se obtuvieron anticuerpos anti-citrulina monoclonales humanos y de ratón recombinantes tal como se describe en los Ejemplos 1 y 15. Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron con una región Fc de IgG1 humana (RhmAb2.101, RhmAb2.102, RhmAb2.103, RhmAb2.104, RhmAb2.105 y RhmAb2.107) y una región Fc de IgG2a de ratón (RmmAb1.101, RmmAb1.102, RmmAb1.103 y RmmAb1.104). Los pares de anticuerpos recombinantes humanos y de ratón (RhmAb2.101 y RmmAb1.102, RhmAb2.102 y RmmAb1.102, RhmAb2.103 y RmmAb1.103, y RhmAb2.104 y RmmAb1.104) contienen dominios VH y VL idénticos, pero contienen dominios Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 14) o de IgG2a de ratón (SEQ ID NO: 20), respectivamente. Los tres pares de anticuerpos monoclonales humanos y de ratón se analizaron en transferencias de western y se observó que cada par tenía la misma especificidad por sus antígenos respectivos.

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).

20 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).

25 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, 961-971, 2006); y Hill et al. (J Exp Med, vol 205, 967-979, 2008). Esto se muestra en las figuras 1a y 1b.

30 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, los anticuerpos monoclonales humanos RhmAb2.104 y RhmAb2.105 redujeron los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA, mientras que RhmAb2.103, RhmAb2.102 y RhmAb2.107 incluso suprimieron los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA.

35 RhmAb2.103 y RhmAb2.102 se comportaron de forma idéntica, únicamente se muestran en las Figuras 1c y 1d los resultados obtenidos con RhmAb2.102. Los resultados obtenidos con RhmAb2.105 y RhmAb2.107 se muestran en la Figura 10.

40 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.

45 Los mismos experimentos se realizaron también con los anticuerpos monoclonales con Fc de IgG2a de ratón equivalentes RmmAb1.101, RmmAb1.102, RmmAb1.103 y RmmAb1.104, los cuales contienen dominios VH y VL idénticos en comparación con sus homólogos humanos y también reconocen los mismos epítomos que sus homólogos humanos. Se obtuvieron resultados idénticos a los de los homólogos humanos. RmmAb1.102, RmmAb1.103 y RmmAb1.104 suprimieron (RmmAb1.102, RmmAb1.103) o redujeron (RmmAb1.104) los signos clínicos de la artritis, mientras que RmmAb1.101 no ejerció ningún efecto en absoluto.

50 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, RhmAb2.103, RhmAb2.104, RmmAb1.102, RmmAb1.103, RmmAb1.104, RhmAb2.105, y RhmAb2.107 desempeñan un papel importante en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias.

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 que fueron deiminadas utilizando Peptidilarginina deiminasa (enzima PAD) tal como se describe en el Ejemplo 3. Los borrones de transferencia Western que contienen hPAD2 o hPAD4 transfectaron lisados COS-1 que fueron deiminados post-líticamente se incubaron con los anticuerpos monoclonales RhmAb2.101, RhmAb2.102, RhmAb2.103 y RhmAb2.104. Se observó, que sólo tiras incubadas con RhmAb2.102, RhmAb2.103 y RhmAb2.104 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.

Se obtuvieron datos similares cuando los anticuerpos monoclonales humanos RhmAb2.101, RhmAb2.102, RhmAb2.103 y RhmAb2.104 y los anticuerpos monoclonales de ratón RmmAb1.101, RmmAb1.102, RmmAb1.103 y RmmAb1.104 se utilizaron en experimentos de inmunoprecipitación tal como se detalla en el Ejemplo 5.

Inmunoprecipitaciones con RhmAb2.102, RmmAb1.102, RhmAb2.103 y RmmAb1.103 en lisados COS-1 deiminados tanto de PAD2 humana como PAD4 revelaron bandas de proteínas prominentes de p15 y p17. Estas bandas fueron en cierto modo menos prominentes cuando las inmunoprecipitaciones se realizaron con RhmAb2.104 y RmmAb1.104.

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).

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, RhmAb2.103 o RhmAb2.104 se pueden realizar utilizando borrones de transferencias Western que contienen lisados COS-1 deiminados tal como se describe en el ejemplo 6 o proteínas p15 y/o p17 deiminadas purificadas en transferencia Western o ELISA.

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 7. 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 7).

Por consiguiente, la descripción proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con un epítipo citrulinado en histonas para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias.

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, RmmAb1.102, RhmAb2.103, RmmAb1.103, RhmAb2.104, RmmAb1.104 y RhmAb2.105 y RhmAb2.107 por la unión a p15 y/o p17.

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".

Con el fin de analizar adicionalmente qué histona o histonas deiminadas están involucradas en la acción terapéutica de RhmAb2.102 y RhmAb2.104, 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, RhmAb2.102 y RhmAb2.104. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y la Figura 2.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 2 es evidente que histona 2A deiminada huPAD4 (H2A/p4) es mejor reconocida por los anticuerpos terapéuticos RhmAb2.102 y RhmAb2.104, pero no es reconocida por RhmAb2.101 (Figuras 2a, 2b y 2c). Además de ello, RhmAb2.102 tiene una mayor afinidad por H2A/p4 en comparación con RhmAb2.104 (Figuras 2b y 2c). 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, RhmAb2.104 reduce y RhmAb2.101 no tiene efecto sobre los signos clínicos de la artritis (Figuras 1c y 1d).

Por lo tanto, los autores de la invención han demostrado que un epítipo deiminado en H2A/p4 o sus miméticos estructurales juegan un papel crucial en la cascada inflamatoria RA. Lo mismo es cierto para los epítopos deiminados en H3/p2, H4/p2 y H4/p4, ya que RhmAb2.102 muestra una mayor afinidad por estas histonas que RhmAb2.104 y RhmAb2.101 (Figuras 2a, 2b y 2c).

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 que por RhmAb2.104 y RhmAb2.101.)

Por lo tanto, la descripción proporciona 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 en histona H3 o histona H4 humana deiminada en PAD 2 humana.

Para detallar adicionalmente el epítipo citrulinado exacto en H2A que es reconocido por RhmAb2.102 y RhmAb2.104, se sintetizaron péptidos marcados con biotina que contienen todos los 13 potenciales sitios de deiminación de histona 2A (Tabla 4). Estos péptidos se recubrieron en placas de neutravidina-ELISA de 96 pocillos y se incubaron con diluciones en serie de RhmAb2.101, RhmAb2.102 y RhmAb2.104. 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 6B Reactividad de histonas deiminadas con RhmAb2.102, mostrada en la figura 2B

2.102	H1	H1/p2	H1/p4	H2A	H2A/p2	H2A/p4	H2B	H2B/p2	H2B/p4
10	0,9	1,214	1,045	0,428	3,411	3,425	0,247	0,31	0,229
2	0,178	0,304	0,27	0,115	3,179	3,134	0,076	0,086	0,069
0,4	0,089	0,119	0,103	0,071	3,085	2,722	0,056	0,06	0,054
0,08	0,059	0,069	0,065	0,06	1,963	1,747	0,054	0,053	0,052
0,016	0,054	0,058	0,059	0,057	0,628	0,426	0,065	0,052	0,052
0,0032	0,055	0,058	0,057	0,056	0,161	0,135	0,05	0,052	0,052
0,00064	0,102	0,058	0,058	0,057	0,077	0,075	0,052	0,052	0,055
0,000128	0,053	0,057	0,057	0,058	0,063	0,062	0,052	0,051	0,053
H3	H3/p2	H3/p4	H4	H4/p2	H4/p4	CFC-0	CFC-1	Sin revestimiento	
0,549	2,442	1,311	0,825	2,979	1,776	0,26	3,478	0,08	
0,275	1,935	0,439	0,208	2,735	1,556	0,086	3,377	0,053	
0,08	1,177	0,166	0,091	2,218	0,986	0,06	3,115	0,05	
0,062	0,493	0,093	0,067	1,343	0,432	0,05	2,145	0,046	
0,058	0,155	0,076	0,061	0,491	0,167	0,05	0,702	0,047	
0,058	0,08	0,065	0,06	0,151	0,077	0,049	0,178	0,047	
0,056	0,062	0,062	0,06	0,073	0,058	0,048	0,077	0,045	
0,058	0,066	0,06	0,06	0,073	0,055	0,047	0,058	0,046	

Tabla 6C Reactividad de histonas deiminadas con RhmAb2.104, mostrada en la figura 2C

2.104	H1	H1/p2	H1/p4	H2A	H2A/p2	H2A/p4	H2B	H2B/p2	H2B/p4
10	0,082	0,096	0,09	0,095	2,688	3,13	0,101	0,099	0,09
2	0,07	0,08	0,077	0,077	2,034	2,224	0,083	0,085	0,078
0,4	0,07	0,078	0,076	0,084	0,923	0,834	0,077	0,085	0,073
0,08	0,067	0,073	0,075	0,07	0,396	0,23	0,077	0,081	0,074
0,016	0,071	0,074	0,074	0,07	0,124	0,105	0,076	0,079	0,075
0,0032	0,069	0,08	0,074	0,071	0,086	0,082	0,075	0,086	0,077
0,00064	0,069	0,069	0,071	0,075	0,078	0,078	0,079	0,081	0,074
0,000128	0,068	0,072	0,072	0,068	0,077	0,078	0,075	0,077	0,072
H3	H3/p2	H3/p4	H4	H4/p2	H4/p4	CFC-0	CFC-1	Sin revestimiento	
0,087	0,145	0,14	0,104	1,243	0,144	0,085	3,901	0,064	
0,078	0,103	0,112	0,094	0,553	0,075	0,065	4,041	0,062	
0,073	0,077	0,09	0,09	0,227	0,069	0,057	4,003	0,057	
0,07	0,081	0,075	0,08	0,344	0,066	0,056	3,942	0,052	
0,074	0,074	0,087	0,209	0,243	0,068	0,057	3,895	0,05	
0,072	0,075	0,072	0,071	0,069	0,065	0,056	2,27	0,053	
0,07	0,077	0,075	0,069	0,067	0,068	0,055	0,536	0,051	
0,068	0,082	0,089	0,068	0,068	0,069	0,053	0,205	0,051	

ES 2 652 127 T3

Tabla 7 Reactividad de péptidos seleccionados con anticuerpos monoclonales RhmAb2.102, RhmAb2.104 y RhmAb2.101 como se indica

2.101	peptide 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CFC-0	CFC-1	Sin revestimiento
10 ng/well	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	0,076
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	0,047	0,046	0,047	0,048	0,049	0,051	0,047	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
2.104	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CFC-0	CFC-1	Sin revestimiento
10	1,828	0,087	0,066	0,078	0,062	0,056	0,064	0,061	0,067	0,067	0,069	0,066	0,084	3,231	0,055
2	1,630	0,080	0,058	0,059	0,053	0,053	0,052	0,050	0,055	0,061	0,059	0,057	0,069	3,218	0,054
0,4	0,959	0,064	0,054	0,055	0,055	0,053	0,055	0,052	0,053	0,060	0,067	0,054	0,065	3,239	0,051
0,08	0,374	0,053	0,057	0,055	0,054	0,056	0,054	0,059	0,061	0,062	0,058	0,060	0,066	3,259	0,052
0,016	0,165	0,055	0,052	0,055	0,048	0,057	0,055	0,058	0,055	0,055	0,055	0,059	0,063	2,975	0,050
0,0023	0,125	0,052	0,055	0,059	0,057	0,052	0,053	0,052	0,054	0,051	0,070	0,056	0,061	1,993	0,050
0,00064	0,111	0,052	0,049	0,055	0,056	0,053	0,052	0,053	0,056	0,057	0,056	0,056	0,064	0,968	0,050
0,000128	0,105	0,050	0,054	0,053	0,051	0,052	0,050	0,050	0,053	0,050	0,055	0,061	0,061	0,627	0,050

ES 2 652 127 T3

Tabla 8 Reactividad de péptidos seleccionados con anticuerpo monoclonal RhmAb2.102, RhmAb2.104 y RhmAb2.101 como se indica

