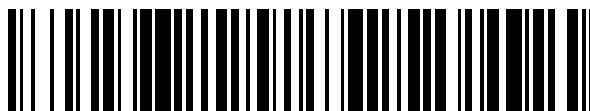


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 364**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015 PCT/EP2015/079443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16092082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015 E 15808589 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3229829**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática**

30 Prioridad:

11.12.2014 EP 14197374

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2019

73 Titular/es:

**MODIQUEST B.V. (100.0%)
Kloosterstraat 9
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**CHIRIVI, RENATO GERARDUS SILVANO y
RAATS, JOZEF MARIA HENDRIK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 724 364 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

Procedimiento de tratamiento de fibrosis pulmonar idiopática

Campo de la invención

- 5 La invención se encuentra en el campo de los procedimientos y preparaciones para tratamientos médicos, en particular, el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). La invención proporciona tales procedimientos en los que se utilizan anticuerpos o fragmentos de los mismos que reaccionan con epítopos citrulinados seleccionados en el tratamiento de la FPI. Se halló que anticuerpos contra epítopos citrulinados situados en el extremo amino-terminal de polipéptidos de histona H2A y H4 son particularmente útiles.

Antecedentes de la invención

- 10 La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar fibroproliferativa crónica compleja de etiología desconocida, con una incidencia creciente. La enfermedad se caracteriza por la acumulación progresiva de matriz extracelular en el intersticio. Es una enfermedad progresiva e irreversible con una supervivencia media estimada de solo 36 meses. Históricamente, los corticosteroides (p. ej., prednisolona) en combinación con inmunosupresores (p. ej., azatioprina) y/o N-acetilcisteína, se han propuesto por ser razonables, pero la estrategia de tratamiento no se ha probado para la FPI. Otro fármaco que ha sido aprobado para el tratamiento de la FPI en Japón, Europa, India y Canadá es pirfenidona. La pirfenidona es una piridina administrada por vía oral que ha combinado acciones antiinflamatorias, antioxidantes y antifibróticas en modelos experimentales de fibrosis pulmonar, aunque se desconoce el mecanismo preciso de acción. Es el único fármaco para el que se ha observado un tiempo de supervivencia libre de progresión mejorada. En la actualidad, no existe evidencia científica que sugiera que las estrategias terapéuticas actuales pueden revertir la fibrosis en la FPI; el objetivo realista de las terapias objeto de la investigación es estabilizar o reducir la tasa de progresión de la enfermedad.

La solicitud de patente internacional WO 2013/144758 A1 desvela el tratamiento de la FPI utilizando anticuerpos N-cadherina. El anticuerpo desvelado en el documento WO 2013/144758 A1 puede ser cualquier anticuerpo N-cadherina antagonizante o neutralizante adecuado para uso terapéutico.

- 25 La solicitud de patente internacional WO 2011/070172 A1 desvela composiciones y procedimientos para tratar o prevenir afecciones inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias relacionadas con citrulina, proporcionando moléculas de unión específica dirigidas contra epítopos que contienen citrulina para su uso en la terapia y prevención de afecciones inflamatorias.

- 30 Giles y col. (PLOS ONE, junio de 2014, volumen 9, edición 6, e98794) desvelan que la prevalencia y la extensión de la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) fue notablemente más alta entre los pacientes con artritis reumatoide (AR) con anticuerpos anti-PAD3/4 con reactividad cruzada, incluso después de tener en cuenta los factores de confusión relevantes, particularmente entre los fumadores ocasionales. Giles y col. sugieren mecanismos etiopatológicos de la AR-EPI, y su utilidad clínica para predecir la EPI justifica un estudio adicional.

- 35 Cavagna y col. (BioMed Research International Volumen 2013, artículo ID 759760) desvelan que aunque la EPI es una manifestación extraarticular relevante de la AR con un impacto sustancial en el pronóstico, Cavagna y col. afirman que varios aspectos están lejos de ser completamente aclarados y siguen siendo objeto de debate. En particular, se necesita una mayor aclaración de la cascada de eventos subyacentes a la ocurrencia de la EPI, vinculando todas las etapas etiológicas y patogénicas, a partir de factores de riesgo establecidos (como fumar) y dando como resultado la manifestación pulmonar definitiva (fibrosis pulmonar). La comprensión de estos pases de cultivo es obligatoria para mejorar el enfoque terapéutico de AR-EPI y para minimizar el riesgo de desarrollo de EPI en pacientes potencialmente predispuestos.

Está claro que se necesitan urgentemente tratamientos mejores y más eficaces para la FPI.

Sumario de la invención

- 45 Se aportan pruebas en la presente memoria de que los síntomas de FPI se pueden prevenir, mejorar o abolir cuando un anticuerpo dirigido contra un epítipo citrulinado en un péptido derivado del extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada se administra a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. El mismo efecto se puede conseguir mediante la inmunización con un péptido N-terminal derivado de la histona H2A o H4 deiminada que comprende un residuo de citrulina.

Descripción detallada de la invención

- 50 En los experimentos que conducen a la presente invención, se empleó un modelo aceptado de ratón para la FPI. En ese modelo, se indujo fibrosis en los pulmones de ratones C57BL/6 por la instilación orofaríngea de bleomicina como se detalla en el ejemplo 1. Los animales de control recibieron una instilación orofaríngea de PBS.

Los anticuerpos específicamente reactivos con un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada se administraron a los animales tratados con bleomicina y mostraron ser eficaces en el tratamiento de

los síntomas de la FPI. Dichos anticuerpos son de aquí en adelante denominados anticuerpos anti-proteína citrulinados, abreviado como AAPC.

Los AAPC se pueden obtener de diferentes maneras, conocidas per se para el experto. Por ejemplo, los AAPC se pueden generar mediante la inmunización de un animal experimental con un antígeno apropiado, tal como un péptido que comprende un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada. Los ejemplos representativos de tales péptidos pueden comprender las siguientes secuencias de aminoácidos: SGCitGKQGKGKARA (SEQ ID NO: 1) y SGCitGKGGKGLGKGGA KRHRKVLR (SEQ ID NO: 2), Tabla 1.

Los anticuerpos así obtenidos pueden ser sometidos a ensayos por su especificidad de unión al epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4. Esto puede realizarse ventajosamente comparando la unión del anticuerpo a un péptido según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 con la unión a un péptido de control que no lleva el epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4. Los ejemplos representativos de un péptido que no contiene el epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 son por ejemplo los péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos SGRGKQGKGKARA (SEQ ID NO: 3) y SGRGKGGKGLGKGGA KRHRKVLR (SEQ ID NO: 4), Tabla 1.

Tabla 1: Péptidos

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 1	S G C i t G K Q G G K A R A
SEQ ID NO: 2	S G C i t G K G G K G L G K G G A K R H R K V L R
SEQ ID NO: 3	S G R G K Q G G K A R A
SEQ ID NO: 4	S G R G K G G K G L G K G G A K R H R K V L R

La unión de un anticuerpo a un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada se considera que es específica si el anticuerpo se une a un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada mientras se une con menos afinidad al péptido de control que no comprende el epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4. Menos afinidad en este contexto significa una unión de al menos 50 % menos, tal como 75 %, 90 %, 95 % o más de 95 % menos. Más preferentemente, la unión del anticuerpo al epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada es fácilmente detectable mientras que la unión del anticuerpo a un péptido con la misma secuencia de aminoácidos en la que el residuo de citrulina se reemplaza con un residuo de arginina no es detectable.

Se halló que todos los anticuerpos específicamente reactivos desvelados en la presente memoria (RhAb2.102, RhAb2.108, RhAb2.109, RhAb2.110, RhAb2.111 RhAb2.112, MQ22.101, MQ22.102 y MQ22.101 b/d) reaccionaban con péptidos según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en la que eran negativos para la unión a péptidos con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Estos anticuerpos también se han desvelado previamente en el documento WO2011/070172 y en el documento WO2009/147201.

Se eligió un anticuerpo monoclonal de ratón Rmmab22.101 (abreviado en la presente memoria como MQ22.101) como un anticuerpo modelo, que representa la clase de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4deiminada.

