



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 853**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05815291 .9**

96 Fecha de presentación : **03.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1814901**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54

Título: **Péptidos citrulinados derivados de la fibrina reconocidos por autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide y usos de los mismos.**

30

Prioridad: **04.11.2004 FR 04 11782**
22.12.2004 FR 04 13711
08.08.2005 FR 05 08422

73

Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile, FR

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

72

Inventor/es: **Serre, Guy y**
Sebbag, Mireille

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 310 853 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos citrulinados derivados de la fibrina reconocidos por autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide y usos de los mismos.

La presente invención se refiere a nuevos péptidos citrulinados reconocidos por autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide.

La poliartritis reumatoide (en lo sucesivo abreviada como "PR") es el más frecuente de los reumatismos inflamatorios crónicos. Se trata de una enfermedad autoinmune, y el suero de los pacientes afectados contiene autoanticuerpos de los que algunos son específicos y pueden constituir un marcador de esta enfermedad, lo que permite su diagnóstico incluso en estados precoces. Se han efectuado así investigaciones con vistas a identificar antígenos reconocidos por estos anticuerpos, con el fin de obtener preparaciones purificadas utilizables en técnicas clásicas de diagnóstico inmunológico.

Se ha demostrado que autoanticuerpos específicos de la PR reconocen diferentes variantes isoeléctricas de la (pro) filagrina (para revisión, véase por ejemplo SERRE y VINCENT, In: Autoantibodies, PETER and SHOENFELD Eds, Elsevier Science Publishers, 271-276, 1996). Estos autoanticuerpos han sido denominados por este motivo: "autoanticuerpos antifilagrina (AAF)". La Solicitud EP-0.511.116 describe la purificación y la caracterización de antígenos de la familia de las filagrinas reconocidos por estos anticuerpos y su uso en el diagnóstico de la poliartritis reumatoide.

Posteriormente, los epítomos de filagrina reconocidos por los AAF han sido identificados como regiones de la molécula de filagrina portadoras de restos citrulinados, resultantes de la transformación de restos arginilo por una peptidilarginina desiminasa (Girbal-Neuhauser E y col., J Immunol, 162, 585-94, 1999; Schellekens GA y col., J Clin Invest, 101, 273-81, 1998). El análisis de diversos péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la filagrina humana ha demostrado que la desiminación (citrulinación) era necesaria para la constitución de epítomos reconocidos por los AAF, que hoy en día se denominan igualmente autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas (AAPC). En la exposición que se ofrece a continuación se usará esta denominación.

Se ha observado igualmente que el entorno de los restos citrulinados desempeñaba también un papel importante (Girbal-Neuhauser E, 1999, citado anteriormente; Schellekens GA, 1998, citado anteriormente; Union A y col., Arthritis Rheum, 46, 1185-95, 2002); se han identificado algunos aminoácidos "permissivos" respecto de la fijación del anticuerpo y cuya naturaleza modula probablemente la afinidad de fijación del anticuerpo. Entre estos aminoácidos, los restos -gly-, -ser-, -his-, -thr- y -gln-, son los que se encuentran más a menudo en el entorno inmediato de los restos citrulinados de los péptidos "filagrina" citrulinados que, en la actualidad, se han identificado como portadores de epítomos reconocidos por los AAPC (Sebbag M y col., Rev Rhum, 68, 106, 2001).

Se han obtenido péptidos citrulinados muy numerosos reconocidos específicamente por AAPC y útiles en el diagnóstico de la PR a partir de la filagrina. Sin embargo, se ha observado igualmente que, aunque estrechamente específica de la PR, la reactividad de estos diferentes péptidos citrulinados frente a los AAPC era heterogénea, siendo péptidos diferentes reconocidos por sueros extraídos de sujetos diferentes. Esto implica que para obtener un reactivo de diagnóstico capaz de identificar la presencia de AAPC en una gran población es necesario asociar varios péptidos diferentes.

Paralelamente, se ha demostrado que los AAPC son secretados por los plasmocitos del tejido sinovial (Masson-Bessera C y col., Clin Exp Immunol, 119, 544-52, 2000) y son dirigidos específicamente contra formas citrulinadas de las cadenas α y β de fibrina presentes en este tejido (Masson-Bessera C y col., J Immunol, 166, 4177-84, 2001).

El documento WO 01/02.437 y Sebbag y col. (Joint Bone Spine vol. 71, 2004, p. 493-502) divulgan el uso de derivados citrulinados de la fibrina para el diagnóstico de la poliartritis reumatoide. Nijenhuis y col. (Clinica Chimica Acta vol. 350, 2004, p. 17-34) discuten las ventajas de los péptidos citrulinados con respecto a las proteínas citrulinadas para el diagnóstico de la poliartritis reumatoide.