2.101	msFib α	msFib α	huFib α	huFib α	msFib β	msVim				
(ug/well)	XH	XG	XH	XG	XG	XS/XL	cfc1 XG	cf0	Neutra	blanco
10	0,120	3,876	0,177	3,778	2,538	0,282	3,780	0,154	0,088	0,069
2	0,081	3,730	0,124	3,601	1,260	0,144	3,612	0,115	0,120	0,066
0,4	0,074	2,616	0,107	2,497	0,457	0,123	2,581	0,109	0,098	0,061
0,08	0,073	0,893	0,100	0,798	0,203	0,119	1,070	0,115	0,099	0,061
0,016	0,087	0,267	0,112	0,249	0,132	0,129	0,459	0,126	0,135	0,064
0,0023	0,102	0,143	0,118	0,151	0,119	0,128	0,325	0,123	0,137	0,069
0,00064	0,130	0,130	0,121	0,254	0,123	0,134	0,322	0,123	0,124	0,062
0,000128	0,114	0,144	0,139	0,146	0,119	0,147	0,292	0,136	0,113	0,059
2.102	msFib α	msFib α	huFib α	huFib α	msFib β	msVim				
(ug/well)	XH	XG	XH	XG	XG	XS/XL	cfc1 XG	cf0	Neutra	blanco
10	0,154	3,028	0,179	2,727	3,802	3,694	3,892	0,334	0,088	0,066
2	0,091	1,902	0,116	1,511	3,154	2,767	3,968	0,138	0,080	0,062
0,4	0,076	0,773	0,090	0,521	1,670	1,448	3,794	0,111	0,075	0,060
0,08	0,076	0,237	0,080	0,186	0,515	0,515	3,026	0,094	0,073	0,061
0,016	0,081	0,107	0,080	0,103	0,174	0,201	1,223	0,102	0,089	0,061
0,0023	0,085	0,125	0,123	0,125	0,120	0,142	0,506	0,124	0,103	0,060
0,00064	0,088	0,116	0,124	0,125	0,133	0,154	0,345	0,152	0,134	0,060
0,000128	0,089	0,119	0,120	0,115	0,118	0,133	0,288	0,139	0,119	0,059
2.104	msFib α	msFib α	huFib α	huFib α	msFib β	msVim				
(ug/well)	XH	XG	XH	XG	XG	XS/XL	cfc1 XG	cf0	Neutra	blanco
10	0,075	0,071	0,076	0,077	2,427	0,142	3,678	0,089	0,065	0,058
2	0,081	0,086	0,086	0,085	1,723	0,113	3,780	0,083	0,064	0,064
0,4	0,089	0,093	0,092	0,091	0,722	0,080	3,768	0,075	0,062	0,057
0,08	0,071	0,086	0,087	0,085	0,255	0,096	3,782	0,089	0,070	0,056
0,016	0,070	0,072	0,078	0,078	0,122	0,098	3,585	0,105	0,100	0,061
0,0023	0,058	0,063	0,065	0,063	0,069	0,070	2,108	0,070	0,064	0,057
0,00064	0,064	0,069	0,071	0,067	0,064	0,076	0,664	0,079	0,069	0,069
0,000128	0,078	0,075	0,073	0,070	0,058	0,074	0,236	0,068	0,070	0,062

Se observó que el péptido 1 (AAASGXGKQGGK) fue reconocido por los anticuerpos terapéuticos RhmAb2.102 y RhmAb2.104, pero no por RhmAb2.101 (Tabla 4 y Figuras 3a, 3b y 3c). Una vez más, RhmAb2.102 mostró una mayor afinidad en comparación con RhmAb2.104 (Figuras 3b y 3c). 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 RhmAb2.104 y RhmAb2.101 (Figuras 2a, 2b y 2c). 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. Por lo tanto, concluyeron que las moléculas de unión específicas tal como se describen en esta memoria 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 individualmente pueden utilizarse para generar moléculas de unión específicas tales como anticuerpos tal como se describen en esta memoria. 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	QFPVGXVHRLLR
5	Secuencia ID NO: 25	VGRVHLLRKGN
6	Secuencia ID NO: 26	VHRLXKGNYS
7	Secuencia ID NO: 27	GNYSXVAGAP
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

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 y RhmAb2.104 se aplicaron a las placas recubiertas. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y la Figura 4.

Tabla 5: Péptidos que contienen fibrinógeno y citrulina vimentina

Nombre péptido	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
msFib α XH	SEQ ID NO: 33	LSEGGGVGRPRVVEHXQSQCK D
msFib α XG	SEQ ID NO: 34	LSEGGGVXGPRVVERHQSQCK D
huFib α XH	SEQ ID NO: 35	LAEGGGVGRPRVVEHXQSACK D
huFib α XG	SEQ ID NO: 36	LAEGGGVXGPRVVERHQSACK D
msFib β XG	SEQ ID NO: 37	EPTDSLDA XGHRPVDRR
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, RhmAb2.102 y RhmAb2.104 (Figuras 4a, 4b y 4c). Una vez más, RhmAb2.102 mostró una mayor afinidad si se compara con RhmAb2.104 y RhmAb2.101 se comportó ligeramente mejor que RhmAb2.101 (Figuras 4a, 4b y 4c). Este patrón de reconocimiento de los anticuerpos es similar al patrón observado en las transferencias de Western con fibrinógeno humano deiminado con huPAD2 y huPAD4. Además solamente RhmAb2.102 reconoció el péptido vimentina de ratón (Ejemplo 10). 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, proporciona una molécula de unión específica tal como se describió anteriormente que es específicamente reactiva con un epítomo en péptidos msFib β o msVim (SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38) y a su uso.

Además, los autores de la invención han demostrado que los epítomos 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).

5 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.

10 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.

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.

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.

25 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.

30 También se realizó un análisis inmunohistoquímico en las patas traseras de los mismos ratones. Se incubaron laminillas con RhAb2.104. Los resultados concordaron con el análisis de transferencia de Western. Se pudieron detectar citrulinas modificadas en proteínas con un peso molecular aparente de aproximadamente 50, 15 y 17 kiloDaltons en las muestras de los días 4 a 6, lo que nos permitió concluir que los epítomos citrulinados reactivos e inmunoprecipitables con RhmAb2.102 aparecieron de nuevo en las articulaciones inflamadas, en este caso en las patas traseras de los ratones con artritis inducida experimentalmente.

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 12). La Figura 6A muestra la puntuación media de la artritis de todos los 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.

50 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 12). Por lo tanto, la descripción proporciona 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 12, 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. En la siguiente serie de experimentos CAIA, los autores de la invención han investigado la posibilidad de reducir los niveles de inflamación con Dexametasona y de prevenir la reaparición de la inflamación después de interrumpir el tratamiento con Dexametasona mediante la inyección simultánea de RhmAb2.102 el día 5, 6 o 7 (Figura 9) con Dexametasona.

La Dexametasona es un inhibidor inflamatorio general que debe ser administrado a diario. Una vez se interrumpe el tratamiento, la inflamación vuelve a aparecer. Se han realizado procedimientos experimentales como los descritos en el Ejemplo 12 con la diferencia de que se ha inyectado 1 mg de RhmAb2.102 i.v. el día 5 (Figura 9A), día 6 (Figura 9B) y día 7 (Figura 9C) tras la inyección de anticuerpos anti-colágeno, de forma simultánea con inyecciones i.p. de Dexametasona (2 mg/kg). La Dexametasona se administró secuencialmente durante 2 o 3 días hasta que desapareció la hinchazón en las patas. Grupos adicionales de animales recibieron inyecciones i.p. de Dexametasona únicamente. Según se muestra en la Figura 9, la inflamación reapareció en los ratones que no recibieron RhmAb2.102. Sin embargo, marcando una gran diferencia, cuando se combinó Dexametasona con RhmAb2.102, la recidiva inflamatoria fue mucho más leve y apareció más tarde en comparación con los ratones tratados únicamente con Dexametasona. Esto se puso de manifiesto de la forma más marcada cuando se inició el tratamiento combinado de RhmAb2.102/Dexametasona el día 6 o 7 (Figura 9B y C). Los experimentos presentados en la Figura 9 muestran un nuevo método de tratamiento para enfermedades inflamatorias en el que se puede utilizar un inhibidor de la inflamación tal como Dexametasona para tratar brotes de inflamación y se puede utilizar RhmAb2.102 para prevenir la recidiva de la inflamación y, de forma más importante, evitar que se produzcan daños en los tejidos/las articulaciones. La descripción, por consiguiente, proporciona un método para tratar la inflamación y los daños en las articulaciones mediante la administración simultánea de un inhibidor de la inflamación junto con una molécula de unión tal como se describe en esta memoria.

En otro experimento CAIA, se han evaluado 2 anticuerpos novedosos anti-citrulina (RhmAb2.105 y RhmAb2.107) que han mostrado una reactividad cruzada con RhmAb2.102 sobre sus antígenos diferenciadores respecto a RhmAb2.101 para determinar su efecto antiinflamatorio. RhmAb2.105, RhmAb2.107 y RhmAb2.102 (control positivo) se han inyectado i.v. el día 3 (1 mg/ratón) tras la inyección de anticuerpos anti-colágeno en grupos experimentales separados (Figura 10). Se han realizado los procedimientos experimentales según se han descrito en el Ejemplo 12. La Figura 10 muestra la puntuación media de la artritis de todas las patas de cada grupo.

Al parecer, RhmAb2.102 presentó el efecto antiinflamatorio más elevado. RhmAb2.107 se comportó casi tan bien como RhmAb2.102, y RhmAb2.105 presentó un efecto intermedio similar al observado previamente para RhmAb2.104 (Figura 1C).

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 13) 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 14). 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 13 y 14).

Por lo tanto, la descripción también proporciona una molécula de unión específicamente reactiva con cualquiera de las proteínas o polipéptidos tal como se muestra en la tabla 7 para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

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 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 7, 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, RmmAb1.102, RhmAb2.103, RmmAb1.103, RhmAb2.104, RmmAb1.104, RhmAb2.105 y RhmAb2.107 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 tal como se describe en esta memoria, resultará ahora evidente para la persona experta que las enfermedades inflamatorias también pueden tratarse o prevenirse provocando una respuesta inmune, en donde las moléculas de unión específica tal como se describen en esta memoria 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 proporciona un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias provocando 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 histona 2A humana deiminada con PAD4 humana, una histona 4 humana deiminada con PAD4 humana, histona H4 humana deiminada con 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 tal como se describen en esta memoria pueden comprender efectivamente un epítipo citrulinado específicamente reactivo con una molécula de unión tal como se describe en esta memoria. Más en particular, el epítipo citrulinado puede ser un epítipo citrulinado en histona 2A o histona 4 humana deiminada con PAD4 humana, o en histona H3 humana, histona H4 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 o impedido. Por lo tanto, la descripción también proporciona un método tal como se ha descrito anteriormente en el que la enfermedad inflamatoria se selecciona 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 descripción se refiere a una respuesta inmune in vivo, una molécula de unión específica preferida es un anticuerpo.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Se utilizó un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto de ocho 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. Los anticuerpos RhmAb2.102 y RhmAb2.103 se comportaron igual de bien, únicamente se muestra RhmAb2.102. Lo mismo es cierto para los anticuerpos RmmAb1.102 y RmmAb1.103; se comportaron igual de bien, únicamente se muestra RmmAb1.102.

Figura 2: Se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de a) RhmAb2.101, b) RhmAb2.102 y c) RhmAb2.104 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, b) RhmAb2.102 y c) RhmAb2.104 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 ug/pocillo y 0,000128 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.

Figura 4: Se utilizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) para testar la afinidad de a) RhmAb2.101, b) RhmAb2.102 y c) RhmAb2.104 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 ug/pocillo y 0,000128 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.

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 cartilago (B), erosión del hueso (C), influjo de células inflamatorias (D), agotamiento PG del cartilago (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 un modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto terapéutico de RhmAb2.102 cuando se administra los días 5, 6 y 7 (paneles A, B y C respectivamente) después de la inyección de anticuerpos anti-colágeno simultáneamente con el tratamiento de Dexametasona. Se trataron grupos de 5 ratones el día 0 mediante inyección i.p. con 2,8 mg de anticuerpos anti-colágeno. Se administró LPS (25 µg/ratón) el día 3 mediante inyección i.p. Se inyectó RhmAb2.102 (1 mg/ratón) i.v. el día 5, 6 ó 7, simultáneamente con la primera dosis de Dexametasona, mientras que la Dexametasona (2 mg/kg) se suministró secuencialmente (i.p.) durante 2 o 3 días seguidos hasta que desapareció la hinchazón macroscópica. Otros grupos de animales recibieron inyecciones i.p. de Dexametasona únicamente.

Los animales han sido puntuados diariamente hasta el día 21. La gráfica representa la puntuación media de la artritis para cada grupo experimental.

Se observó que el tratamiento con RhmAb2.102 en combinación con Dexametasona dio como resultado una reducción dramática de la hinchazón y tan sólo una reaparición lenta y leve de la inflamación en comparación con los ratones que no recibieron RhmAb2.102. Con una diferencia marcada, cuando se administró únicamente

Dexametasona a los animales, la recidiva inflamatoria fue mucho más intensa y rápida en comparación con los ratones tratados con la combinación de Dexametasona/RhmAb2.102.

Rombos: Control, Triángulos: Dexametasona únicamente, diariamente desde el día 5, Cuadrados: Dexametasona diariamente desde el día 5 más RhmAb2.102.

- 5 Figura 10: Se utilizó el modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para testar el efecto antiinflamatorio de RhmAb2.102, RhmAb2.105 y RhmAb2.107, cuando se administran el día 3 después de la inyección de anticuerpos anti-colágeno. Se indica la puntuación media de la artritis de todas las patas (Figura 10A) y la puntuación media de la artritis de las patas traseras únicamente (Figura 10B). Grupos de 5 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, RhmAb2.105 y RhmAb2.107 (1 mg/ratón) o placebo. Los animales fueron puntuados todos los días hasta el día 14.

RhmAb2.102 dio como resultado el efecto antiinflamatorio más elevado. Cuando se examinó la puntuación media de la artritis de las patas traseras únicamente, RhmAb2.102, RhmAb2.105 y RhmAb2.107 se comportaron todos ellos de manera similar en cuanto al efecto antiinflamatorio.