La actividad terapéutica del anticuerpo MQ22.101 se estableció como sigue. Los ratones tratados con bleomicina recibieron inyecciones intraperitoneales que contenían 1 mg de anticuerpo monoclonal MQ22.101 o 1 mg de un anticuerpo de control MQ20.101 de isotipo coincidente obtenido en ModiQuest Research B.V. (Cat. n.º MQ20.101).

Los anticuerpos monoclonales se administraron a los animales en los días 0, 2 y 5. El peso de todos los animales se evaluó cada día a partir del día 0 hasta el día 14. La pérdida de peso de los animales se tomó como una medida de la gravedad de la enfermedad.

Se observó que los ratones tratados con bleomicina + MQ20.101 perdieron peso gradualmente con el tiempo con un 32 % de pérdida de peso en el día 14 en comparación con animales de control tratados con PBS que no perdieron peso (figura 1). En el grupo tratado con MQ22.101, se descubrió que los animales fueron protegidos contra la pérdida masiva de peso con un máximo de 17 % en el día 6, después de lo cual, los animales ganaron peso gradualmente con el tiempo (10 % de pérdida de peso en el día 14 en comparación con el día 0).

Dos o 3 semanas después de la instilación de bleomicina o PBS, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia con isoflurano, y se recogieron los pulmones y los fluidos de lavado broncoalveolar (LBA). Los pulmones se fijaron, se embebieron en parafina, y las secciones se tiñeron con Masson con el fin de evaluar la cantidad de inflamación/fibrosis (Figura 2).

Se observó que los ratones tratados con bleomicina + MQ20.101 tenían grandes cantidades de tejido fibrótico presente en los pulmones en comparación con los pulmones de los ratones de control (tratados con PBS) que no

tuvieron ningún signo de fibrosis. MQ22.101 fue capaz de proteger a los ratones tratados con bleomicina de las respuestas inflamatorias en el pulmón y, por ende, de la formación de fibrosis (Figura 2).

La proteína total en el LBA es una medida de la lesión pulmonar. El fluido de LBA de los ratones tratados con bleomicina + MQ20.101 contenía respectivamente 4 y 2 veces más proteínas en comparación con los ratones tratados con solución salina y tratados con MQ22.101 (Figura 3A). Además, se midieron los recuentos celulares totales y diferenciales (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el fluido de LBA. La cantidad total de células se incrementó notablemente en ratones tratados con bleomicina + MQ20.101 si se compara con los ratones tratados con solución salina y tratados con MQ22.101 (figura 3B). Al mirar los recuentos celulares diferenciales (Figura 3C-E), la diferencia más llamativa se encontró en los neutrófilos; LBA de ratones tratados con bleomicina + MQ20.101 contenía un 20 % de neutrófilos, mientras que el porcentaje de neutrófilos en el LBA de ratones tratados con solución salina y tratados con MQ22.101 estaba cerca de 0 % (Figura 3C).

El experimento descrito anteriormente se repitió con una versión humanizada de MQ22.101, con algunas modificaciones menores como se describe en el ejemplo 2. La realización de la versión humanizada del MQ22.101, MQ22.101 b/d, se describe en el ejemplo 7. Los fragmentos variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de MQ22.101 se clonaron en una cadena principal de IgG1 kappa humano. Los dominios de VH y VL se humanizaron posteriormente por injerto de CDR. La Tabla 2 muestra los polipéptidos de CDR1, -2 y -3 de VH (SEQ ID NO: 5, 6 y 7) y polipéptidos de CDR1, -2 y -3 de VL (SEQ ID NO: 8, 9 y 10) según IMGT (<http://www.imgt.org/>).

En el experimento descrito en el ejemplo 2, el análisis histopatológico de la inflamación y fibrosis en el pulmón se evaluó mediante la puntuación Madtes (Madtes DK y col., A J Respir Cell Mol Biol 20, 924-934, 1999). Solo los anticuerpos MQ22.101 y su homólogo humanizado MQ22.101 b/d disminuyeron la inflamación y la fibrosis en el pulmón en comparación con los anticuerpos de control MQ20.101 y MQR2.101 (Figura 4). MQR2.101 obtenido en ModiQuest Research B.V. (Cat. n.º MQ20.101), es el anticuerpo de control de isotipo coincidente para MQ22.101 b/d.

Tabla 2: secuencias de CDR de VH y VL derivada de MQ22.101 b/d *

SEQ ID NO:	VH o VL	CDR	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 5	VH	CDR1	GYTFTNY
SEQ ID NO: 6	VH	CDR2	INTYSGEA
SEQ ID NO: 7	VH	CDR3	LRGYTYQSFDEGGDY
SEQ ID NO: 8	VL	CDR1	QSLDSDGKTY
SEQ ID NO: 9	VL	CDR2	LVS
SEQ ID NO: 10	VL	CDR3	WQGTHFPYT
*Anotación de CDR según la base de datos IMGT.			

Se concluyó que los AAPC y, en particular MQ22.101 y su homólogo humanizado MQ22.101 b/d proteger a los ratones de la inflamación y la fibrosis en el pulmón.

Dado que el sistema de modelo elegido aquí es representativo para la versión humana de la FPI, se concluye que un anticuerpo específicamente reactivo con un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada puede utilizarse en la prevención o el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática.

A partir del uso en la vacunación terapéutica pasiva (administración de anticuerpos) como se ha descrito anteriormente, la invención también puede ponerse en práctica mediante la inducción de una respuesta inmunitaria *in vivo* en un sujeto en necesidad del mismo. Para ese fin, se emplearon péptidos que comprenden un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada. Tales péptidos se administraron por vía subcutánea (vacunación terapéutica activa) en un ratón y provocaron los mismos títulos de AAPC específicos en ratones al igual que los títulos que se encontraron en los ratones que fueron inmunizados pasivamente. Tales ratones ya no fueron receptivos a la instilación con bleomicina y mostraron la misma falta de síntomas que sus homólogos inmunizados pasivamente.

La expresión "reacciona específicamente con citrulina" o "reactivo con un epítipo citrulinado" o "específicamente reactivo con un epítipo citrulinado" en este contexto se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reacciona con una estructura tal como un péptido que contiene un residuo de citrulina mientras que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo reacciona menos o, preferentemente, no reacciona en absoluto con la misma estructura que contiene un residuo de arginina en lugar del residuo de citrulina. El término péptido se debe interpretar como una estructura que es capaz de presentar el residuo de citrulina en el contexto correcto para la inmunorreactividad con los anticuerpos tal como se describe en la presente memoria, preferentemente en el mismo contexto que aparece en el cuerpo humano o animal, preferentemente en el contexto de un polipéptido nativo. Los anticuerpos nativos (también conocidos como inmunoglobulinas) son proteínas gamma globulina que se pueden encontrar en la

sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, y son utilizados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar objetos extraños, tales como bacterias y virus.

Los anticuerpos nativos están normalmente 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 glóbulo blanco denominado célula B. Existen varios tipos diferentes de cadenas pesadas, dando lugar a diferentes tipos de anticuerpos. Los anticuerpos se pueden agrupar en diferentes isotipos en base a la cadena pesada que poseen. En mamíferos se conocen cinco isotipos de anticuerpos diferentes, que realizan diferentes funciones, y ayudan a dirigir la respuesta inmunitaria adecuada para cada tipo diferente de objeto extraño que encuentran. Algunas especies animales tales como 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 inmunitario reconozca una igualmente amplia diversidad de antígenos.

La única parte del antígeno reconocido por un anticuerpo se denomina epítipo. Estos epítipos se unen con su anticuerpo en una interacción altamente específica que permite a los anticuerpos identificar y unirse solamente a su antígeno único en medio de los millones de moléculas diferentes que componen un organismo. El reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo lo etiqueta para el ataque por otras partes del sistema inmunitario. 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 cambio de clase que cambia la base de la cadena pesada a otra, creando un isotipo diferente del anticuerpo que conserva la región variable específica del antígeno. Esto permite que un único anticuerpo sea utilizado en varios isotipos diferentes por varias partes diferentes del sistema inmunológico.