Los autores de la invención han emprendido, con el fin de caracterizar mejor los epítomos reconocidos por los AAPC, la identificación de los presentados por las cadenas α y β de la fibrina. Con este fin han evaluado la reactividad de sueros que contienen AAPC frente a péptidos sintéticos citrulinados derivados de la secuencia de la cadena α y de la secuencia de la cadena β de la fibrina. Teniendo en cuenta la heterogeneidad conocida de los perfiles de reacción de los péptidos citrulinados extraídos de la filagrina con los AAPC, los autores de la invención han usado mezclas de sueros elegidas de manera que contengan AAPC que representan los diferentes perfiles de reactividad observados en el caso de estos péptidos extraídos de la filagrina, con el fin de detectar todos los péptidos de la fibrina que pueden ser reconocidos por AAPC.

Los péptidos sometidos a ensayo se han obtenido a partir de la secuencia de la cadena α y de la secuencia de la cadena β de la fibrina. En total, se han elegido 72 péptidos, de ellos 41 derivados de la cadena α de la fibrina y 31 derivados de su cadena β . Entre los 72 péptidos citrulinados analizados, los autores de la invención han identificado 13 péptidos derivados de la secuencia de la cadena α y 5 péptidos derivados de la de la cadena β de la fibrina como reactivos significativamente con una y/u otra de las mezclas de sueros sometidas a ensayo y así como portadores de epítomos reconocidos por algunos de los AAPC presentes en esta(s) mezcla(s).

ES 2 310 853 T3

Los autores de la invención han analizado a continuación individualmente cada uno de los 18 péptidos reactivos identificados con cada uno de los sueros constitutivos de las mezclas sometidas a ensayo. Este análisis ha confirmado, para la mayor parte de los péptidos sometidos a ensayo, la gran variabilidad interindividual de especificidad de los AAPC observada anteriormente en el caso de péptidos citrulinados derivados de la filagrina.

Por otra parte, esto ha permitido a los autores de la invención identificar péptidos que, de manera inesperada, poseen un espectro de reactividad con los AAPC mucho mayor que los comunicados hasta el presente en el caso de péptidos citrulinados derivados de la filagrina. En efecto, los autores de la invención han identificado 5 péptidos citrulinados (4 péptidos derivados de la cadena α y 1 derivado de la cadena β de la fibrina), que son cada uno reconocidos individualmente por al menos el 40% de los sueros analizados y parecen así portadores de epítomos mayores. Entre estos péptidos, dos son reconocidos por la mayoría de los sueros y presentan además perfiles de reactividad complementarios que engloban la totalidad de los sueros analizados. Cada uno de estos sueros reconoce en efecto a uno y/u otro de estos péptidos. Esto sugiere que estos dos péptidos son portadores de motivos estructurales representativos de una muy amplia mayoría de los diferentes motivos reconocidos por los AAPC.

La presente invención tiene por objeto un péptido aislado reconocido por autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas (AAPC) presentes en el suero de los pacientes afectados de poliartritis reumatoide, caracterizado porque comprende al menos un resto citrulilo y porque se elige en el grupo constituido por:

a) un péptido definido por la secuencia X_1 PAPPISGGGYX $_2$ AX $_3$ (ID SEC N°: 1) en la que X_1 , X_2 y X_3 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_2 o X_3 es un resto citrulilo;

b) un péptido definido por la secuencia GPX $_1$ VVEX $_2$ HQSACKDS (ID SEC N°: 2) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;

c) un péptido definido por la secuencia SGIGTLDGFX $_1$ HX $_2$ HPD (ID SEC N°: 3) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;

d) un péptido definido por la secuencia VDIDIKIX $_1$ SCX $_2$ GSCS (ID SEC N°: 4) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;

e) un péptido definido por la secuencia X_1 GHAKSX $_2$ PVX $_3$ GIHTS (ID SEC N°: 12) en la que X_1 , X_2 y X_3 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 , X_2 o X_3 es un resto citrulilo;

f) un péptido que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos, preferentemente al menos 7 aminoácidos consecutivos y ventajosamente, de 8 a 14 aminoácidos consecutivos, incluyendo al menos un resto citrulilo, de uno de los péptidos a) a e) anteriores.

Los péptidos según la invención tienen un tamaño de al menos 5 aminoácidos, preferentemente un tamaño de 5 a 25 aminoácidos, y, de manera totalmente preferida, un tamaño de 10 a 20 aminoácidos.

Según una forma de realización preferida de un péptido según la invención se elige entre:

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 1 en la que al menos X_3 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 2 en la que al menos X_2 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 3 en la que al menos X_2 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 4 en la que al menos X_1 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 12 en la que al menos X_3 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo.

De manera particularmente preferida, un péptido según la invención se elige entre:

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 1 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido de al menos 16 aminoácidos que comprende dicha secuencia;

ES 2 310 853 T3

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 2 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;

5 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 3 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;

10 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 4 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;

15 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 12 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo.