- 15 Rombos: Control, Triángulos: RhmAb2.102, Cuadrados: RhmAb2.105 y Círculos: RhmAb2.107.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Anticuerpos monoclonales recombinantes humano y de ratón.

- 20 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).

- 25 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, RhmAb2.103 y RhmAb2.104. Los anticuerpos de ratón eran del isotipo IgG2a kappa y se denominaron RmmAb1.101, RmmAb1.102, RmmAb1.103 y RmmAb1.104.

- 35 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 λ1b. RhmAb2.103 se sintetiza de acuerdo con Stemmer et al (Gene, vol 164, 49-53, 1995) basándose en la secuencia del clon A2-2 (Raats et al., J Rheumatology, vol30, 1696-711, 2003) y consiste en un VH derivado de la familia de la línea germinal 3-23, en combinación con un VL derivado de la familia de la línea germinal λ1a. RhmAb2.104 se sintetiza de acuerdo con Stemmer et al (Gene, vol 164, 49-53, 1995) y consiste en un VH derivado de la familia de la línea germinal 4-b, en combinación con un VL derivado de la familia de la línea germinal λ1c.

- 40 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.

- 50 RmmAb1.102 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: 10, en combinación con una cadena ligera de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 11. La cadena pesada de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 10 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: 19, seguido de la inmunoglobulina IgG2a de ratón de dominio constante de acuerdo con SEQ ID NO: 20. La cadena ligera de inmunoglobulina codificada por SEQ ID NO: 11 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: 17, seguido por el dominio constante kappa de ratón de inmunoglobulina de acuerdo con SEQ ID NO: 18.

Las secuencias primarias de ARNm de los dominios variables (VH y VL) de los anticuerpos monoclonales RhmAb2.101, RhmAb2.103, y RhmAb2.104, RmmAb1.101, RmmAb1.103 y RmmAb1.104 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 y de ratón, de tamaño completo se generaron utilizando dominios conductor y constante humanos o de ratón idénticos tal como se describe para el anticuerpo RhmAb2.102 y RmmAb1.102.

Tabla 1

mAb	Base de datos de referencia	Número de acceso	Descripción
Cadena pesada de RhmAb2.101 y RmmAb1.101	EMBL: AJ430751	AJ430751	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (gen IGVH), clon Ra3
Cadena ligera de RhmAb2.101 y RmmAb1.101	EMBL: AJ430766	AJ430766	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (gen IGLV), clon Ra3
Cadena pesada de RhmAb2.103 y RmmAb1.103	EMBL: AJ430749	AJ430749	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (gen IGVH), clon A2-2
Cadena ligera de RhmAb2.103 y RmmAb1.103	EMBL: AJ430773	AJ430773	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (gen IGLV), clon A2-2
Cadena pesada de RhmAb2.104 y RmmAb1.104	EMBL: AJ430732	AJ430732	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (gen IGHV), clon B8-6
Cadena ligera de RhmAb2.104 y RmmAb1.104	EMBL: AJ430753	AJ430753	ARNm parcial de Homo sapiens para la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (gen IGLV), clon B8-6

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).

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%20_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 ug 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.

Anticuerpos monoclonales humanos RhmAb2.102, RhmAb2.103 y RhmAb2.104, sin embargo, redujeron o incluso suprimieron de manera sorprendente los signos clínicos de la artritis en el modelo experimental CAIA (Figura 1c y 1d). RhmAb2.102 y RhmAb2.103 fueron los que redujeron mejor los signos de la artritis, mientras que RhmAb2.104 redujo la inflamación en un 50% aproximadamente. RhmAb2.101 no tuvo efecto alguno en absoluto a la dosis testada.

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 epítomos 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.

- 5 Células COS-1 ($8 \cdot 10^5$) fueron transfectadas transitoriamente con 2 μ g 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.

72 horas más tarde las células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 15 μ l 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.

- 15 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.

- 30 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, RhmAb2.103 y RhmAb2.104 mostraron reactividad con un doblete de proteínas con un peso molecular de aproximadamente 15 y 17 kiloDalton.

Ejemplo 5 Inmunoprecipitación de antígenos:

- 35 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 2^x (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.

- 45 Inmunoprecipitaciones con RhmAb2.102, RhmAb2.103, RmmAb1.102 y RmmAb1.103 en lisados de COS-1 deiminados tanto con PAD2 como PAD4 humana revelaron bandas de proteínas p15 y p17 prominentes. Estas bandas fueron en cierto modo menos prominentes cuando las inmunoprecipitaciones se realizaron con RhmAb2.104 y RmmAb1.104. 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).

- 50 Ejemplo 6: Ensayo de competición de anticuerpos para p15 y p17.

Se realizaron ensayos de competición para la unión a p15 y p17 en las inmunoprecipitaciones según se ha descrito en el Ejemplo 3. Se permitió que los anticuerpos monoclonales de ratón RmmAb1.102 y RmmAb1.103 se unieran a las tiras de inmunoprecipitación que comprendían p15 y p17 en presencia y ausencia de RhmAb2.102 y RhmAb2.103, respectivamente. La unión se detectó utilizando un conjugado anti-ratón. Se realizaron experimentos de control adecuados para garantizar que el conjugado no reaccionaba con el anticuerpo humano. Al parecer, se pudo reducir la unión de RmmAb1.102 y RmmAb1.103 a p15 y p17 cuando se utilizó RhmAb2.102 y RhmAb2.103, respectivamente, como un anticuerpo competidor. Los anticuerpos de control RmmAb13.101, RmmAb13.102 y RmmAb13.103 no compitieron por la unión a p15 o p17 con RmmAb1.102 o RmmAb1.103.

Estas observaciones hacen que este ensayo sea una prueba excelente para seleccionar anticuerpos que inhiben los signos clínicos de enfermedades inflamatorias.

Ejemplo 7: 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 µl 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 µl de bicarbonato de amonio 25 mM + 25 µl 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 µl 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 µl de disolución de tripsina (~ 15 ng de tripsina/µl 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 µl de bicarbonato de amonio 25 mM/n-octil-β-D-glucopiranosido 5 mM. Los péptidos se extrajeron mediante incubación con 4 µl 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]	RDAVITYTEHAQR	Seq id no: 6
racimo de histona 2, H4 [Rattus norvegicus]	RISGLIYEETRG	Seq id no: 7

Ejemplo 8: Anticuerpos anti-citrulina terapéuticos reconocen H2A/p4.

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, 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. Pocillos incubados con RhmAb2.101 y RhmAb2.104 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 9: Anticuerpos anti-citrulina terapéuticos reconocen 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 10: Preparación de fibrinógeno plasmático humano deiminado, electroforesis de SDS-page y transferencia de Western, y detección con anticuerpos anti-citrulina.

Se disolvieron 100 µg de fibrinógeno plasmático humano en 100 µl de tampón de deiminación (PBS pH 7,6, CaCl₂ 10 mM, Ditiotreitól 5mM) y se deiminaron durante 3 horas a 37 °C con huPAD2 o huPAD4 53,4 mU. 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) y se cargaron 7,5 µg de fibrinógeno deiminado o no deiminado en cada pista de un SDS-PAGE (12,5%) y se separaron, seguido de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond C extra (Amersham Biosciences). La transferencia y la carga fueron verificadas por tinción Ponceau S.

Los borrones se bloquearon durante 2 horas a TA 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 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 contenía 20 µg 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 2 lavados con PBS para separar por lavado todo el anticuerpo no unido.

Las 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 los borrones incubados con RhmAb2.102 y RhmAb2.104 mostraron una reactividad más elevada con el fibrinógeno plasmático humano deiminado que RhmAb2.101. De nuevo, RhmAb2.102 mostró una afinidad más elevada en comparación con RhmAb2.104.

Ejemplo 11: 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, 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 12: Potencial terapéutico de RhmAb2.102

El modelo de ratón de la artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) comercialmente disponible de ModiQuest Research BV (N° 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 µg 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).

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 (influjo 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

cartilago (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 cartilago normal, totalmente teñido a cartilago 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 cartilago completamente vacía. La erosión de cartilago 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 cartilago 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.

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 influjo de células inflamatorias (Figura 7D), la erosión del cartilago (Figura 7B), el agotamiento de PG del cartilago (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 13: Preparación de extracto de HEK293 deiminado con huPAD4 e inmunoprecipitación con RhmAb2.101 o RhmAb2.102

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 1U de PAD4 humana por cada 2 mg de proteína (ModiQuest Research BV; N° de Cat.: MQ16.203), CaCl₂ 10 mM y DTT 5 mM.

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.

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 pH 8,0, 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 (citrato 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 14).

Ejemplo 14: 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 7. 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).

- 5 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 7.

10

Tabla 7 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 [Homo sapiens]	~
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 1 de unión a factor 1 modulado en poliamina [Homo sapiens]	~
gi 21614544 ref NP_002955.2	proteína A8 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	hornerina [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') 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 dermicitina [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 15. Generación/selección de una familia de anticuerpos anti-inflamatorios

5 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).

10 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 14, Tabla 7), 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.

15 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 la tabla 7) equiparables 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.

20 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 RhmAb2.105 (SEQ ID 39 y 40) y RhmAb2.107 (SEQ ID NOs 41 y 42). Las secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos se enumeran en las SEQ ID NOs 43 a 46.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ModiQuest BV
 < 120> Agentes Anti-Inflamatorios
 < 130> 037WO
 5 < 150> EP 09155484
 < 151> 18-03-2009
 < 150> EP 08171920
 < 151> 17-12-2008
 < 150> EP 08157547
 10 < 151> 04-06-2008

 <160> 46
 < 170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 < 211> 17
 15 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus
 < 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
 20 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus
 < 400> 2
 Arg Lys Glu Ser Tyr Ser Ile Tyr Val Tyr Lys Val
 1 5 10

 <210> 3
 25 < 211> 17
 < 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
 30 Ile

 <210> 4
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> H2bn Bos Taurus
 35 < 400> 4
 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
 < 212> PRT
 40 < 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
 < 211> 12
 45 < 212> PRT
 < 213> Rattus norvegicus

ES 2 652 127 T3

< 400> 6

Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg

1

5

10

<210> 7

< 211> 12

5 < 212> PRT

< 213> Rattus norvegicus

< 400> 7

Arg Ile Ser Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly

1

5

10

<210> 8

10 < 211> 1431

< 212> ADN

< 213> ser humano

< 400> 8

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcccag	60
gtacagctgc agcagtcagg gggaggcctg gtcaggccgg ggggggccct gagactctcc	120
tgtgcagcct ccggaattcaa cctcagcacc aattttatga actgggtccg ccagagtcga	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
atggtcaccc tgcgtcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc	480
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc	540
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc	600
gctgtcctac agtctcagc actctactcc ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc	660
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg	720
gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca	780
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc	840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct	900
gaggtaagat tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg	960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag	1020
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aagggtctcca acaaagccct ccagccccc	1080
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	1140
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	1260
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc	1320
gtggacaaga gcagggtggc gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cggtgaaatg a	1431

15 <210> 9

< 211> 705

< 212> ADN

< 213> ser humano

ES 2 652 127 T3

< 400> 9

atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	gcattcccag	60
tctgtgttga	ctcagccgcc	ctcaatgtct	gcggccccag	gacagaaggt	cacgatctcc	120
tgctctggaa	gcagctccaa	cattggcaat	aattatgtat	cctggtatca	gcaagtccca	180
ggaacagccc	ccaaactcct	catttatgac	gacaataaga	gacctcccg	aattcccggc	240
cgattctctg	gctccaagtc	tgccacgtcc	gccaccctgg	gcacaccgg	actccaggct	300
ggggacgagg	ccgattatta	ctgcggatca	tgggatgata	acctgagtgt	tgtgcttttc	360
ggcggaggga	ccaagctgac	cgtcctaggt	cagcccaagg	ctgccccctc	ggtcactctg	420
ttcccgccct	cctctgagga	gttcaagcc	aacaaggcca	cactggtgtg	tctcataagt	480
gacttctacc	cgggagccgt	gacagtggcc	tggaaggcag	atagcagccc	cgtcaaggcg	540
ggagtggaga	ccaccacacc	ctccaacaa	agcaacaaca	agtacgcggc	cagcagctat	600
ctgagcctga	cgcttgagca	gtggaagtcc	cacagaagct	acagctgcca	ggtcacgcat	660
gaagggagca	ccgtggagaa	gacagtggcc	cctacagaat	gttca		705