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

Un anticuerpo puede ser seleccionado entre el grupo que consiste en anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), regiones de fragmento de unión al antígeno (Fabs), anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión que comprenden el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo nativo o un aptámero, anticuerpos de dominios sencillos (sdAbs), también conocidos como anticuerpos VHH, nanocuerpos (anticuerpos de dominio sencillo derivados de camélidos), fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo derivados de IgNAR de tiburón denominados VNAR, o fragmentos o una parte de los mismos.

En otra realización preferida, un anticuerpo es una proteína de fusión que comprende el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo nativo.

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

Los anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos son una realización preferida de la invención. Preferentemente, se pueden utilizar ventajosamente anticuerpos IgG1 que tienen una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera lambda o kappa. Sin embargo, otros isotipos de anticuerpos humanos también quedan abarcados por la invención, incluyendo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE en combinación con una cadena ligera kappa o lambda. También pueden utilizarse en la invención todos los anticuerpos derivados de animales de varios 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.

La expresión "anticuerpos reactivos con un epítipo citrulinado" debe interpretarse como un anticuerpo que reacciona específicamente con un residuo de citrulina en el contexto de una estructura más grande tal como un péptido o un ácido nucleico peptídico o una estructura que imita a un péptido.

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

La citrulinación es la conversión post-traduccion de residuos de arginina en residuos de citrulina, que es catalizada por peptidilarginina deiminasa (PAD). Enzimas peptidilarginina deiminasa (PAD; EC 3.5.3.15) catalizan la conversión de residuos de arginina en residuos de citrulina en las proteínas. No existe ARNt para la citrulina, la presencia de residuos de citrulina en proteínas es exclusivamente el resultado de la modificación post-traduccion. 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 y col., 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. La L-arginina libre puede ser convertida en L-citrulina libre por la óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) en eucariotas o por arginina deiminasa (CE 3.5.3.6) en bacterias. Estas enzimas no son 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, que 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 trichialina (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 citoplasmáticas de los ovocitos de ratón, que desempeñan un papel importante en la embriogénesis temprana. Se descubrió que la expresión de su ortólogo humano está restringida a ovario, testículos y leucocitos de sangre periférica (Chavanas y col., Gene 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 y col., Bioessays 25 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 amplio patrón de expresión, solo la proteína básica de la mielina (PBM) y vimentina se han identificado como sustratos naturales. En la esclerosis múltiple (EM) los pacientes desarrollan una respuesta autoinmune contra PBM. PBM 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 ha descrito anteriormente, la vimentina citrulinada ha demostrado ser la diana de los autoanticuerpos anti-Sa AR-específicos. En contraposición a los PADs discutidos 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) se localiza 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 de histona (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.

Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales como se desvela la presente memoria también pueden utilizarse ventajosamente en la presente invención. Tales anticuerpos que compiten pueden seleccionarse mediante procedimientos convencionales. En resumen: puede desarrollarse un ensayo de unión tal como un ELISA, en el que un péptido que comprende un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada se inmoviliza sobre un soporte sólido. Los anticuerpos monoclonales como se describe en la presente memoria pueden marcarse y su interferencia con su unión a los antígenos inmovilizados puede ser determinada fácilmente por medio de un análisis rutinario. Estos y otros procedimientos más sofisticados son conocidos por los expertos y se pueden realizar de forma rutinaria en un entorno de laboratorio ordinario.

En particular, los ensayos se pueden desarrollar fácilmente utilizando cualquiera de los péptidos antigénicos según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 inmovilizados sobre un soporte sólido. Anticuerpos monoclonales seleccionados entre el grupo que consiste en RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111, RhmAb2.112, MQ22.101, MQ22.102 y MQ22.101b/d se pueden marcar y poner en contacto con el antígeno inmovilizado en presencia y ausencia de un anticuerpo de ensayo. Si el anticuerpo de ensayo interfiere con la unión, es decir, reduce la señal obtenida con cualquiera de los anticuerpos marcados, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo compite con la unión del anticuerpo marcado. Tal anticuerpo competidor sería entonces adecuado para su uso en los procedimientos de la invención, siempre que no reaccione con un péptido con la misma secuencia en la que el residuo de citrulina se reemplaza con un residuo de arginina.

Los anticuerpos para su uso según la invención pueden ser generados esencialmente de dos maneras. En primer lugar, se pueden derivar de los anticuerpos y sus secuencias tal como se presenta en la presente memoria. La reactividad de los anticuerpos puede incluso ser mejorada por mutagénesis dirigida al sitio, intercambio de cadenas, PCR sexual o por otros medios para la derivación y optimización de anticuerpos conocida por el experto en la materia. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser obtenidos mediante cribado con cualquiera de los epítipos específicamente reactivos como se describe en la presente memoria, en particular histona 2A deiminada, un péptido que comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y otros péptidos particularmente reactivos.

Un experto en la materia puede utilizar las secuencias descritas en la presente memoria para clonar o generar ADNc o secuencias genómicas, por ejemplo tal como se describe en los siguientes ejemplos. La clonación de estas secuencias en un vector de expresión eucariota apropiado tal como pcDNA3 (Invitrogen), o derivados del mismo, y la

subsiguiente transfección de células de mamíferos (tales como células CHO) con combinaciones de los vectores que contienen una cadena ligera y una cadena pesada apropiados dará lugar a la expresión y secreción de los anticuerpos requeridos.

5 El anticuerpo monoclonal de ratón MQ22.101 puede expresarse directamente y secretarse por sus respectivas estirpes celulares de hibridoma tal como están depositadas. (DSMZ número ACC 3031).

El experto también puede hacer análogos de las moléculas de unión específica como se describe en la presente memoria mediante el uso de 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.

10 En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para significar que los artículos que siguen a la palabra quedan incluidos, pero no están excluidos artículos 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 solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", significa, por lo tanto, generalmente "al menos uno".

15 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se supone que MQ22.101 y sus histonas deimidadas diana homólogas humanas en trampas extracelulares de neutrófilos (TENs) son por lo tanto capaces de bloquear el proceso inflamatorio mediante la inhibición de la activación y por lo tanto el influxo de neutrófilos inflamatorios. Ha sido demostrado por Chrysanthopoulou y col. (J Pathol 233, 294-307, 2014) que las TENs no solo participan en la inflamación, sino también en la fibrosis posterior a través de su efecto sobre la diferenciación de fibroblastos, convirtiéndose por lo tanto en una diana atractiva para la terapia de anticuerpos según la presente invención. La
20 terapia de anticuerpos según la presente invención no tiene efectos adversos graves ya que no interfiere en el sistema inmunitario u otras vías familiares generales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelo animal experimental para la fibrosis.

25 Ratones C57BL/6 hembra (6-8 semanas de edad) fueron adquiridos en The Jackson Laboratory. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Se indujo una lesión de pulmón en el día 0, cuando los ratones tenían 8-10 semanas de edad (con un peso de 19-21 g), por instilación orofaríngea de bleomicina (0,045 unidades/ratón). Los animales de control recibieron una instilación intratraqueal de PBS. En los días 0, 2 y 5, los grupos tratados con bleomicina recibieron una inyección intraperitoneal
30 que contenía 1 mg de anticuerpo de control MQ22.101 o 1 mg de MQ20.101 (anticuerpo de control de isotipo coincidente irrelevante). El peso de todos los animales se evaluó cada día a partir del día 0 hasta el día 14 (Figura 1).

Dos y 3 semanas después de la instilación de bleomicina o PBS, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia con isoflurano, y se recogieron los pulmones y los fluidos de lavado broncoalveolar (LBA). Los
35 pulmones se fijaron, se embebieron en parafina, y las secciones se tiñeron con Masson con el fin de evaluar la cantidad de inflamación/fibrosis (Figura 2). El contenido de proteínas, así como los recuentos celulares totales y diferenciales (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) se han medido en LBA. Se ha medido el contenido de proteínas y los recuentos celulares totales y diferenciales se han evaluado mediante la realización de cytospin con el fluido de LBA, tinción de las células, y conteo e identificación de los diferentes tipos de células en función de su morfología
40 (Figura 3).