Pueden obtenerse péptidos citrulinados conformes a la invención, por ejemplo, a partir de fragmentos de fibrina o de fibrinógeno naturales, recombinantes, o de síntesis, por la acción de la peptidil-arginina-deiminasa (PAD); pueden obtenerse igualmente por síntesis peptídica, incorporando directamente uno o varios restos citrulina en el péptido sintetizado.

20 Los péptidos citrulinados conformes a la invención engloban igualmente derivados de los péptidos ID SEC N°: 1 a 4 y 12 o fragmentos de éstos, definidos anteriormente, llevando dichos derivados modificaciones destinadas a mejorar su reconocimiento por los AAPC: a modo de ejemplos de tales derivados, se citarán: péptidos ciclados; péptidos de tipo retro, en los que se encadenan L-aminoácidos según una secuencia inversa a la del péptido a reproducir; péptidos de tipo retro-inverso, constituidos por aminoácidos de la serie D (en lugar de aminoácidos de la serie L de péptidos naturales) encadenados según una secuencia inversa a la del péptido a reproducir.

30 Muy ventajosamente, se trata de péptidos en los que la función carboxilo (COOH) terminal se sustituye por una función carboxamida (CONH₂). En este marco, son péptidos particularmente preferidos aquellos en los que el resto C-terminal es un resto citrulilo cuya función carboxilo se sustituye por una función carboxamida.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto todo péptido reconocido por los AAPC presentes en el suero de los pacientes afectados por poliartritis reumatoide y que contienen en su extremo C-terminal un resto citrulilo cuya función carboxilo se sustituye por una función carboxamida. Ventajosamente, dicho péptido contiene en su secuencia al menos otro resto citrulilo. Preferentemente, dicho péptido comprende de 5 a 25 aminoácidos.

40 La sustitución de la función carboxilo del resto citrulina C-terminal por una función carboxamida puede permitir aumentar la reactividad del péptido con los AAPC, o, llegado el caso, convertir en reactivos con los AAPC péptidos que no lo son naturalmente.

45 Los péptidos citrulinados conformes a la invención engloban igualmente derivados de los péptidos ID SEC N°: 1 a 4 y 12 o de fragmentos de éstos, como los definidos anteriormente, llevando dichos derivados modificaciones destinadas a facilitar su síntesis y/o a mejorar su estabilidad. A modo de ejemplo de dichos derivados, se citarán los péptidos que incluyen aminoácidos cuyos grupos carboxilo están esterificados o transformados en grupos amida y/o aminoácidos cuyo grupo aminorado está alquilado, por ejemplo metilado o acetilado. Los grupos amina y carboxilo de los péptidos pueden estar presentes en forma de la sal correspondiente a la base o al ácido.

50 A partir de los péptidos citrulinados descritos anteriormente es también posible obtener péptidos mimotopos que comprenden al menos un resto citrulilo (péptido mimotopo citrulinado).

55 Estos péptidos mimotopos pueden obtenerse cribando bancos de péptidos citrulinados cuyas secuencias se definen a partir de las de los péptidos ID SEC N° 1, 2, 3, 4, 12 de la presente invención, usados en este marco como "péptidos modelo".

60 Preferentemente, estos bancos de péptidos se realizan mediante síntesis de diferentes péptidos de tamaño comprendido entre 10 y 20, preferentemente entre 12 y 17 aminoácidos, en particular 15 aminoácidos. Cada uno de estos péptidos conserva al menos 2, preferentemente al menos 4, ventajosamente al menos 6, de manera particularmente preferida al menos 8 y muy ventajosamente al menos 10 aminoácidos, incluyendo al menos un resto citrulilo, de la secuencia del péptido modelo elegido en las mismas posiciones que en dicho péptido modelo, siendo las otras posiciones variables.

65 Estos bancos pueden cribarse ventajosamente como se describe en los ejemplos mostrados a continuación y sobre todo con ayuda de sueros representativos de diferentes perfiles de reactividad de AAPC, como los definidos en el Ejemplo 1 a continuación.

ES 2 310 853 T3

Los procedimientos de síntesis de péptidos mimotopos son bien conocidos de por sí. Se hará referencia, por ejemplo, al capítulo 6 de "Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins", Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio and Ernest Giralt, CRC Press New York, 1997, "Peptides libraries", páginas 237-270.

5 Estos péptidos mimotopos citrulinados pueden usarse, solos o en combinación con otros péptidos citrulinados, y preferentemente en combinación con al menos uno de los otros péptidos de la invención, en una prueba de diagnóstico de la PR para reconocer los AAPC.

10 La presente invención tiene igualmente por objeto el uso de los péptidos según la invención, como los definidos anteriormente, para detectar la presencia de AAPC en una muestra biológica, en el marco del diagnóstico *in vitro* de la PR.