<210> 10

5 < 211> 1431

< 212> ADN

< 213> mus musculus

< 400> 10

atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	gcattcccag	60
gtacagctgc	agcagtcagg	gggaggcctg	gtcaggccgg	gggggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcct	ccggattcaa	cctcagcacc	aattttatga	actgggtccg	ccagagtoga	180
gggaaggggc	tggagtggat	ctcatccatt	agttggactg	gtgatgatat	atatgaggca	240
gactcactga	agggccgatt	caccgtctcc	agagacaacg	ccaagaacac	agtgtatctg	300
caactgagca	gcctgacacc	ggacgacacg	gctgtctatt	actgtgagag	agtgcgccag	360
tatcgtgatg	gtagggggta	tgtcgttaat	gacgtctctg	atatttgagg	ccaagggaca	420
atggtcaccg	tgtcgtcagc	caaaacaaca	gccccatcgg	tctatccact	ggcccctgtg	480
tgtggagata	caactggctc	ctcggtgact	ctaggatgcc	tgggtcaagg	ttatttccct	540
gagccagtga	ccttgacctg	gaactctgga	tccctgtcca	gtggtgtgca	caccttccca	600
gctgtcctgc	agtctgacct	ctacaccctc	agcagctcag	tgactgtaac	ctcgagcacc	660
tggcccagcc	agtccatcac	ctgcaatgtg	gcccaccggc	caagcagcac	caagggtggac	720
aagaaaattg	agcccagagg	gccacaatc	aagccctgtc	ctccatgcaa	atgccagca	780
cctaacctct	tgggtggacc	atccgtcttc	atcttccctc	caaagatcaa	ggatgtactc	840
atgatctccc	tgagccccat	agtcacatgt	gtggtggtgg	atgtgagcga	ggatgaccca	900
gatgtccaga	tcagctgggt	tgtgaacaac	gtggaagtac	acacagctca	gacacaaacc	960
catagagagg	attacaacag	tactctccgg	gtggtcagtg	ccctcccat	ccagcaccag	1020
gactggatga	gtggcaagga	gttcaaatgc	aaggtaaca	acaaagacct	cccagcgccc	1080
atcgagagaa	ccatctcaaa	acccaaagg	tcagtaagag	ctccacaggt	atatgtcttg	1140
cctccaccag	aagaagagat	gactaagaaa	caggtcactc	tgacctgcat	ggtcacagac	1200
ttcatgcctg	aagacattta	cgtggagtgg	accaacaacg	ggaaaacaga	gctaaactac	1260
aagaacactg	aaccagtcct	ggactctgat	ggttcttact	tcatgtacag	caagctgaga	1320
gtggaaaaga	agaactgggt	ggaaagaaat	agctactcct	gttcagtggg	ccacgagggg	1380
ctgcacaatc	accacacgac	taagagcttc	tcccggactc	cgggtaaata	g	1431

10 <210> 11

< 211> 711

< 212> ADN

< 213> mus musculus

< 400> 11

ES 2 652 127 T3

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcccag      60
tctgtgttga ctcagccgcc ctcaatgtct gcggccccag gacagaaggt cacgatctcc      120
tgctctggaa gcagctccaa cattggcaat aattatgtat cctggtatca gcaagtccca      180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac gacaataaga gaccctccgg aattcccggc      240

cgattctctg gctccaagtc tgccacgtcc gccaccctgg gcatacccg actccaggt      300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggatca tgggatgata acctgagtgt tgtgcttttc      360
ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc      420
ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac      480
ttctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg aaaaaatggc      540
gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc      600
ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac      660
aagacatcaa cttcacccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagtgtta g              711

```

<210> 12

5 <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

Val His Ser

10 <210> 13

<211> 127

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 13

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

15 115 120 125

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> ser humano

20 <400> 14

ES 2 652 127 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
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
<213> ser humano

ES 2 652 127 T3

< 400> 15

```
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

5 < 212> PRT

< 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
```

10

<210> 17

< 211> 110

< 212> PRT

< 213> ser humano

ES 2 652 127 T3

< 400> 17

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> 18

< 211> 107

5 < 212> PRT

< 213> mus musculus

< 400> 18

Gly Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

10

<210> 19

< 211> 127

< 212> PRT

< 213> ser humano

ES 2 652 127 T3

< 400> 19

```

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> 20

< 211> 330

< 212> PRT

< 213> mus musculus

< 400> 20

5

ES 2 652 127 T3

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220
 Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255
 Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 21

< 211> 12

5 < 212> PRT

< 213> ser humano

< 220>

< 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA

< 222> (6)..(6)

10 < 223> X = citrulina

< 400> 21

Ala Ala Ala Ser Gly Xaa Gly Lys Gln Gly Gly Lys

1

5

10

<210> 22
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 5 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 22
 Ala Lys Ala Lys Ser Xaa Ser Ser Arg Ala Gly Leu
 10 1 5 10
 <210> 23
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 15 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 23
 Lys Ser Arg Ser Ser Xaa Ala Gly Leu Gln Phe Pro
 20 1 5 10
 <210> 24
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 25 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 24
 Gln Phe Pro Val Gly Xaa Val His Arg Leu Leu Arg
 30 1 5 10
 <210> 25
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 35 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 25
 Val Gly Arg Val His Xaa Leu Leu Arg Lys Gly Asn
 40 1 5 10
 <210> 26
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 45 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 26
 Val His Arg Leu Leu Xaa Lys Gly Asn Tyr Ser Glu
 50 1 5 10
 <210> 27
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 55 < 220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 27
 Gly Asn Tyr Ser Glu Xaa Val Gly Ala Gly Ala Pro
 5 1 5 10
 <210> 28
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 10 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 28
 Ala Gly Asn Ala Ala Xaa Asp Asn Lys Lys Thr Arg
 15 1 5 10
 <210> 29
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 20 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 29
 Asp Asn Lys Lys Thr Xaa Ile Ile Pro Arg His Leu
 25 1 5 10
 <210> 30
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 30 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 30
 Thr Arg Ile Ile Pro Xaa His Leu Gln Leu Ala Ile
 35 1 5 10
 <210> 31
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 40 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 31
 45 Leu Gln Leu Ala Ile Xaa Asn Asp Glu Glu Leu Asn
 1 5 10
 <210> 32
 < 211> 12
 50 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 < 222> (6)..(6)
 55 < 223> X = citrulina

<400> 32
 Asn Lys Leu Leu Gly Xaa Val Thr Ile Ala Gln Gly
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 22
 5 <212> PRT
 <213> ser humano
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (15)..(17)
 10 <223> X = citrulina
 <400> 33
 Leu Ser Glu Gly Gly Gly Val Arg Gly Pro Arg Val Val Glu Xaa His
 1 5 10 15
 Xaa Ser Gln Cys Lys Asp
 20
 <210> 34
 <211> 22
 15 <212> PRT
 <213> ser humano
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 20 <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
 25 <212> PRT
 <213> ser humano
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (15)..(15)
 30 <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
 35 <212> PRT
 <213> ser humano
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> X = citrulina
 40 <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
 <210> 37
 <211> 17

5 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 < 220>
 < 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
 10 <210> 38
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> ser humano
 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA _MISCELÁNEA
 < 222> (4)..(11)
 < 223> X = citrulina
 < 400> 38
 Tyr Val Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro
 1 5 10 15
 20 <210> 39
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 < 400> 39
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Pro Val Lys Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys His Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Ser Arg His His Gly Gly Asn Ala Thr Phe Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 His Lys Ser Arg Val Ser Leu Leu Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Met His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Leu His Ile Asp Gly Trp Asn Asp Ala Phe Glu Ile
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 40
 < 211> 110
 < 212> PRT
 < 213> homo sapiens

ES 2 652 127 T3

< 400> 40

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Arg Gln
1           5           10           15
Arg Val Thr Ile Pro Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Asn Asn
          20           25           30
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu
          35           40           45
Met Ser Trp Asp Ser Val Leu Ser Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
          50           55           60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65           70           75           80
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Val
          85           90           95
Asp Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 41

< 211> 123

5 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

< 400> 41

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Ser Ser Glu
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys His Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Gly
          20           25           30
Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35           40           45
Ile Gly Ser Arg His His Gly Gly Asn Ala Thr Phe Tyr Asn Pro Ser
          50           55           60
His Lys Ser Arg Val Ser Leu Leu Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65           70           75           80
Ser Leu Lys Met His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
          85           90           95
Cys Ala Arg Gly Leu His Ile Asp Gly Trp Asn Asp Ala Phe Glu Ile
          100          105          110
Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 42

10 < 211> 110

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 42

ES 2 652 127 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Asp Ser Asn Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Arg Val Gln Trp Tyr Gln Lys Val Ala Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Met Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Met Ser Asp Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Gly Glu Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser Phe
 85 90 95
 Arg Gly Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 43

<211> 369

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<400> 43

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcccagga ccggtgaagt cttcggagac cctgtctctc 60
 acctgccatg tctccggtta ctccatcagc gatggttact actggggctg gatccggcag 120
 tccccagggga agggactgga gtggattggg agtaggcatac atgggggggaa cgccaccttc 180
 tacaatccgt cacacaagag tcgagtcagc ctcttaattg acacctccaa gaaccagttg 240
 tccctgaaga tgcactctgt gaccgccgca gacacggcca tttactactg tgcgagaggg 300
 cttcatatcg atggttggaa cgatgctttt gagatctggg gccgagggac cacggtcacc 360
 gtgtcgtca 369

<210> 44

<211> 330

<212> ADN

10 <213> homo sapiens

<400> 44

tcctatgtgc tgactcagcc gtccctcgggtg tctggagccc ccaggcagag ggtcaccatt 60
 ccctgttctg gaagccgctc caacatcgga aacaacgctg taaactggta ccagcaggtc 120
 ccaggacagg ctcccaaact cctcatgtct tgggatagtg tgctgtctc aggggtctct 180
 gaccgattct caggctccaa atctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 gctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gtttgggatg actcagtga tggttgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 45

<211> 369

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 45

caggtacagc tgcagcagtc agggccagga ctggtgaagt cttcggagac cctgtctctc 60
 acctgccatg tctccggtta ctccatcagc gatggttact actggggctg gatccggcag 120
 tccccagggga agggactgga gtggattggg agtaggcatac atgggggggaa cgccaccttc 180
 tacaatccgt cacacaagag tcgagtcagc ctcttaattg acacctccaa gaaccagttg 240
 tccctgaaga tgcactctgt gaccgccgca gacacggcca tttactactg tgcgagaggg 300
 cttcatatcg atggttggaa cgatgctttt gagatctggg gccgagggac aatggtcacc 360
 gtgtcgtca 369

ES 2 652 127 T3

<210> 46
 < 211> 330
 < 212> ADN
 < 213> homo sapiens

5 < 400> 46
 cagtctgtgc tgactcagcc gtctcagtg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaggcgactc caacatcgga actaatagag tgcagtggta tcaaaaagtc 120
 gcaggaacgg cccccaaact gtcctgttac gaagatgatg agcggccctc aggggttcct 180
 gaccgattct ctggctccat gtctgacacc tcggcctcac tggccatcag tggactccag 240
 tctgaggatg aggggtgaata ttactgttca gcctgggatg acagtttcag aggggtggcg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo, específicamente reactivo con un epítipo citrulinado sobre un péptido con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 21 para uso en la prevención o el tratamiento de artritis.
- 5 2. Anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la artritis se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica y artritis idiopática juvenil.
3. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, el cual es un anticuerpo monoclonal.
4. Anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 17 y una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 19, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430749 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430773, un anticuerpo de ratón recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430749 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430773, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430732 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430753, un anticuerpo de ratón recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430732 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430753, un anticuerpo recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 40, y un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 42.
- 10 5. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que comprende un dominio de unión específico derivado de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 17 y una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 19, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430749 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430773, un anticuerpo de ratón recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430749 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430773, un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430732 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430753, un anticuerpo de ratón recombinante que comprende una cadena pesada como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430732 y una cadena ligera como la depositada en la base de datos EMBL con número de acceso: AJ430753, un anticuerpo recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 40, y un anticuerpo humano recombinante que comprende una cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 42.
- 25 6. Anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 5, el cual es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo de cadena sencilla.
7. Anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 4-6, que comprende fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs), regiones de unión al antígeno de fragmento (Fabs), anticuerpos de dominios sencillos (sdabs), o anticuerpos VHH o nanocuerpos tales como anticuerpos de dominio sencillo derivados de camélidos, o fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo derivados de IgNAR de tiburón (VNAR).
- 40 45