Ejemplo 2: Experimentos de confirmación.

Los resultados obtenidos en el ejemplo 1 fueron confirmados en un experimento distinto e independiente con una configuración experimental ligeramente alterada.

45 Ratones C57BL/6N macho (19-21 gramos a la llegada) fueron adquiridos en Charles River. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Se indujo una lesión de pulmón en el día 0, cuando los ratones tenían 8-10 semanas de edad (con un peso de 19-21 g), por estudio intranasal de provocación con bleomicina. Se disolvió sulfato de bleomicina en una solución de NaCl al 0,9 % (10 mg/25 ml) con el fin de alcanzar la concentración de 0,4 mg/ml de bleomicina, y luego se dividió en alícuotas de 1 ml, almacenadas a -20 °C. La dosis de la solución de bleomicina para el estudio de provocación es 50 µl/ratón. Los
50 animales de control recibieron una exposición intranasal a PBS. La pirfenidona se ha utilizado como tratamiento establecido para la fibrosis pulmonar en el modelo animal de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Cada mañana, se preparó pirfenidona para la dosificación diaria mediante la resolución de la cantidad adecuada de pirfenidona en una sal de carboximetilcelulosa sódica al 0,5 %. El volumen de administración es de 10 ml/kg de peso corporal. La pirfenidona se administró por vía oral dos veces al día, con un intervalo de 7,5 h entre dos
55 administraciones. En el fin de semana, los ratones recibieron la dosis total diaria por la mañana.

Tratamiento: En los días 0, 2 y 5, los grupos tratados con bleomicina recibieron una inyección intraperitoneal que

5 contenía 1 mg de anticuerpo de ratón MQ22.101, 1 mg de anticuerpo de ratón "MQ20.101" (anticuerpo de control de isotipo coincidente irrelevante) o PBS. Dos grupos adicionales tratados con bleomicina recibieron 1 mg de MQ22.101 humanizado ("MQ22.101b/d) o 1 mg "MQR2.101" humano (anticuerpo de control humano) en los días 2 y 5. MQR2.101 es un anticuerpo de control. La pirfenidona se dosificó diariamente desde el día 0 al día 13. Dos semanas después de la instilación con bleomicina o PBS, los ratones se eutanasiaron con una sobredosis de clorhidrato de ketamina (Narketan) y clorhidrato de xilacina (Rompun). Los pulmones se fijaron con formalina al 10 % tamponada para el análisis histopatológico (puntuación de Madtes: Tablas 3 y 4).

10 Para la evaluación histopatológica, los pulmones enteros fueron embebidos en parafina y teñidos según Mallory. Los cambios histológicos pulmonares se evaluaron utilizando metodología de puntuación de Madtes (Madtes DK y col. Am J Respir Cell Mol Biol. 20: 924-934, 1999). El sistema de puntuación de Madtes tiene en cuenta parámetros fibróticos e inflamatorios (Tablas 3 y 4; Figura 4). Diez campos de baja potencia (CBP, es decir. 50x aumentos) se examinaron para la inflamación según el esquema de puntuación de inflamación (véase la tabla 3), y para la fibrosis según el esquema de puntuación de fibrosis (véase la tabla 4). Campos de identificación sistemática cubrieron el lóbulo pulmonar izquierdo y derecho: pulmón derecho (4xCBP) y pulmón izquierdo (lóbulo craneal 2xCBP, lóbulo caudal 2xCBP, lóbulo medio 1 xCBP y lóbulo accesorio 1 xCBP). Para cada animal se calculó una puntuación final como la mediana de diez CBP.

Tabla 3: puntuación de inflamación

Inflamación	Puntuación
Pulmón normal (sin inflamación)	0
Poca inflamación <50 % de la zona total pulmonar	1
Poca inflamación >50 % de la zona total pulmonar	2
Inflamación moderada <50 % de la zona total pulmonar	3
Inflamación moderada >50 % de la zona total pulmonar	4
Inflamación prominente <50 % de la zona total pulmonar	5
Inflamación prominente >50 % de la zona total pulmonar	6

Tabla 4: Esquema de puntuación de fibrosis.

Fibrosis	Puntuación
Pulmón normal (sin fibrosis)	0
Fibrillas conectivas finas en <50 % de la zona afectada por la inflamación	1
Fibrillas conectivas finas en >50 % de la zona afectada por la inflamación	2
Fibrillas conectivas finas en 100 % de la zona afectada por la inflamación junto con haces gruesos en <50 % de la zona de inflamación	3
Fibrillas conectivas finas en 100 % de la zona afectada por la inflamación junto con haces gruesos en >50 % de la zona de inflamación	4

Puntuación total de Madtes = puntuación de inflamación + fibrosis

Ejemplo 3: Generación de AAPCs

25 Los anticuerpos contra un péptido que comprende un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de la histona H2A o H4 deiminada fueron cultivados por la inmunización de ratones con un péptido según SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO 2 en ratones DBA/J1 como se ha descrito previamente en el documento WO 2011/070172.

30 En resumen: en el día 125 después del comienzo del proceso de inmunización, se tomaron muestras de suero y se analizaron para una respuesta de antígeno específica para citrulina. Esto se hizo mediante la comparación de las señales obtenidas en un ELISA con un péptido según SEQ ID NO: 1 como antígeno en comparación con un ELISA con un péptido según SEQ ID NO: 3 como antígeno. Todos los ratones mostraron un título de suero específico para antígeno específico en los puntos temporales analizados.

Con el fin de producir estirpes celulares de hibridomas, los bazo se diseccionaron después del último refuerzo, se recogieron los esplenocitos del bazo y se fusionaron con una estirpe celular de mieloma de ratón (NS-1) según procedimientos convencionales. La especificidad del anticuerpo en los sobrenadantes de hibridoma identificó sistemáticamente en antígeno que contenía citrulina, así como en el equivalente no citrulinado.

35 Esto dio lugar a un clon de hibridoma que produce MQ22.101 DSMZ n.º de acceso ACC 3031). Posterior secuenciación de las cadenas pesadas y ligeras según SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente.

Ejemplo 4: Mapeo de epítomos de AAPCs.

Placas de 96 pocillos de ELISA 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 + 1 % de albúmina de suero bovino (ASB) a temperatura ambiente (TA). Después de 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con péptidos que contienen histona H2A derivada de citrulina y biotina (0,3 µg/pocillo) según SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Todos los péptidos utilizados contenida un grupo NH₂ del extremo N-terminal libre. Después de otros 5 lavados más con PBS-T, los pocillos se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones en serie de MQ22.101 o MQ22.101 b/d en PBS-T + 1 % de ASB a partir de una concentración de 10 µg/pocillo. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con conejo-anti-humano-HRP (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 5 minutos con sustrato TMB antes de detener la reacción con H₂SO₄ 2 M. La densidad óptica se midió en 450 nm y es una medida de la afinidad de los anticuerpos utilizados.

MQ22.101 y MQ22.101b/d unidos al péptido citrulinado del extremo N-terminal de la histona H2A (SEQ ID NO: 1), pero no al péptido que contiene arginina (SEQ ID NO: 3). La unión de MQ22.101 y MQ22.101 b al péptido citrulinado del extremo N-terminal de la histona H4 (SEQ ID NO: 2) mostró resultados similares.

Ejemplo 5: La vacunación con péptidos que contienen citrulina genera una respuesta inmunitaria protectora *in vivo*.

Una respuesta inmunitaria se obtuvo en ratones C57BL/6N (19-21 gramos a la llegada) contra péptidos de histona sintéticos que contienen residuos de citrulina de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO: 2 (tabla 1). Entre el día 57 y 80 después del inicio del proceso de inmunización, las muestras de suero se tomaron y se analizaron para una respuesta al antígeno específico para un péptido que contiene citrulina. Los ratones que muestran un título del suero antigénico específico reactivo con péptidos que contienen citrulina según la SEQ ID NO 1 y/o SEQ ID NO: 2, pero no con péptidos que contienen arginina según la SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO: 4, se utilizaron para inducir una lesión pulmonar por instilación orofaríngea de bleomicina como se explica en los ejemplos 1. El peso de todos los animales se evaluó cada día a partir del día 0 hasta el día 21.