15 La presente invención tiene así por objeto composiciones antigénicas, útiles para detectar la presencia de AAPC en una muestra biológica en el marco del diagnóstico *in vitro* de la PR, composiciones que se caracterizan porque comprenden al menos un péptido según la invención.

20 Las composiciones según la invención pueden asociar entre sí diferentes péptidos elegidos entre los péptidos según la invención, o bien pueden asociar uno o varios péptidos según la invención con uno o varios péptidos citrulinados derivados sobre todo de la filagrina.

Según una forma de realización preferida de una composición antigénica según la invención, ésta comprende al menos un péptido de secuencia ID SEC N°: 1 y al menos un péptido de secuencia ID SEC N°: 2, como se definen anteriormente.

25 Esta composición posee un espectro de reactividad muy grande y puede permitir además detectar la PR en un estado precoz.

30 Ventajosamente, una composición según la invención puede comprender además un péptido de secuencia ID SEC N°: 3 y/o un péptido de secuencia ID SEC N°: 4 y/o un péptido de secuencia ID SEC N°: 12, como los definidos anteriormente.

35 Las composiciones según la invención pueden, llegado el caso, presentarse en forma de composiciones multipéptidicas, en las que los péptidos constitutivos se asocian entre sí o a una molécula portadora generalmente por unión covalente. A modo de ejemplo, se citarán los multipéptidos antigénicos (MAP, por "*multiple antigen peptides*") descritos sobre todo por TAM (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5409-13, 1988).

La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de detección de la presencia de AAPC en una muestra biológica, en el marco del diagnóstico *in vitro* de la PR, procedimiento que se caracteriza porque comprende:

40 - la puesta en contacto de dicha muestra biológica con al menos un péptido o una composición antigénica según la invención, según se define anteriormente, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los AAPC eventualmente presentes en dicha muestra;

45 - la detección, por todos los medios apropiados, del complejo antígeno/anticuerpo eventualmente formado.

Este procedimiento de detección puede ponerse en práctica gracias a un conjunto que comprende al menos un péptido o una composición antigénica según la invención, y, llegado el caso, tampones y reactivos apropiados para la constitución de un medio de reacción que permita la formación de un complejo antígeno/anticuerpo y/o de medios de detección de dicho complejo antígeno/anticuerpo.

50 Ventajosamente, dicho conjunto comprende un péptido o una composición antigénica según la invención, inmovilizado en un soporte sólido. A modo de ejemplos no limitativos de soportes sólidos utilizables, se citarán placas de microvaloración, conos del aparato VIDAS[®] (comercializado por BIOMERIEUX), bolas, microbolas o micropartículas, cintas, etc.

55 Dicho conjunto puede comprender igualmente muestras de referencia, como uno o varios sueros negativos y uno o varios sueros positivos.

60 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de detección de la presencia de AAPC en una muestra biológica, en el marco del diagnóstico *in vitro* de la PR, procedimiento que se caracteriza porque comprende:

- el suministro de un primer péptido citrulinado capaz de entrar en competencia para la unión a dichos AAPC con un péptido según la invención, como el definido anteriormente;

65 - la puesta en contacto de dicho primer péptido con dicha muestra biológica, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los AAPC eventualmente presentes en dicha muestra;

- la detección, por todos los medios apropiados, del complejo antígeno/anticuerpo eventualmente formado.

ES 2 310 853 T3

En particular, el primer péptido citrulinado capaz de entrar en competencia con un péptido según la invención es un péptido mimotopo citrulinado que puede obtenerse como se describe anteriormente.

La presente invención se comprenderá mejor con ayuda del complemento de descripción que se ofrecerá a continuación, que se refiere a ejemplos que ilustran la identificación de los péptidos según la invención y la puesta de manifiesto de su perfil de reactividad frente a los AAPC.

Ejemplo 1

10 *Puesta de manifiesto de la heterogeneidad de la reacción de AAPC con péptidos citrulinados extraídos de filagrina y obtención de mezclas de sueros representativas de los diferentes perfiles de reactividad*

Se han usado 90 sueros, que presentan AAPC detectables a la vez mediante ELISA y mediante inmunotransferencia en fibrinógeno humano desiminado *in vitro* (Masson-Bessera C, 2001, citado anteriormente; Nogueira L y col., Arthritis Res, 4, 90, 2002) pero también por inmunofluorescencia indirecta en criocortes de esófago de rata (Vincent C y col., Ann Rheum Dis, 48, 712-22, 1989) y por inmunotransferencia en filagrina epidérmica humana (Vincent C y col., J Rheumatol, 25, 838-46, 1998). La reactividad de estos 90 sueros multipositivos se ha analizado en ELISA con respecto a 5 péptidos citrulinados diferentes cuya reactividad frente a AAPC se había establecido previamente. Estos péptidos son los siguientes:

E12D	ESSRDGSXHPRSHD	(ID SEC N°: 5)
T12E	TGSSTGGXQGSHE	(ID SEC N°: 6)
E12H	EQSADSSXHSGSGH	(ID SEC N°: 7)
cfc6	SHQESTXGXSRRGRSGS	(ID SEC N°: 8)
cf48-65-4	TIHAHPGSXXGGRHGYHH	(ID SEC N°: 9)

(X designa un resto citrulilo).