Figura 1 a y b

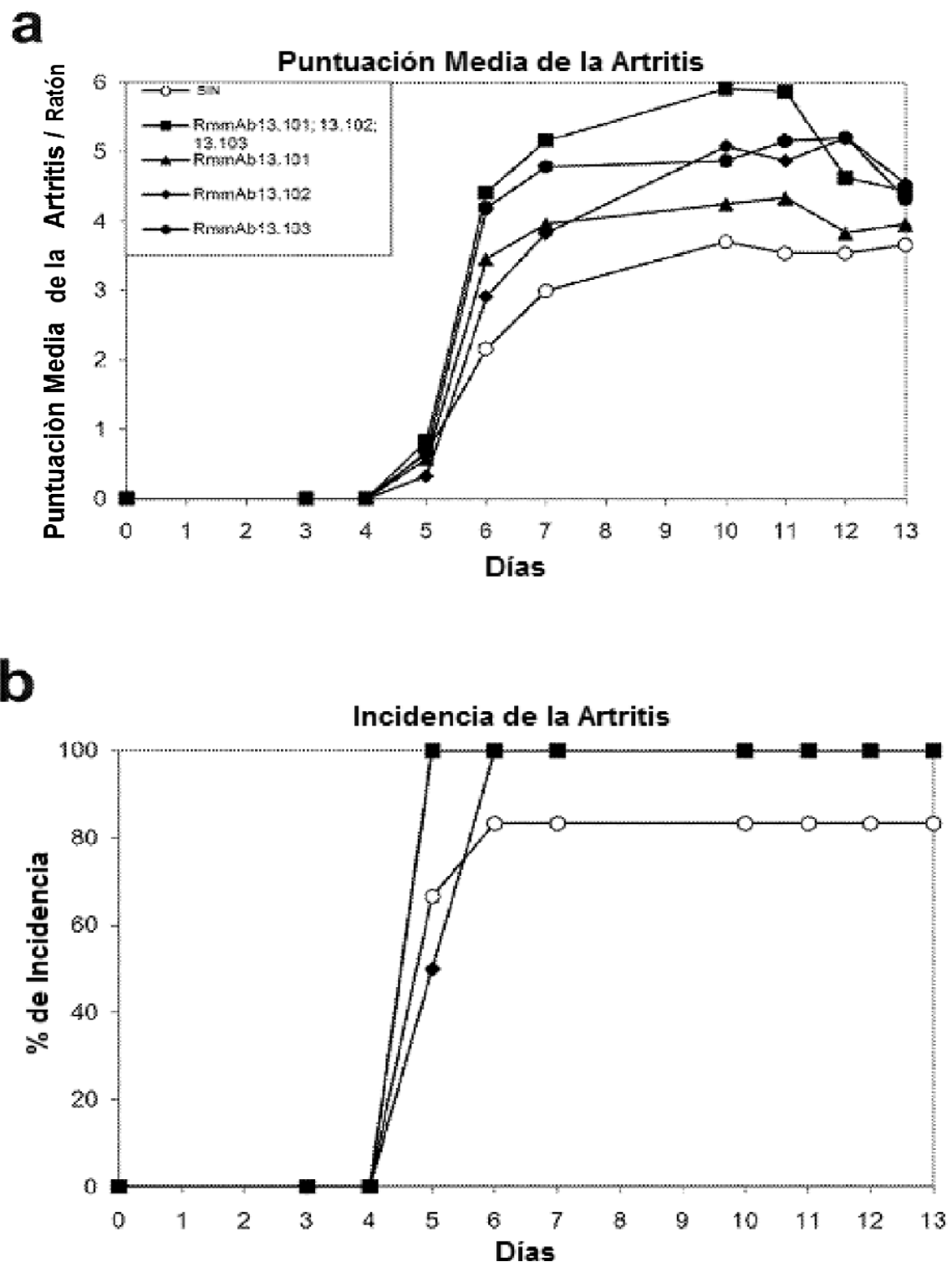


Figura 1 c y d

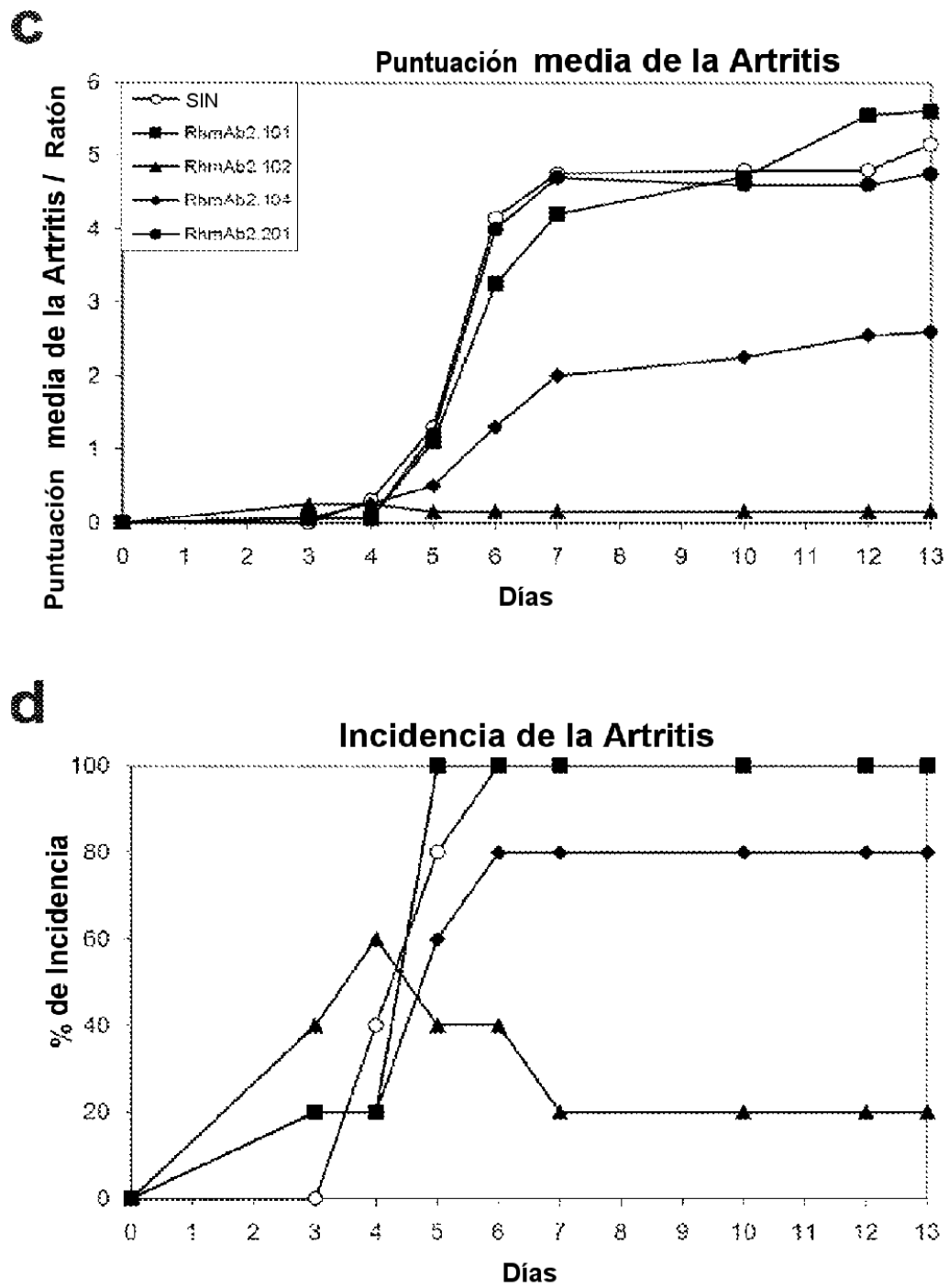


Figura 1 e y f

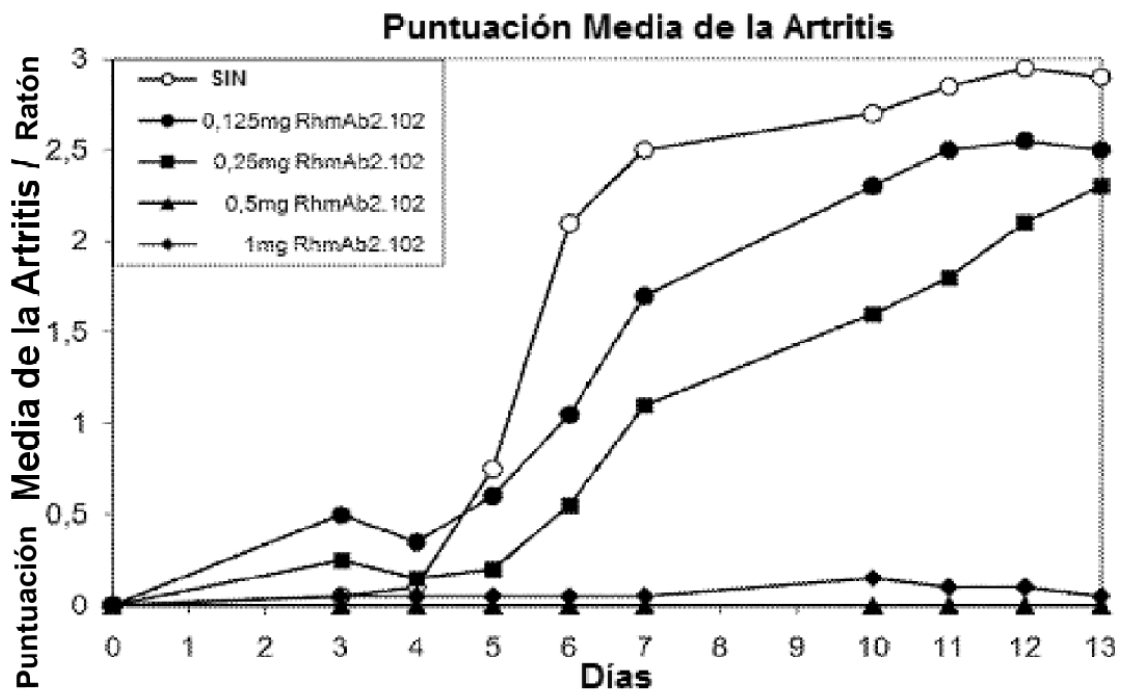
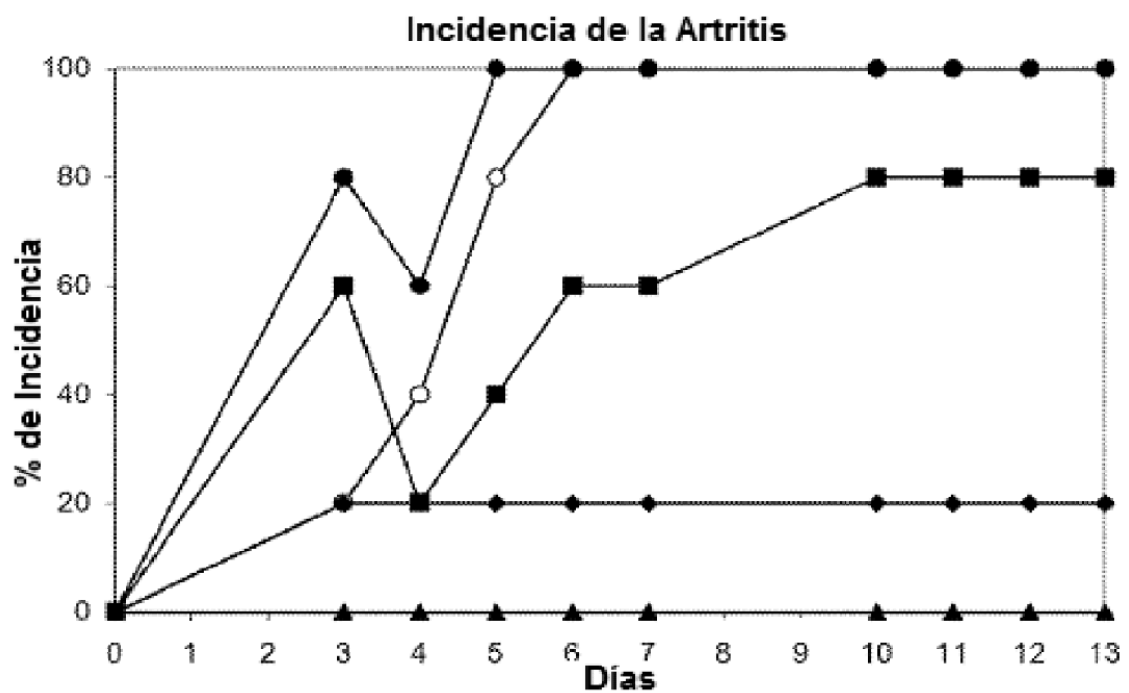
e**f**

Figura 2A (RhmAb2.101)