Dos y 3 semanas después de la instilación con bleomicina o PBS, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia con isoflurano, y se recogieron los pulmones y los fluidos de lavado broncoalveolar (LBA). Los pulmones se fijaron, se embebieron en parafina, y las secciones se tiñeron con Masson con el fin de evaluar la cantidad de inflamación/fibrosis. El contenido de proteínas, así como los recuentos celulares totales y diferenciales (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) se midieron en LBA. El contenido de proteínas se midió y los recuentos celulares totales y diferenciales se evaluaron mediante la realización de cytopspin con el fluido de LBA, tinción de las células, y recuento e identificación de los diferentes tipos de células en función de su morfología.

Los resultados sobre los parámetros clínicos de estos ratones eran comparables, si no idénticos con los ratones que fueron inmunizados pasivamente con el anticuerpo AAPC MQ22.101.

Ejemplo 6: Ensayo de detección para AAPCs

Un ensayo que distingue entre anticuerpos con propiedades terapéuticas puede desarrollarse fácilmente utilizando proteínas antigénicas según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 inmovilizadas sobre un soporte sólido. Por ejemplo, MQ22.101 (o cualquier otro AAPC con propiedades terapéuticas) puede marcarse y poner en contacto con el antígeno inmovilizado en presencia y ausencia de un anticuerpo de ensayo. Si el anticuerpo de ensayo interfiere con la unión, es decir, reduce la señal obtenida con el MQ22.101 marcado, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo compite con la unión de MQ22.101 marcado. Tal anticuerpo competidor sería entonces adecuado para su uso en los procedimientos de la invención, siempre que no reaccione con un péptido con la misma secuencia en la que el residuo de citrulina se reemplaza con un residuo de arginina (SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO: 4).

Ejemplo 7: Preparación de MQ22.101b/d

Los fragmentos de la cadena pesada (VH) variable y la cadena ligera (VL) variable de hibridoma MQ22.101 se han obtenido mediante RT-PCR y se clonaron en vectores de expresión que contenían la IgG1 humana y dominios constantes kappa humanos. Los dominios de VH y VL se han humanizado posteriormente y pertenecen a la línea germinal por medio de un injerto de CDR. La Tabla 2 muestra polipéptidos de CDR1, -2 y -3 de VH (SEQ ID NO: 5, 6 y 7) y polipéptidos de CDR1, -2 y -3 de VL (SEQ ID NO: 8, 9 y 10) de MQ22.101b/d.

Leyenda de las figuras**FIGURA 1:**

Un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se utilizó para probar el efecto de MQ22.101 sobre la pérdida de peso. En el día 0, los ratones recibieron una instilación orofaríngea de PBS (diamantes) o de bleomicina (0,045 unidades/ratón) (triángulos y cuadrados). En el día 0, 2 y 5, los ratones habían sido tratados i.p. con 1 mg de MQ22.101 (triángulos), 1 mg de anticuerpo de control MQ20.101 (cuadrados) o PBS

(diamantes). Los animales han sido pesados cada día a partir del día 0 hasta el día 14.

FIGURA 2:

Un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina se utilizó para probar el efecto de MQ22.101 sobre la prevención de la inflamación/fibrosis pulmonar. Los ratones utilizados en los experimentos mostrados en la figura 2a y 2b recibieron una instilación orofaríngea de PBS en el día 0, mientras que los ratones utilizados en los experimentos mostrados en la figura 2c-f recibieron una instilación orofaríngea de bleomicina (0,045 unidades/ratón). En el día 0, 2 y 5, los ratones de la figura 2c-d han sido tratados i.p. con 1 mg de MQ22.101 y los ratones de la fig. 2e-f han sido tratados i.p. con 1 mg de anticuerpo de control MQ20.101. Los ratones se sacrificaron después de 14 (Figuras 2a, 2c y 2e) o 21 días (Figuras 2b, 2d y 2f), los pulmones se fijaron, se embebieron en parafina, y las secciones se tiñeron con Masson con el fin de evaluar la cantidad de inflamación/fibrosis.

FIGURA 3:

Se obtuvo fluido de LBA procedente de 2 ratones de cada grupo experimental con el fin de medir el contenido de proteínas (figura 3a) y de células (figura 3b-e). A fin de recoger el fluido de LBA, se insertó una cánula en la tráquea previamente preparada, después de lo cual los pulmones se lavaron con 3 volúmenes de PBS (volumen total 1 ml). El contenido de proteínas se midió y los recuentos celulares totales y diferenciales se evaluaron mediante la realización de cytopspin con fluido de LBA, tinción de las células, recuento e identificación de los diferentes tipos de células en función de su morfología.

FIGURA 4:

Un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se utilizó para probar el efecto de MQ22.101 y MQ22.101b/d en la inflamación y fibrosis en el pulmón. En el día 0, los ratones recibieron una instilación orofaríngea de bleomicina. En los días 0, 2 y 5, los grupos tratados con bleomicina recibieron una inyección intraperitoneal que contenía 1 mg de anticuerpo de ratón MQ22.101, 1 mg de anticuerpo de ratón MQ20.101 (anticuerpo de control de isotipo coincidente irrelevante) o PBS. Dos grupos adicionales tratados con bleomicina recibieron 1 mg de MQ22.101 humanizado (MQ22.101b/d) o 1 mg de anticuerpo humano MQR2.101 (anticuerpo de control humano) en los días 2 y 5. MQR2.101 es un anticuerpo de control. La pirfenidona se dosificó diariamente desde el día 0 al día 13. Dos semanas después de la instilación con bleomicina o PBS, los ratones fueron eutanasiados con una sobredosis de clorhidrato de ketamina (Narketan) y clorhidrato de xilacina (Rompun). Los pulmones se pesaron y se fijaron con formalina al 10 % tamponada para el análisis histopatológico, se realizó la puntuación de Madtes según las Tablas 3 y 4. Puntuación: 0-10. *p <0,05 frente a vehículo, ensayo de Mann-Whitney.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ModiQuest BV

<120> PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

<130> 287 WO

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221>Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es citrulina

<400> 1

Ser	Gly	Xaa	Gly	Lys	Gln	Gly	Gly	Lys	Ala	Arg	Ala
1				5					10		

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

ES 2 724 364 T3

<213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221>Xaa
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Xaa es citrulina
 <220>
 <221>Xaa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es citrulina
 10 <400> 2
 Ser Gly Xaa Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
 1 5 10 15
 Arg His Arg Lys Val Leu Arg
 20
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 23
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
 1 5 10 15
 Arg His Arg Lys Val Leu Arg
 20
 <210> 5
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 1 5
 30 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

ES 2 724 364 T3

	Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala	
	1 5	
5	<210> 7 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 7	
	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr	
	1 5 10 15	
10	<210> 8 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 8	
	Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr	
	1 5 10	
15	<210> 9 <211> 3 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 9	
	Leu Val Ser	
	1	
20	<210> 10 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 10	
	Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr	
	1 5	
25	<210> 11 <211> 367 <212> ADN <213> <i>mus musculus</i>	
30	<400> 11	
	cggatccagt tgggtgcagtc tggacctgaa ctgaagaagc ctggtgaggc agtcaagatc	60
	tcctgtaagg cttctggata taccttcaca aactatggta tgcactggat gaaacagact	120
	ccaggaaagg attttaggtg gatgggctgg ataaacacct acagtggaga ggcaacatat	180
	gttgatgact tcaagggacg cttcgccttc tctttgggaa cctctgccag cactgcctat	240
	ttgcagatca acaacctcaa gaatgacgac acggctacat atttctgttt aagaggctat	300
	acttaccaaa gtttcgacga agggggcgac tactgggggc agggcaccgc tctcacagtc	360
	tcctcag	367