Los péptidos E12D, T12E y E12H han sido descritos por Girbal-Neuhauser, E. y col. (1999). Los péptidos cfc6 y cf48-65-4 han sido descritos por Schellekens, G. y col. (1998).

El análisis por ELISA se ha efectuado según el protocolo descrito por Girbal-Neuhauser, E. y col. (1999)

Este análisis ha permitido identificar 12 perfiles de reactividad con respecto a los 5 péptidos.

Estos perfiles se resumen en la Tabla I a continuación.

TABLA I

Perfil	E12D	E12H	T12E	cfc6	cf48-65-4
1	+	+	+		+
2	+	+	+		
3	+	+		+	
4	+	+			
5	+				
6	+				+
7		+			
8		+	+		+
9			+		
10				+	+
11				+	
12					+

ES 2 310 853 T3

Para que sean lo más representativas posible de los diferentes perfiles de reactividad de AAPC, las mezclas, denominadas en lo sucesivo mezclas: "A" y "B", se han constituido cada una mediante mezcla a partes iguales de 10 sueros que representan diferentes perfiles de reactividad en péptidos "filagrina".

5 La composición de estas dos mezclas se indica en la Tabla II a continuación.

TABLA II

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Suero	Perfil	Mezcla
97.0459	1	A
97.0388	3	
97.1436	4	
97.0169	6	
97.0530	7	
97.0311	8	
97.0506	9	
97.0468	10	
97.0796	11	
97.0907	12	
97.1715	1	B
97.0524	1	
97.0323	2	
97.0794	4	
95.0256	5	
97.1795	5	
97.1474	9	
97.0244	10	
97.1548	11	
97.1210	12	

55

Estas dos mezclas A y B son así representativas de la heterogeneidad de especificidad de los sueros AAPC+.

Ejemplo 2

60

Identificación de péptidos citrulinados derivados de cadenas α y β de la fibrina, que reaccionan con los AAPC

65

Los péptidos sometidos a ensayo se han obtenido a partir de la secuencia de la cadena α y de la secuencia de la cadena β de la fibrina [parte correspondiente respectivamente a los restos 36-635 y 45-491 de las cadenas A(α) (referencia NP Acceso: NP_068657) y B(β) (referencia SWISSPROT FIBB_HUMAN Prim. Acceso: P02675) del fibrinógeno]. Las secuencias de los restos 1 a 635 y 1 a 491 de las cadenas A(α) y B(β) del fibrinógeno se representan igualmente respectivamente en la lista de secuencias en anexo en los números ID SEC N°: 10 y ID SEC N°: 11 y en la fig. 1A y B. Las secuencias indicadas en negrita en la fig. 1 son las de las secuencias de señal de proteínas seguidas de las de sus fibrinopéptidos (A y B, respectivamente).

ES 2 310 853 T3

Cada cadena α o β de fibrina se ha segmentado en secuencias contiguas de 15 aminoácidos y se han elegido todos los péptidos que comprenden al menos un resto arginilo. En el caso de los péptidos en los cuales el resto arginilo se situaba en el extremo NH₂- o COOH-terminal, se ha elegido una segunda serie de péptidos de 15 aminoácidos, encabalgándose con los primeros, de forma que se recentra el resto arginilo terminal en la secuencia. Además, se ha sintetizado un péptido correspondiente a los restos 621-629 de la cadena α de la fibrina. En total, se han elegido 72 péptidos, de ellos 41 derivados de la cadena α de la fibrina y 31 derivados de su cadena β . Para cada uno de los péptidos, la forma con resto(s) arginilo (forma nativa) y la forma en la que todos los restos arginilo se han sustituido por restos citrullilo (forma citrulinada) se han sintetizado según el procedimiento en fase sólida de Merrifield con una pureza $\geq 60\%$ [Société NeomPS (Estrasburgo, Francia)].