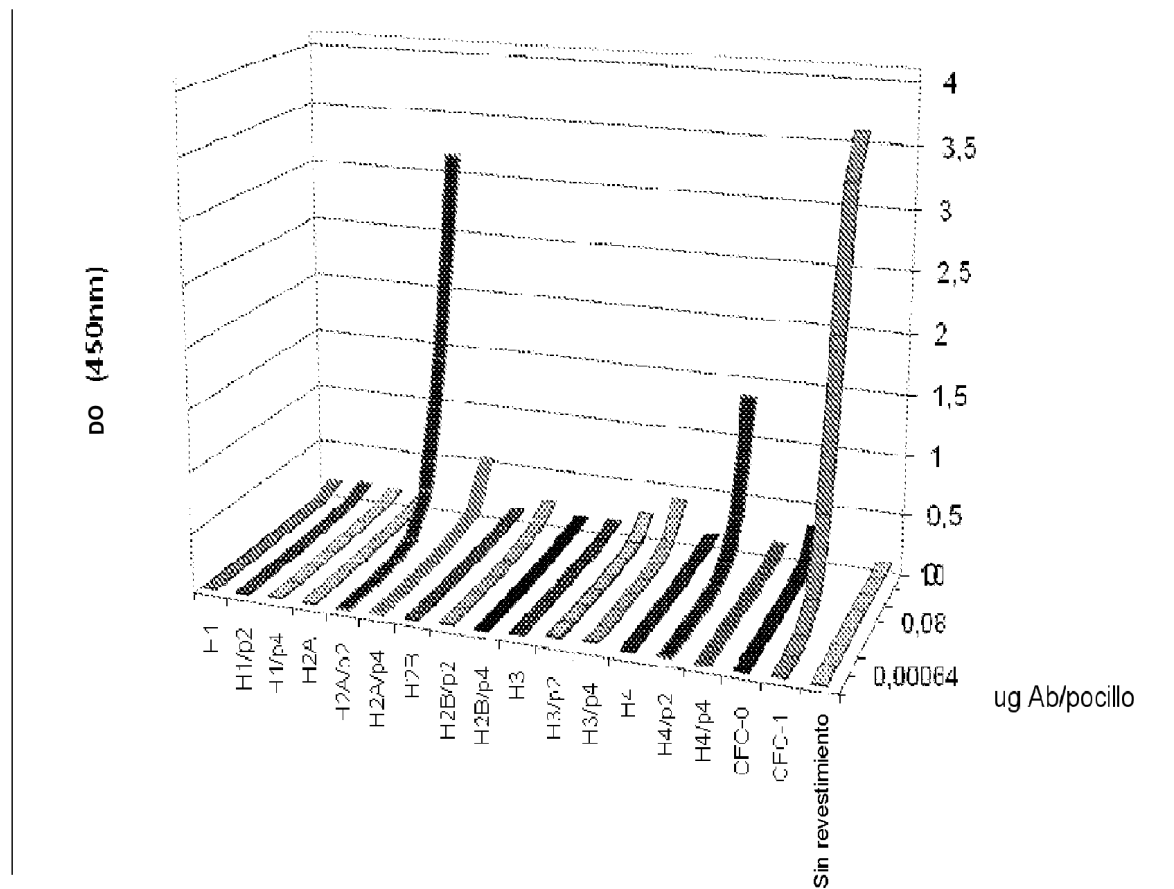


Figura 2B (RhAb2.102)

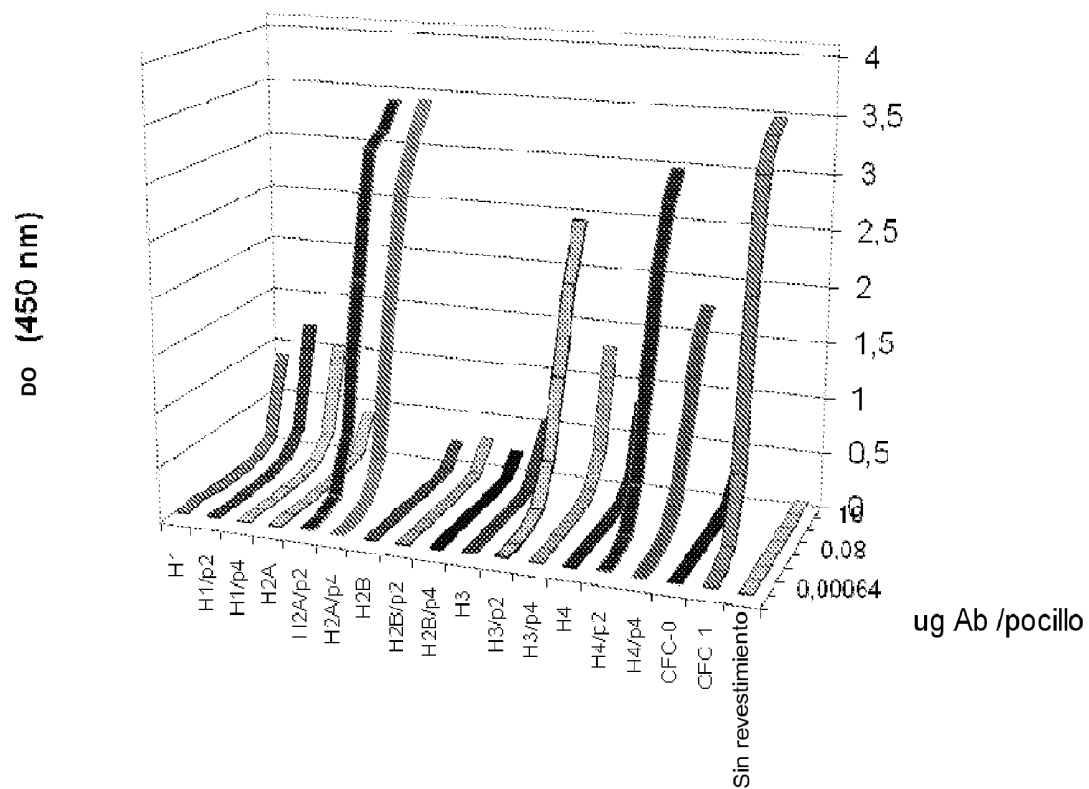


Figura 2C (RhmAb2.104)

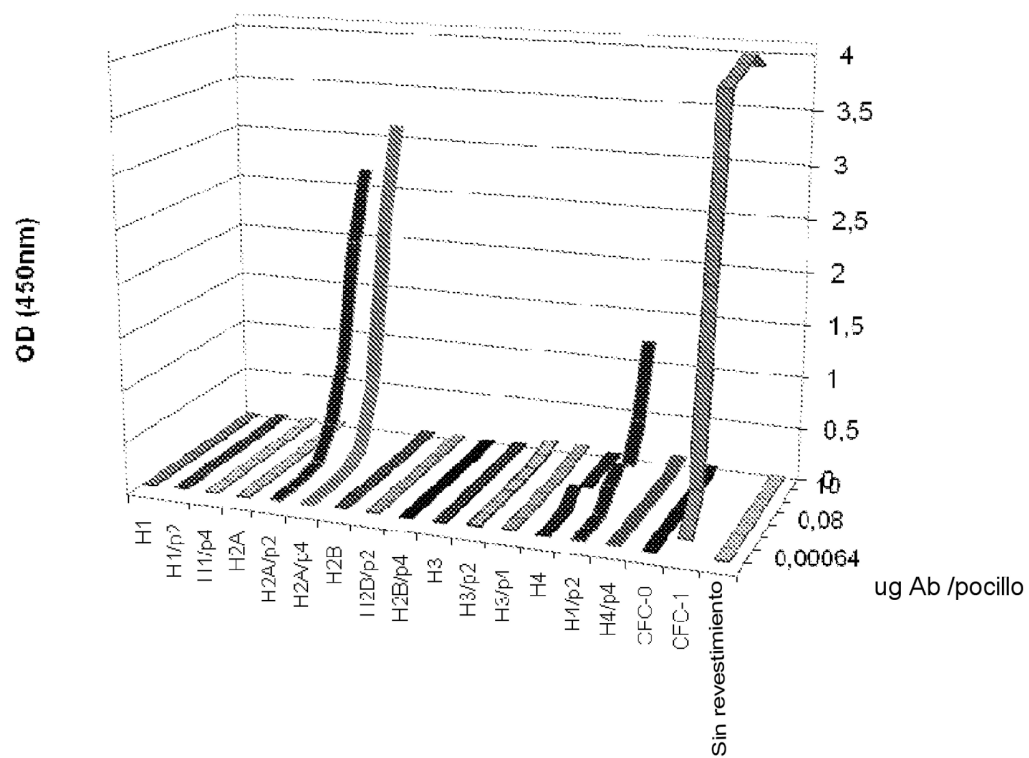


Figure 3A (RhAb2.101)

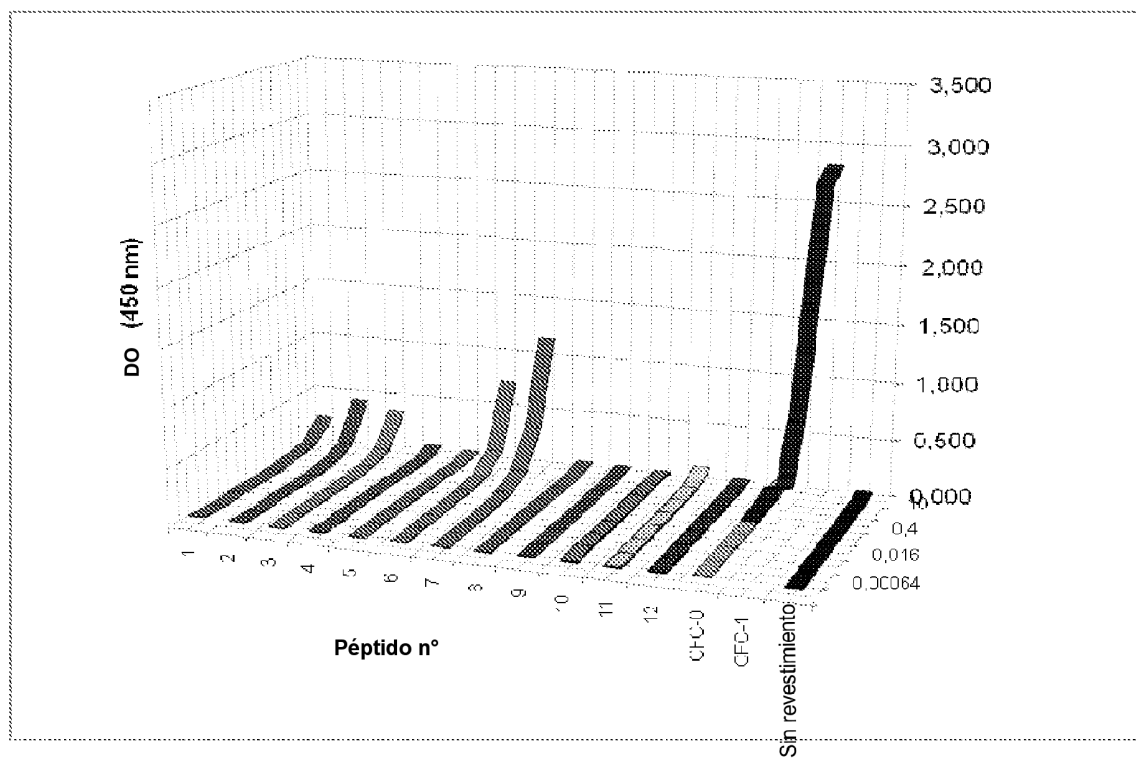


Figura 3B (RhAb2.102)

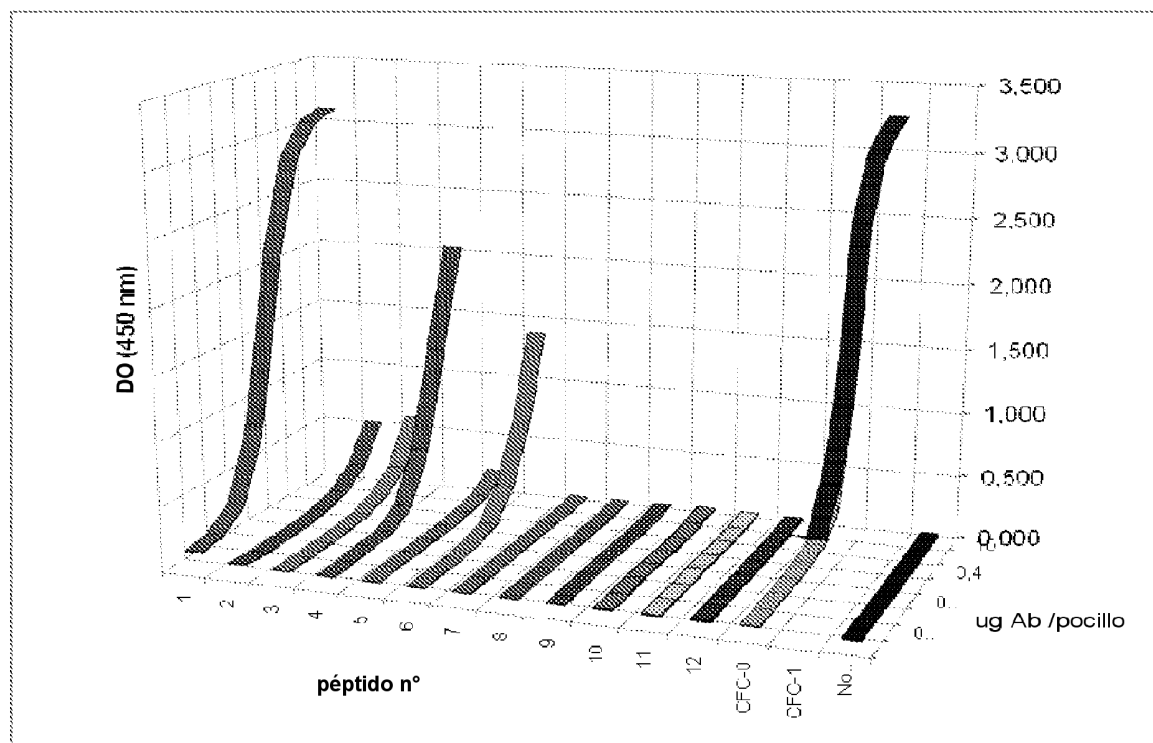


Figura 3C (RhAb2.104)