ES 2 724 364 T3

<210> 12
 <211> 338
 <212> ADN
 <213> *mus musculus*

5

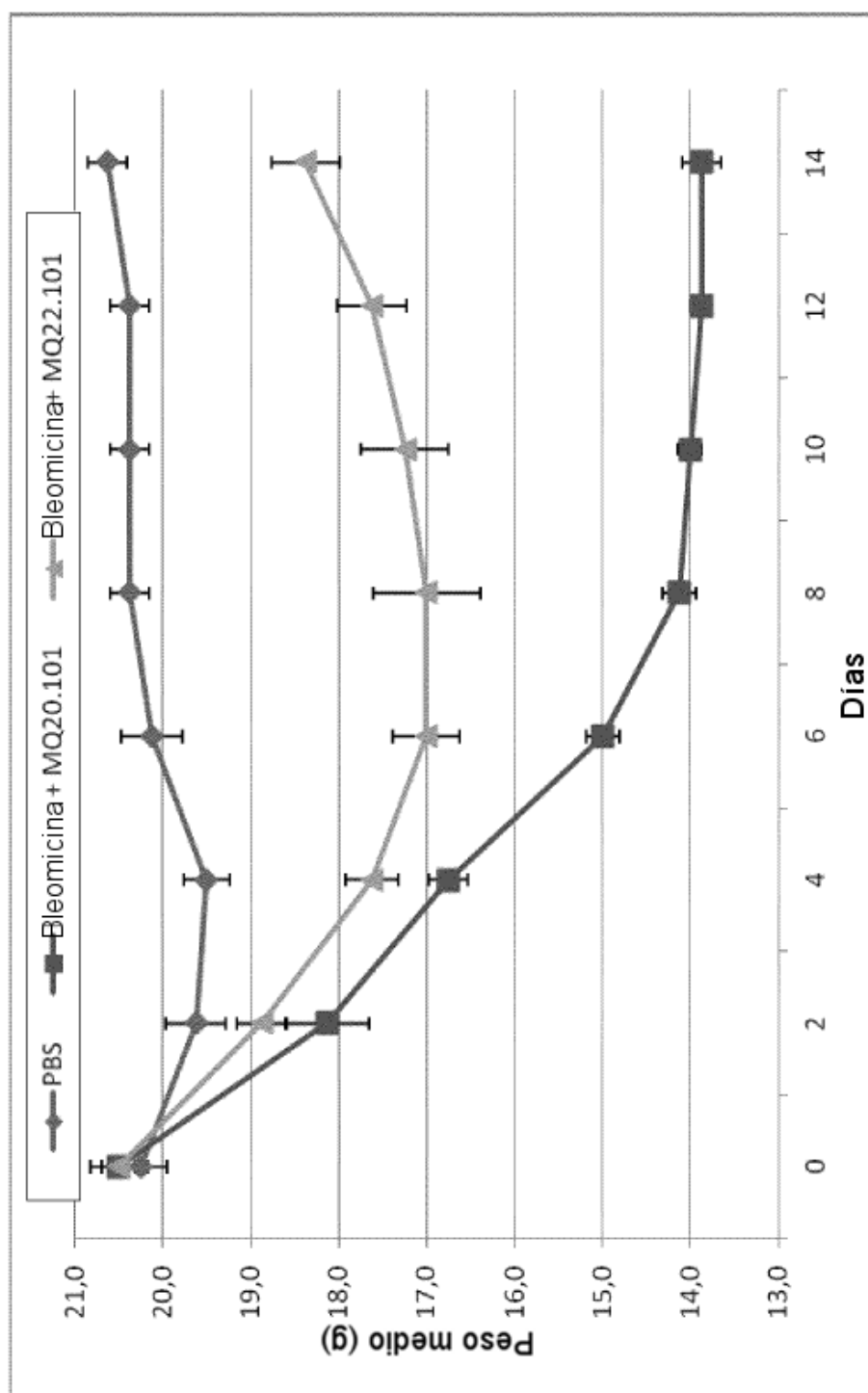
<400> 12

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta cactggaca accagcctcc	60
atctcttgca agtcaagtca gagcctcttg gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
ttgtttcaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatat atctggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg	300
tacacgttcg gaggggggac caatttgga ataaaacg	338

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo específicamente reactivo con un epítipo citrulinado en el extremo N-terminal de una histona H2A o H4 deiminada, para su uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, en el que el epítipo citrulinado reside en un péptido que comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
3. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 5, un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 6, un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 7, un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 8, un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 9, un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende el polipéptido según la SEQ ID NO: 10.
- 10 4. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una ligera contenidas en el anticuerpo monoclonal RmmAb 22.101 producido por una estirpe celular de hibridoma depositada ante el DSMZ con el número de depósito ACC 3031.
- 15 5. Anticuerpo para su uso según las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal RmmAb 22.101, producido por una estirpe celular de hibridoma depositada ante la DSMZ con el número de depósito ACC 3031, para la unión a un péptido según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
6. Composición que comprende un péptido que comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, comprendiendo dicho péptido el extremo N-terminal de una histona H2A o H4 deiminada, en el que el extremo N-terminal comprende un epítipo citrulinado para su uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática.
- 20