La lista de los péptidos citrulinados elegidos se da en la Tabla III a continuación:

TABLA III

A. Primera serie:			
Cadena α			
α 36-50Cit _{38,42}	α 71-185Cit _{178,181}	α 351-365Cit ₃₅₃	α 456-470Cit _{458,459}
α 66-80Cit ₆₉	α 186-200Cit _{186,190}	α 366-380Cit ₃₆₇	α 501-515Cit _{510,512}
α 81-95Cit ₈₄	α 216-230Cit _{216,218}	α 381-395Cit ₃₉₄	α 546-560Cit ₅₄₇
α 111-125Cit _{114,123}	α 246-260Cit ₂₅₈	α 396-410Cit ₄₀₄	α 561-575Cit ₅₇₃
α 126-140Cit _{129,135,137}	α 261-275Cit _{263,271}	α 411-425Cit ₄₂₅	α 591-605Cit ₅₉₁
α 141-155Cit ₁₄₃	α 276-290Cit ₂₈₇	α 426-440Cit ₄₂₆	α 621-629Cit _{621,627}
α 156-170Cit _{160,168}	α 306-320Cit ₃₀₈	α 441-455Cit ₄₄₃	α 621-635Cit _{621,627,630}
Cadena β			
β 45-59Cit _{47,53}	β 195-209Cit _{196,199,206}	β 330-344Cit ₃₃₄	β 435-449Cit _{436,445}
β 60-74Cit _{60,72,74} ^a	β 210-224Cit ₂₂₄	β 375-389Cit ₃₇₆	β 465-479Cit ₄₇₈
β 75-89Cit ₈₇	β 240-254Cit ₂₄₆	β 390-404Cit ₃₉₅	β 480-491Cit ₄₈₅
β 120-134Cit _{121,124}	β 255-269Cit ₂₆₇	β 405-419Cit ₄₁₀	
β 150-164Cit ₁₅₈	β 285-299Cit _{285,294}	β 420-434Cit ₄₂₁	
B. Segunda serie:			
Cadena α			
α 138-152Cit ₁₄₃	α 300-314Cit ₃₀₈	α 438-452Cit ₄₄₃	α 615-629Cit _{621,627}
α 183-197Cit _{186,190}	α 347-361Cit ₃₅₃	α 455-469Cit _{458,459}	
α 213-227Cit _{216,218}	α 363-377Cit ₃₆₇	α 542-556Cit ₅₄₇	
α 259-273Cit _{263,271}	α 420-434Cit _{425,426}	α 588-602Cit ₅₉₁	
Cadena β			
β 50-64Cit _{53,60}	β 202-216Cit ₂₀₆	β 281-295Cit _{285,294}	β 474-488Cit _{478,485}
β 116-130Cit _{121,124}	β 215-229Cit ₂₂₄	β 373-387Cit ₃₇₆	
β 188-202Cit _{196,199}	β 219-233Cit ₂₂₄	β 416-430Cit ₄₂₁	
β 193-207Cit _{196,199,206}	β 236-250Cit ₂₄₆	β 433-447Cit _{436,445}	
^a Este péptido se ha sintetizado con la función carboxilo (COOH) del resto citrullilo C-terminal bien en forma "libre" (COOH), o bien en forma amidada (función carboxamida: CONH ₂).			

ES 2 310 853 T3

La nomenclatura usada es la siguiente: nombre de origen de la cadena polipeptídica (α o β) del fibrinógeno del que se deriva la secuencia, después posición en esta secuencia del resto amino-terminal del péptido - posición del resto carboxi-terminal del péptido. Estas posiciones están numeradas con respecto al extremo N-terminal del fibrinógeno. La mención Cit indica que se trata de una forma citrulinada del péptido. La posición del resto arginilo que se sustituye por un resto citrulilo se indica en índice. Sólo se presentan las formas citrulinadas de los péptidos.

Cada par de péptidos (citrulinado y no citrulinado) se ha sometido a ensayo en ELISA con una mezcla a partes iguales de 10 sueros que no presentan AAPC (mezcla de control) y con las 2 mezclas A y B descritas en el Ejemplo 1.

Los péptidos se han sometido a ensayo después de recubrimiento de placas de poliestireno irradiado (Nunc Maxisorp) en tres tampones diferentes (acetato pH 5,0, PBS pH 7,4 y carbonato pH 9,0), de manera que se optimicen las posibilidades de fijación pasiva de los péptidos (10 μ g/ml) que presentaban puntos isoeléctricos muy heterogéneos (que se extienden de 4 a 12 para las formas no citrulinadas). Cada par de péptidos (forma nativa y citrulinada) se ha sometido a ensayo en la misma placa y un par de péptidos de control -péptido "filagrina" citrulinado cfc6 y su correspondiente nativo cf0 (Schellekens GA, 1998, citado anteriormente)- se ha incluido durante cada experimentación, lo que ha permitido calcular un coeficiente de variación interensayos y efectuar las correcciones.