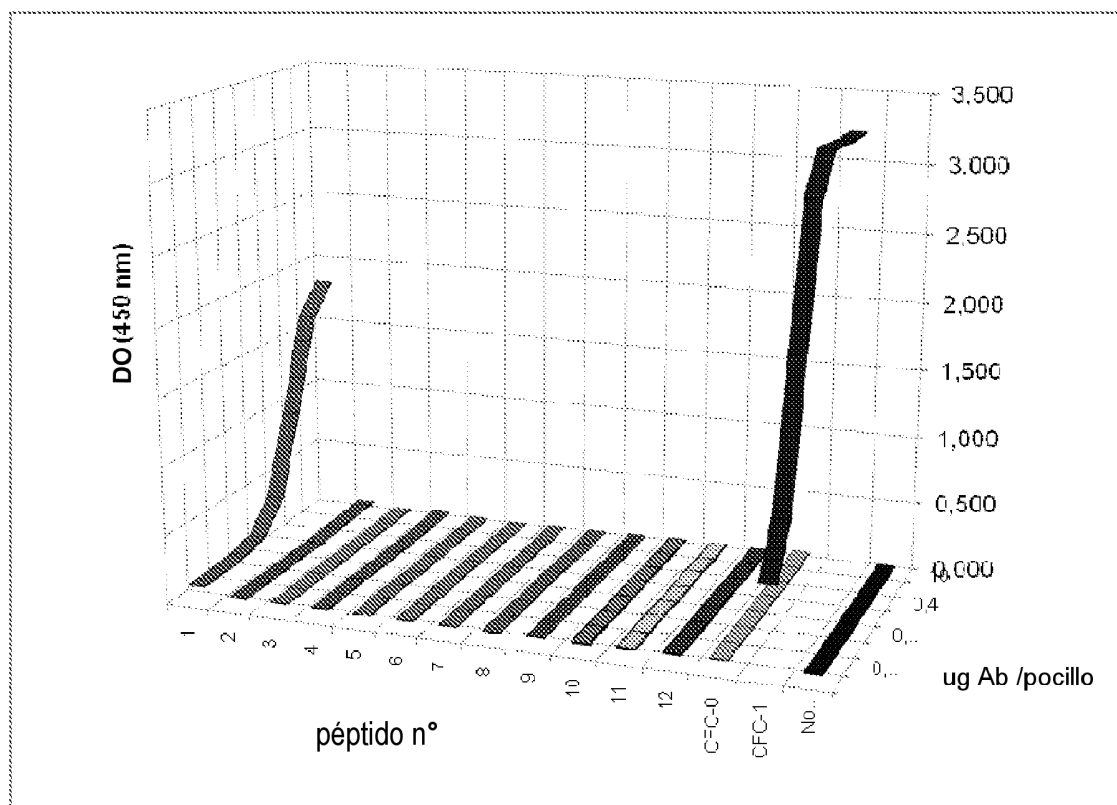


Figura 4A (RhmAb2.101)

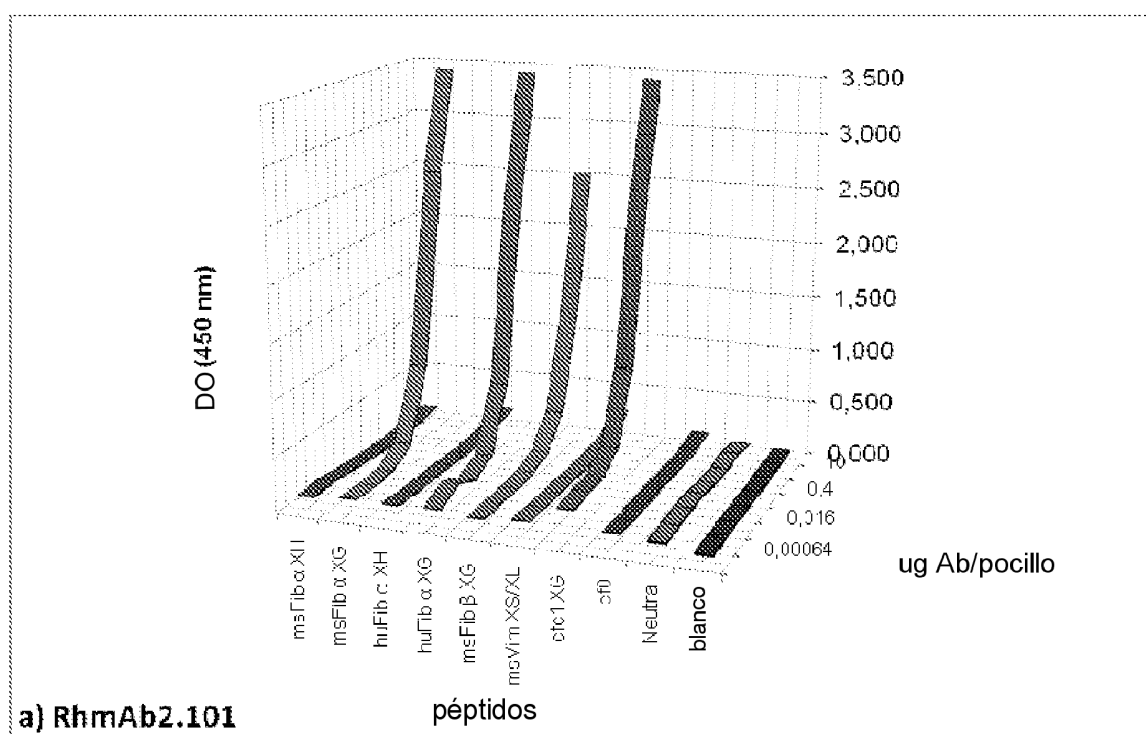


Figura 4B (RhmAb2.102)

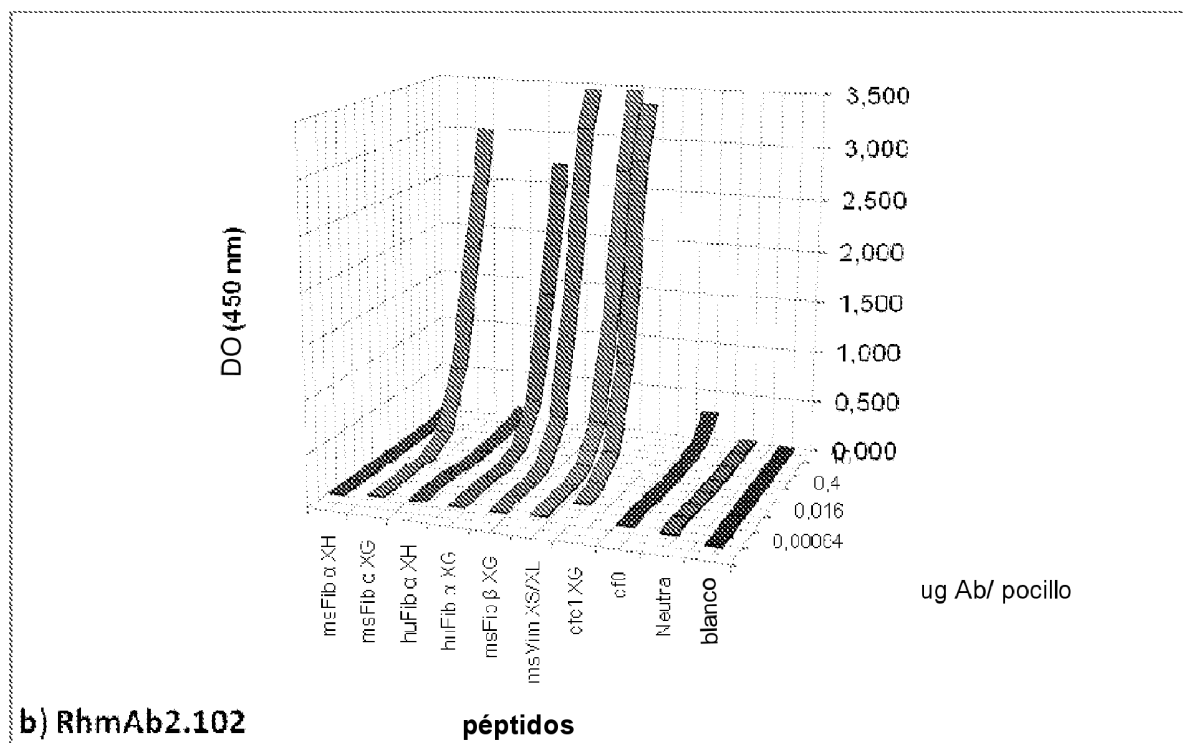


Figura 4C (RhmAb2.104)