Figura 1



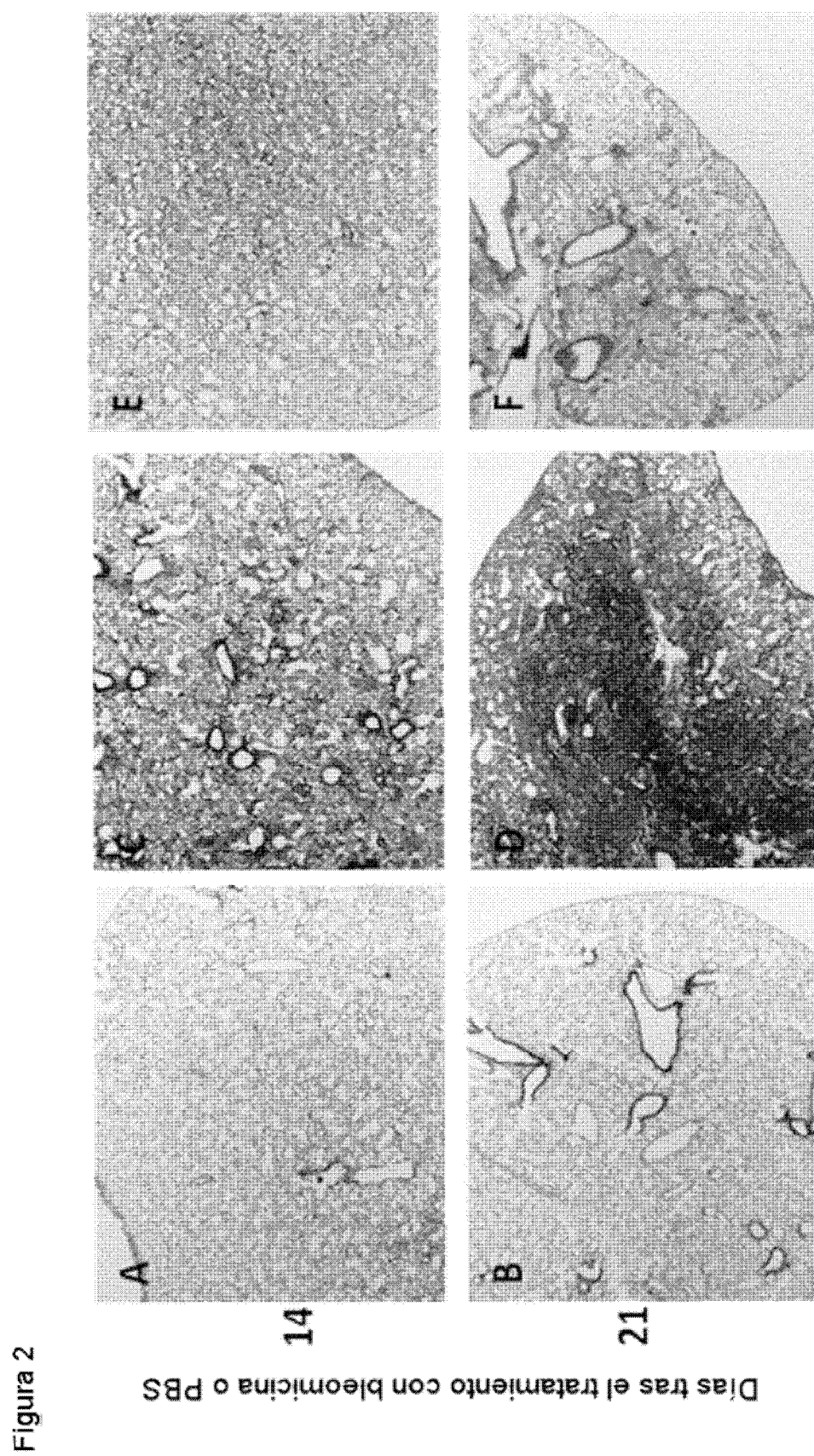


Figura 3A

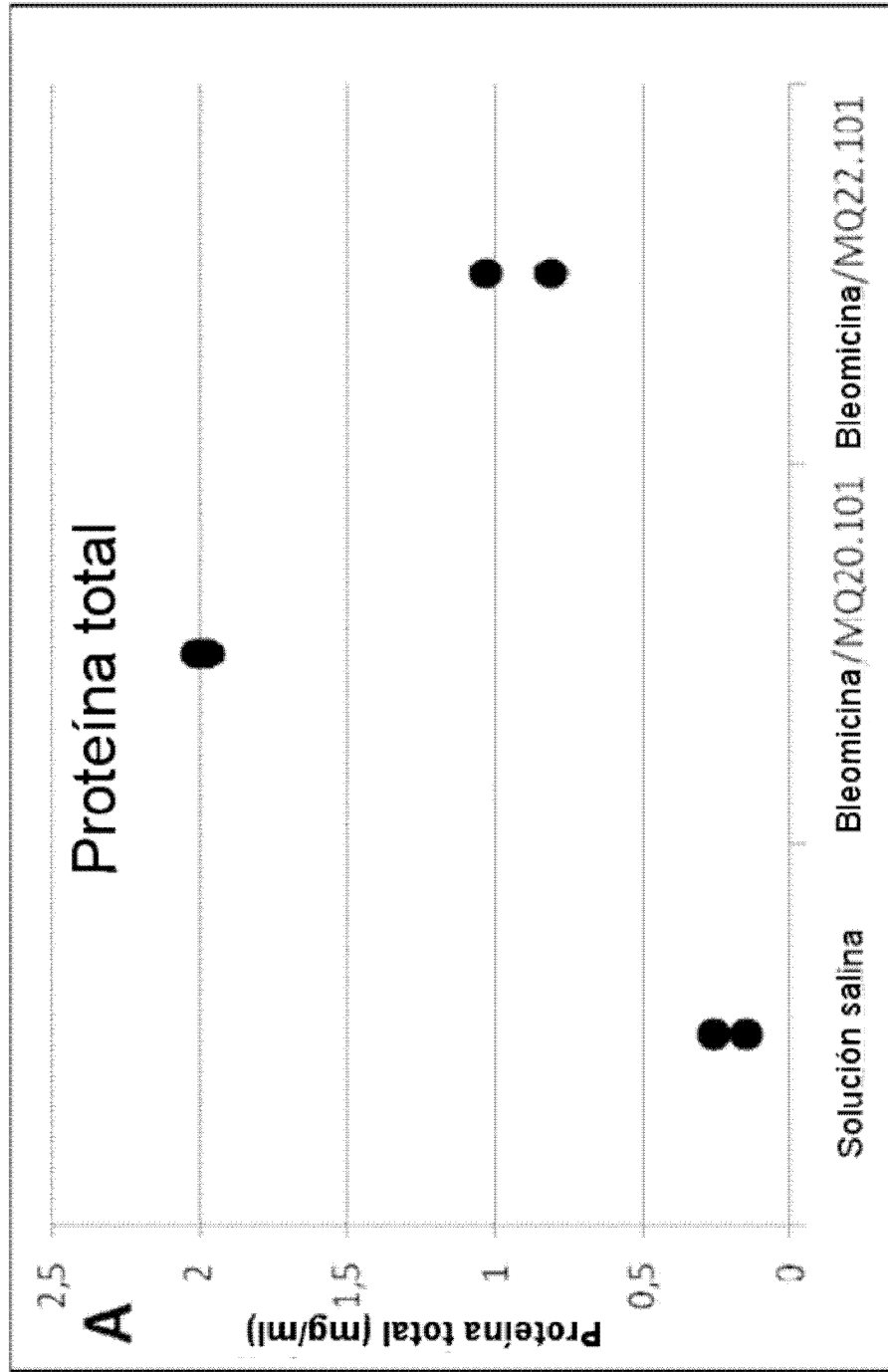


Figura 3B