Después de saturación en PBS-BSA al 2%, se han incubado las mezclas de sueros diluidos al 1/50 en PBS 2 NaCl - BSA al 2% y después se ha revelado su fijación con IgG de cabra anti-IgG humana marcada con peroxidasa (Southern) diluidas al 1/1.000 en PBS BSA al 2%. Todas las incubaciones han tenido lugar durante 1 h a 4°C y han ido seguidas seguido de lavados en PBS-Tween al 0,1%. La actividad de la peroxidasa se ha revelado mediante una solución de ortofenilendiamina (2 mg/ml - Sigma) en peróxido de hidrógeno (0,03% - Sigma). La reacción se ha interrumpido después 5 minutos con ácido sulfúrico 4 M y se ha medido la densidad óptica (DO) a 492 nm gracias a un espectrofotómetro automático (Multiskan, Thermo LabSystems).

La reactividad específica de las mezclas de sueros con respecto a los péptidos citrulinados correspondía a la diferencia entre la DO obtenida con el péptido citrulinado y la obtenida con el péptido nativo correspondiente (delta DO). Los resultados corresponden a la media de 2 determinaciones. Todo péptido citrulinado que permite obtener una delta DO superior a 0,250 para al menos una de las dos mezclas A y B después de recubrimiento en al menos uno de los tres tampones, se ha considerado como reactivo.

Entre los 72 péptidos citrulinados analizados, 13 péptidos derivados de la secuencia de la cadena α de la fibrina y 5 péptidos derivados de la de la cadena β se han revelado como portadores de epítomos reconocidos por los AAPC. Entre estos péptidos, 6 péptidos eran muy reactivos (delta DO \geq 1,5), 8 péptidos lo eran de manera media ($0,5 \leq$ delta DO $<$ 1,5) y 4 péptidos lo eran poco ($0,25 \leq$ delta DO $<$ 0,5). Los otros péptidos citrulinados han revelado ser poco o nada reactivos ($0,0 \leq$ delta DO $<$ 0,25). No se ha observado ninguna reactividad con la mezcla de control, lo que permite identificar los péptidos reactivos como portadores de epítomo(s) reconocido(s) por los AAPC.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 310 853 T3

Los resultados obtenidos para los 18 péptidos reactivos se presentan en la Tabla IV a continuación:

TABLA IV

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Péptido	Mezcla de sueros	Tampón de revestimiento		
		Acetato	PBS	Carbonato
α 36-50Cit _{38,42}	Mezcla A	4,00	2,69	3,43
	Mezcla B	4,27	2,65	2,64
α 171-185Cit _{178,181}	Mezcla A	0,15	0,29	0,75
	Mezcla B	0,08	0,21	0,47
α 183-197Cit _{186,190}	Mezcla A	0,41	1,68	1,36
	Mezcla B	0,01	0,15	0,07
α 246-260Cit ₂₅₈	Mezcla A	0,04	0,00	0,00
	Mezcla B	0,27	0,25	0,33
α 259-273Cit _{263,271}	Mezcla A	0,14	0,60	0,12
	Mezcla B	0,21	0,69	0,20
α 366-380Cit ₃₆₇	Mezcla A	0,28	0,37	0,26
	Mezcla B	0,00	0,04	0,08
α 396-410Cit ₄₀₄	Mezcla A	0,04	0,02	0,43
	Mezcla B	0,15	0,17	0,20
α 411-425Cit ₄₂₅	Mezcla A	0,09	0,16	0,56
	Mezcla B	0,38	0,66	0,43
α 501-515Cit _{510,512}	Mezcla A	0,16	0,92	0,15
	Mezcla B	0,72	2,60	0,79
α 546-560Cit ₅₄₇	Mezcla A	0,38	0,74	0,33
	Mezcla B	0,05	0,15	0,16
α 561-575Cit ₅₇₃	Mezcla A	0,05	0,30	0,01
	Mezcla B	0,14	0,52	0,17
α 588-602Cit ₅₉₁	Mezcla A	0,05	0,16	0,36
	Mezcla B	0,06	0,33	0,67
α 621-635Cit _{621,627,630}	Mezcla A	0,25	1,57	1,17
	Mezcla B	0,18	1,51	1,20
β 60-74Cit _{60,72,74} ^a	Mezcla A	1,02	2,06	1,27
	Mezcla B	2,83	2,69	2,72
β 210-224Cit ₂₂₄	Mezcla A	0,25	0,29	1,14
	Mezcla B	0,00	0,60	1,56

ES 2 310 853 T3

TABLA IV (continuación)

Péptido	Mezcla de sueros	Tampón de revestimiento		
		Acetato	PBS	Carbonato
β 281-295Cit _{285,294}	Mezcla A	0,12	0,60	0,61
	Mezcla B	0,11	0,75	0,71
β 420-434Cit ₄₂₁	Mezcla A	0,36	0,48	0,44
	Mezcla B	0,00	0,00	0,00
β 433-447Cit _{436,445}	Mezcla A	0,41	0,58	0,67
	Mezcla B	0,00	0,00	0,03

^a Los resultados indicados corresponden a los obtenidos con la forma del péptido que tiene una función C-terminal amidada (función carboxamida: CONH₂)