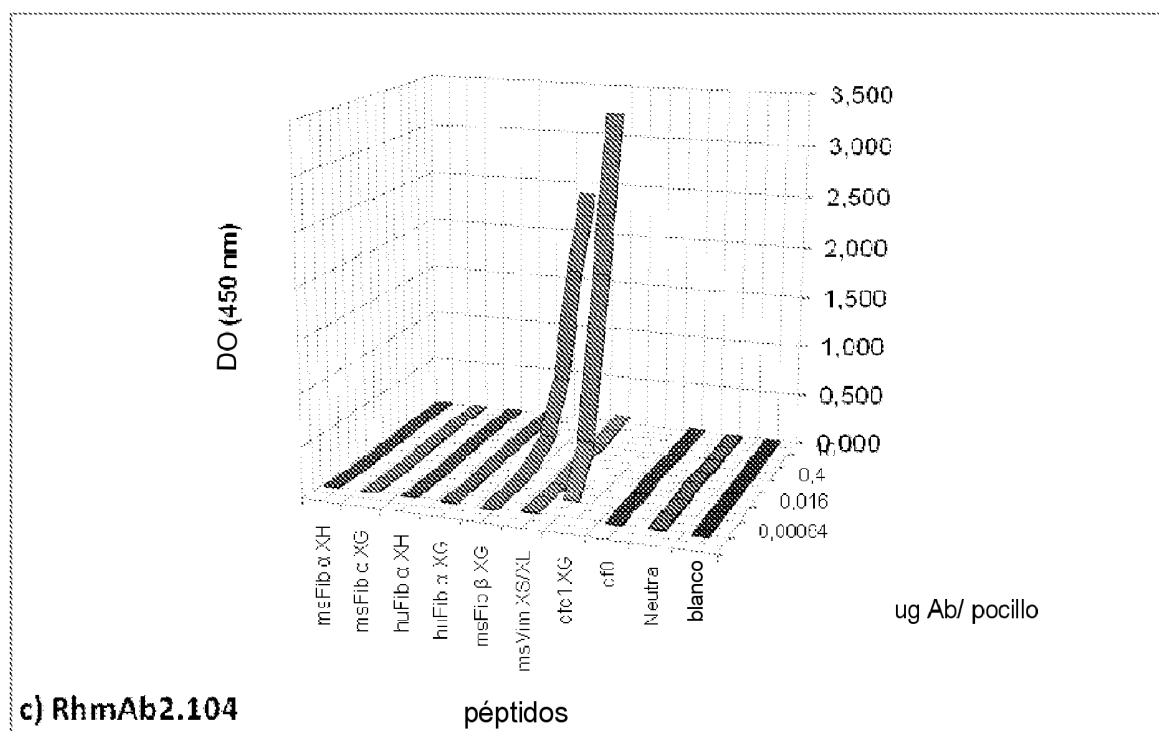


Figura 5A

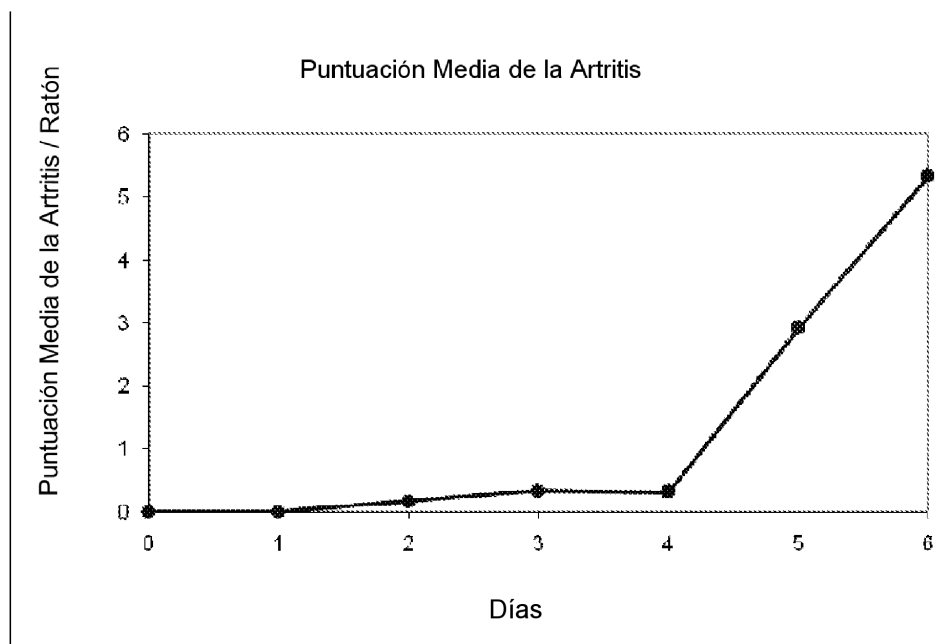


Figura 5B

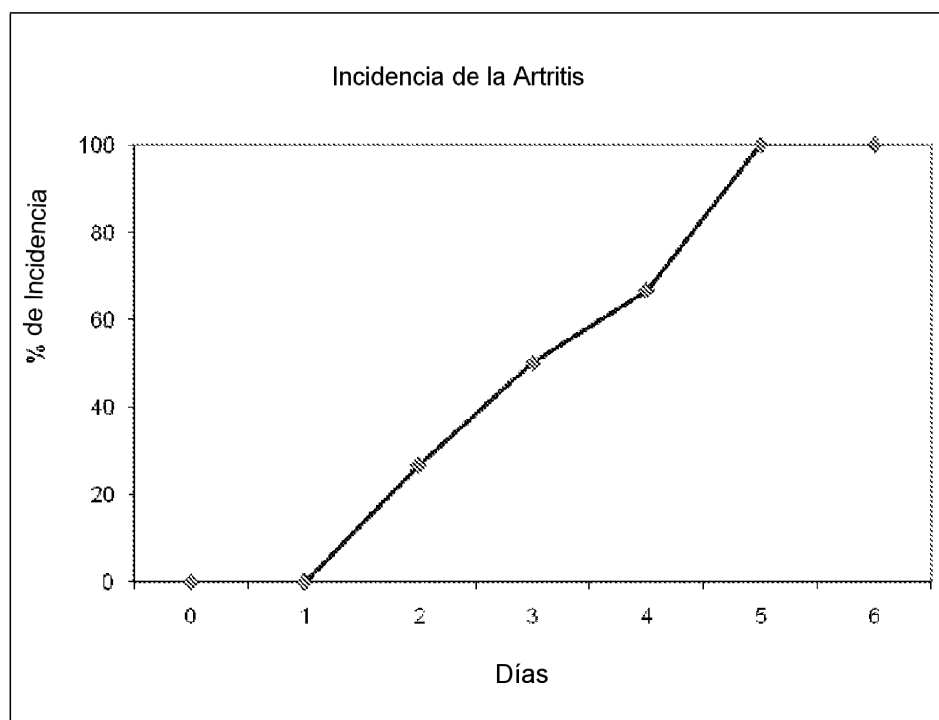


Figura 6

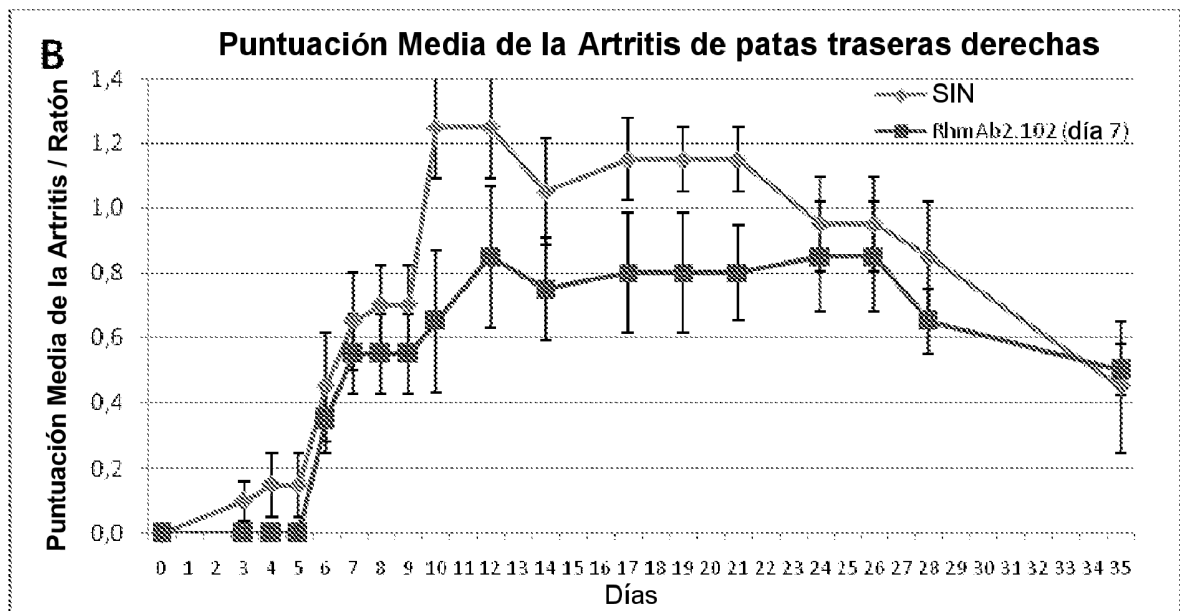
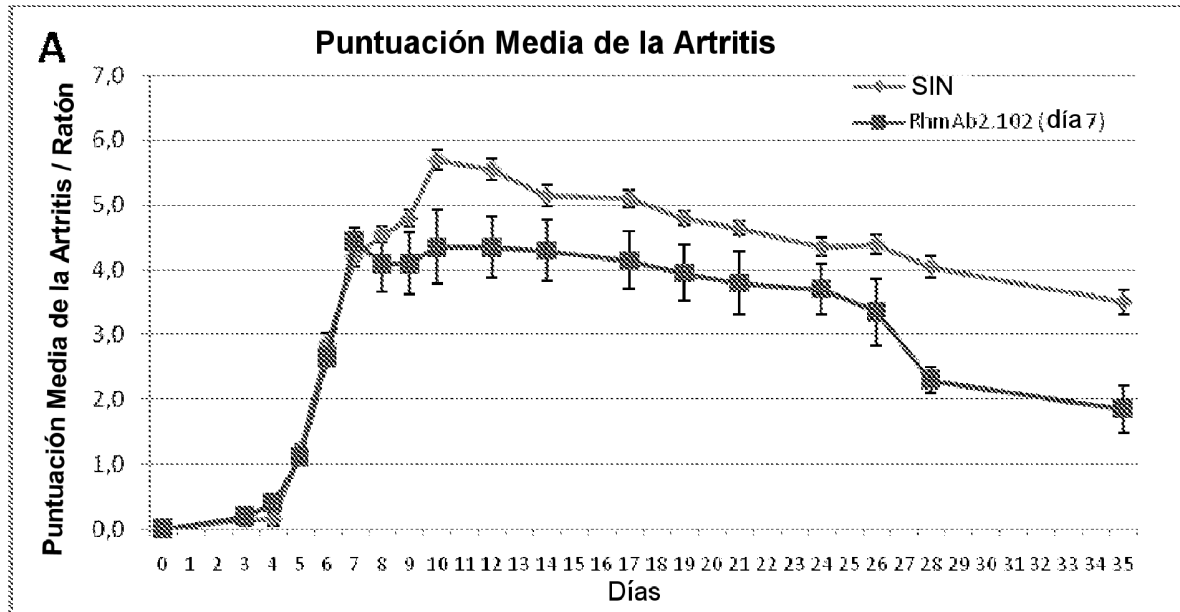


Figura 8

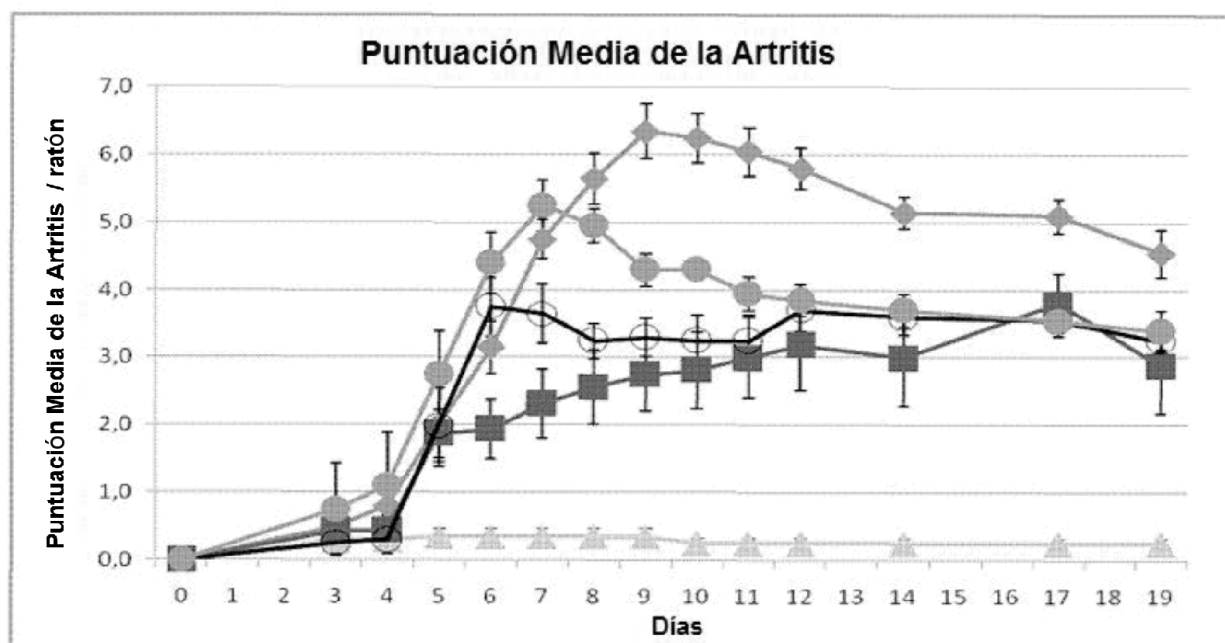


Figura 9

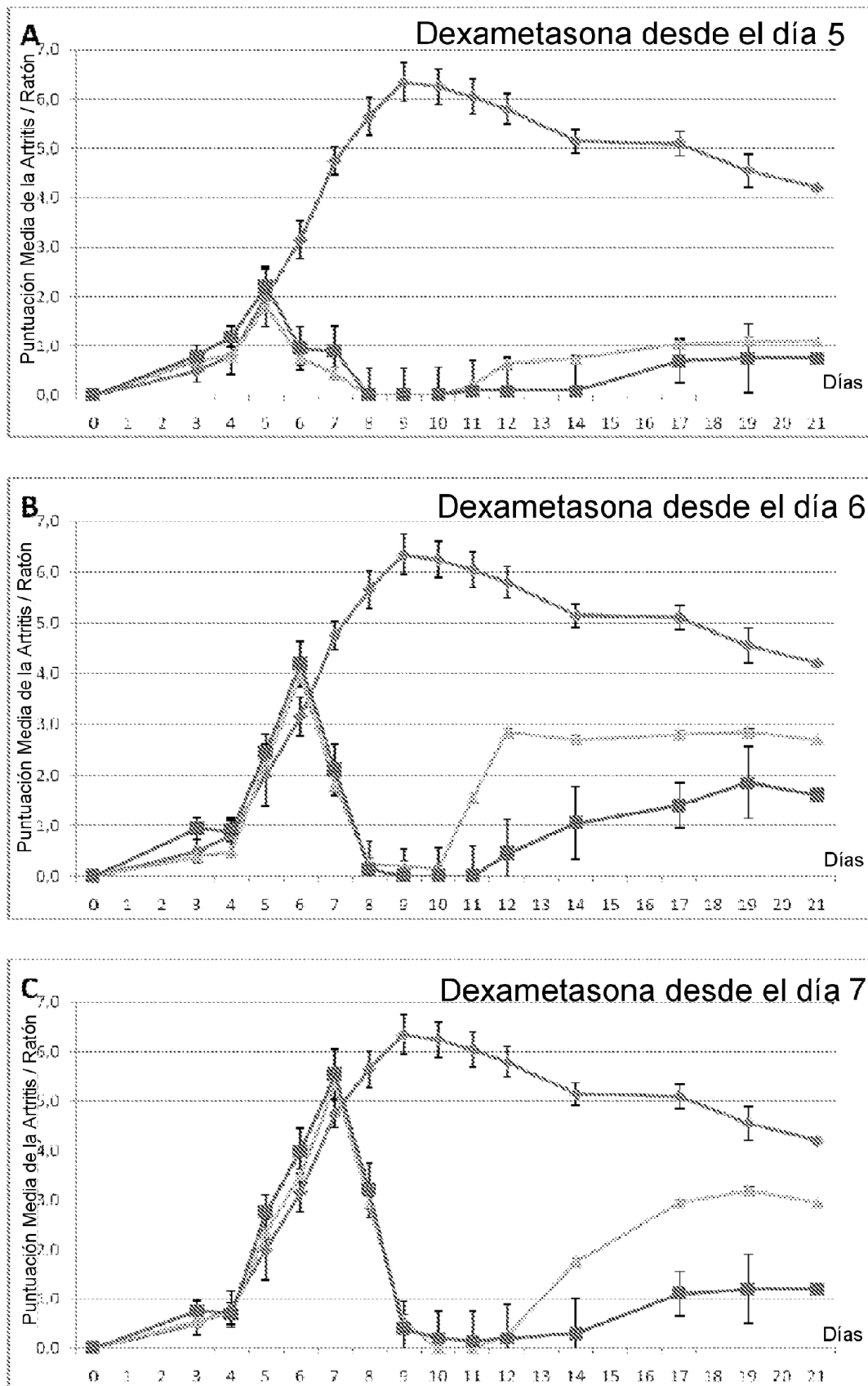


Figura 10