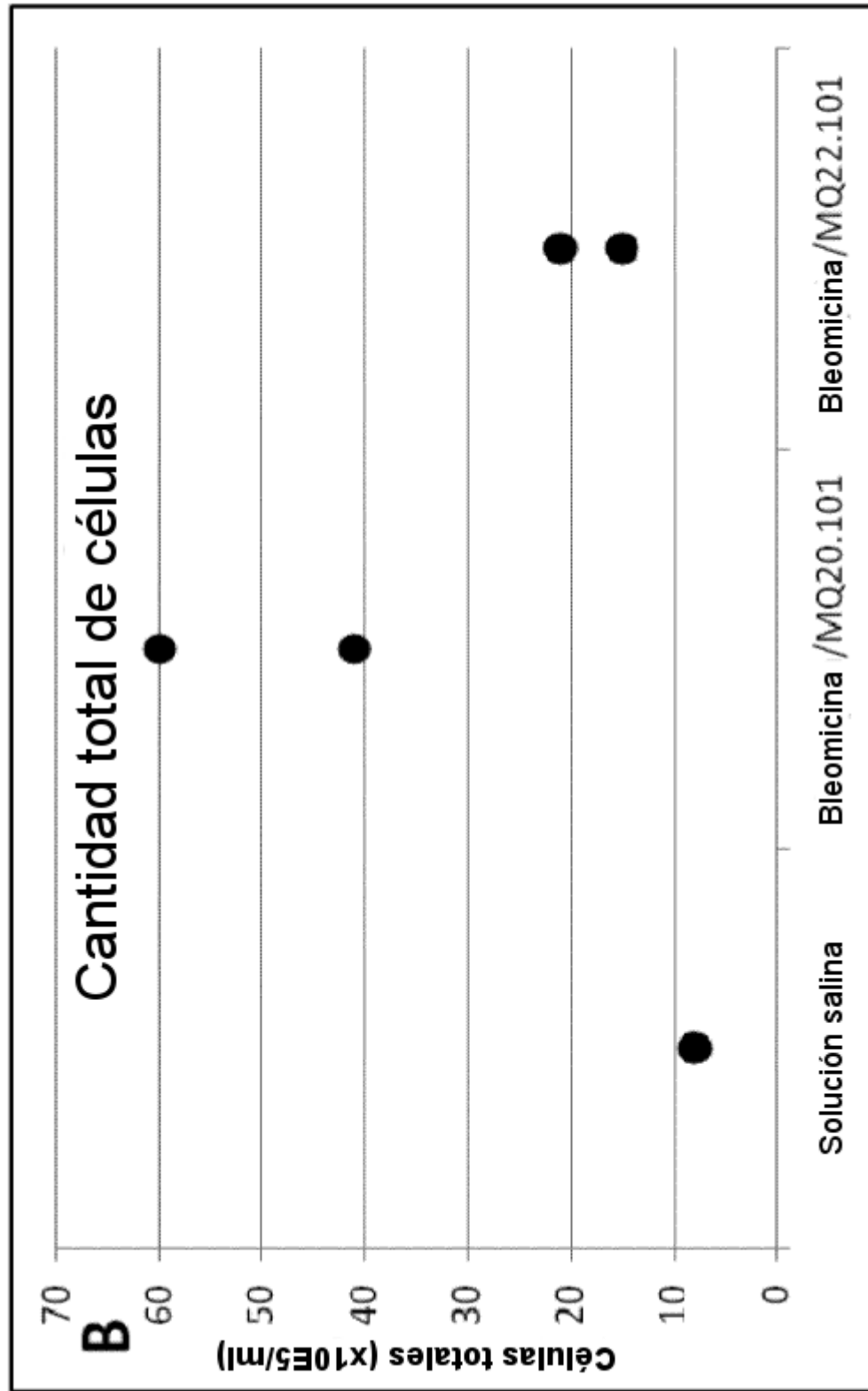


Figura 3C

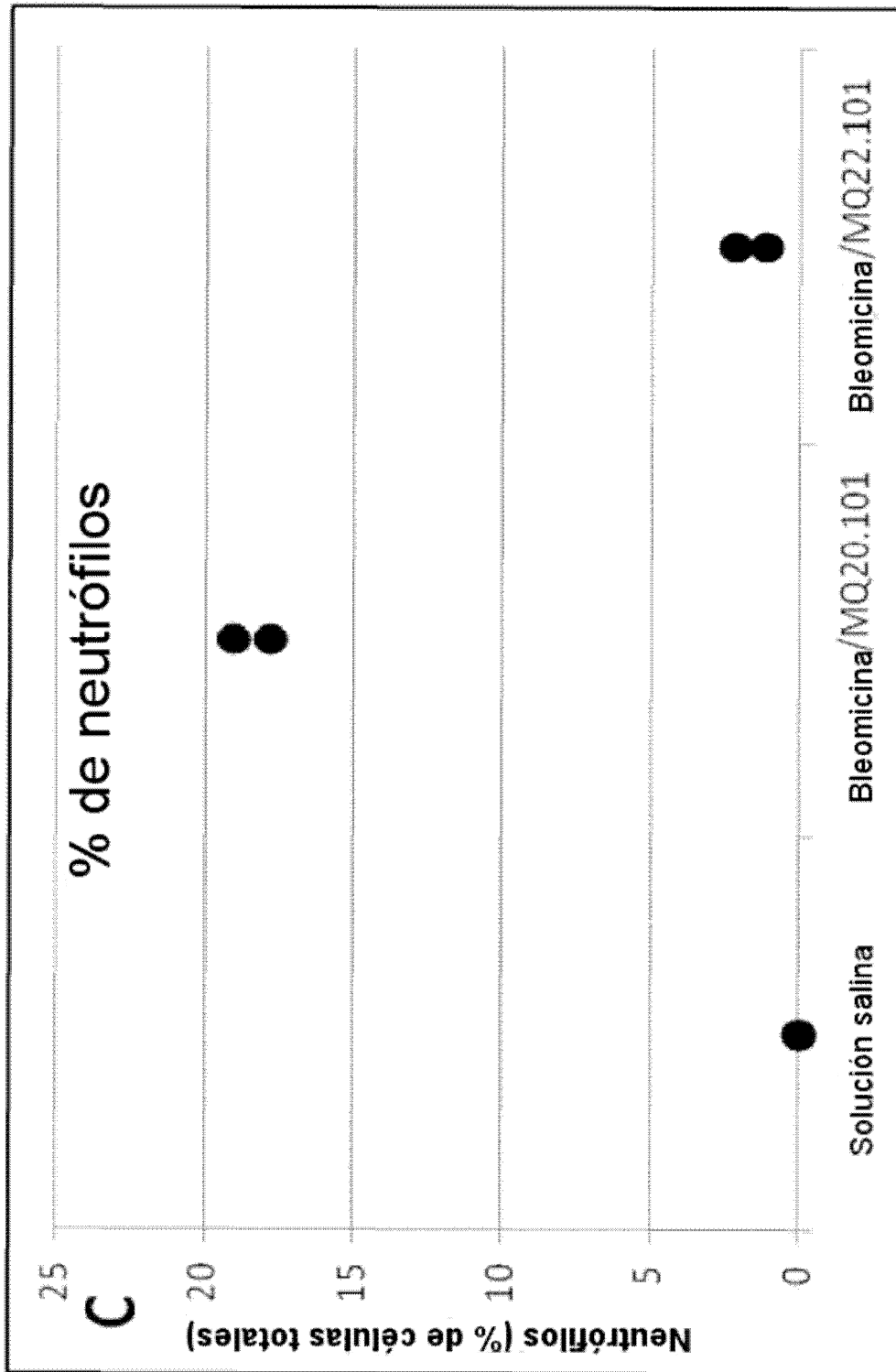


Figura 3D

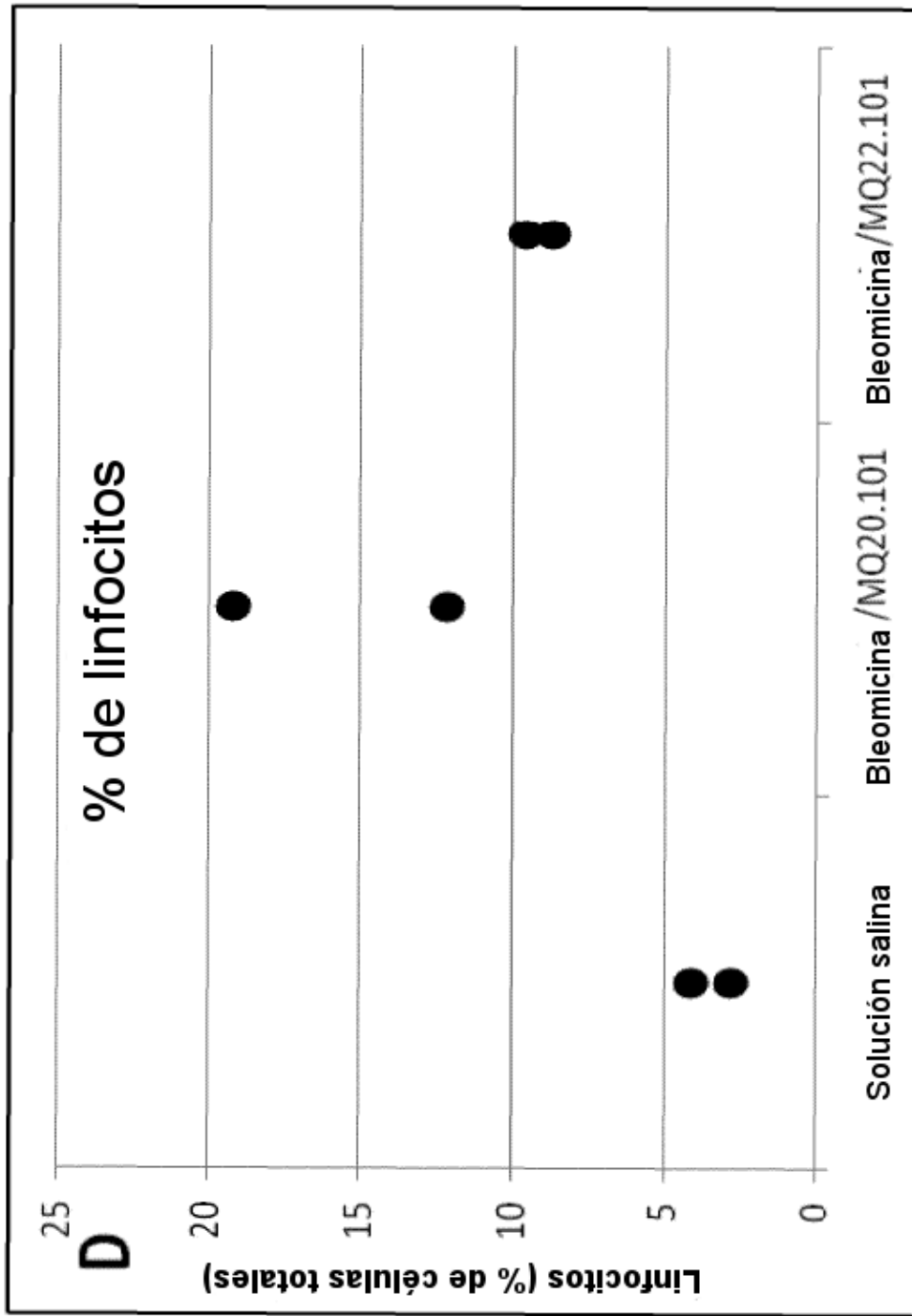


Figura 3E