Ejemplo 3

Perfil de reactividad de los péptidos citrulinados que reaccionan con los AAPC

Los 14 péptidos portadores de los epítomos más reactivos ($\Delta DO \geq 0,5$ para una u otra de las mezclas de suero (A y B) con al menos uno de los tres tampones de recubrimiento) se han sometido a ensayo independientemente con los 20 sueros constitutivos de las mezclas A y B, con el fin de evaluar el perfil de reactividad de cada uno de estos péptidos. Las pruebas se han efectuado en ELISA en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2 anterior, salvo que, para cada par de péptidos, se ha elegido como tampón de recubrimiento el que haya permitido obtener la más alta reactividad frente a este péptido durante el cribado (el tampón en el que la suma de las ΔDO obtenidas respectivamente para las mezclas A y B de sueros era máxima). Además, las diluciones de los sueros se han ajustado de tal manera que tengan una avidéz equivalente para el fibrinógeno desiminado entero. Así, para cada suero, se ha elegido la dilución que permite obtener una DO de 1 en ELISA en el fibrinógeno desiminado (Nogueira L, 2002, citado anteriormente). Las diluciones se escalonaron del 1/20 al 1/2700.

Los resultados se ilustran en la Tabla V a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla V

Suero	Dilución	$\beta 60-74$ Cit ^{60,72,74} ^a	$\alpha 36-50$ Cit ^{38,42}	$\alpha 62-1-63$ 5Cit ^{62,1,62,7,63,0}	$\alpha 501-515$ Cit ^{510,512}	$\alpha 171-185$ Cit ^{178,181}	$\beta 281-295$ Cit ^{285,294}	$\beta 210-224$ Cit ²²⁴	$\alpha 183-197$ Cit ^{186,190} ^b	$\alpha 561-575$ Cit ⁵⁷³	$\alpha 546-560$ Cit ⁵⁴⁷ ^b	$\beta 433-447$ Cit ^{436,445} ^b	$\alpha 259-273$ Cit ^{263,271}	$\alpha 588-602$ Cit ⁵⁹¹	$\alpha 411-425$ Cit ⁴²⁵
97.0459	1/60	0,71 ^c	3,55			0,29	2,22		3,21	0,38					
97.1715	1/300		3,50		1,79										
97.0524	1/200		3,39		2,85	0,59	0,25								
97.0323	1/120	1,73	1,87		3,23		1,16	0,36							
97.0388	1/50		3,32	2,71	2,88							1,14			
97.1436	1/150		3,30		2,80										
97.0794	1/50	0,75	3,43		3,30	2,09	0,26			1,95					
97.0256	1/35	3,48	2,35		2,37										
97.1795	1/50		2,29			0,57		0,49						0,79	
97.0169	1/400	0,31		0,80										1,34	
97.0530	1/50		2,97		0,69						0,44				
97.0311	1/200	1,93	0,71	0,37		1,95		0,46	0,87	0,30			0,29		
97.0506	1/75	1,93			0,44		1,80		0,85						
97.1474	1/20	0,37	1,93	0,59		1,08	0,36			0,71			0,39		
97.0468	1/700	1,08		0,81		0,42							0,32		
97.0244	1/2.700	1,23		0,50											
97.1548	1/60	1,48		3,29		0,71				0,53					
97.0796	1/500	0,36		0,69				0,67			1,18	0,71			
97.0907	1/300	1,17		1,04		0,44		0,33							
97.1210	1/300	3,33		0,37				0,72							0,84
Nº sueros positivos		14/20	12/20	10/20	9/20	9/20	6/20	6/20	3/10	5/20	2/10	2/10	3/20	2/20	1/20

^a Los resultados indicados corresponden a los obtenidos con la forma del péptido que tiene una función C-terminal amidada (función carboxamida: CONH₂)

^b Para estos tres péptidos, la reactividad individual de los sueros de la mezcla B no se ha sometido a ensayo, ya que no era reactiva

^c Los delta DO < 0,25 no se presentan

ES 2 310 853 T3

Ejemplo 4

Comparación de la reactividad del péptido $\beta 60-74\text{Cit}_{60,72,74}$ según que su función C-terminal sea un carboxilo (COOH) o una carboxamida (CONH₂)

5 Se han recubierto placas ELISA con el péptido $\beta 60-74\text{Cit}_{60,72,74}$ cuya función C-terminal del resto citrulilo carboxi-terminal no está amidada (forma que lleva una función COOH terminal, en lo sucesivo designada como “forma no amidada”), con el péptido $\beta 60-74\text{Cit}_{60,72,74}$ cuya función C-terminal del resto citrulilo carboxi-terminal está amidada (forma que lleva una función CONH₂ terminal, en lo sucesivo designada como “forma amidada”) y el péptido no citrulinado $\beta 60-74$ (cuya función C-terminal del resto arginilo carboxi-terminal no está amidada), todos diluidos en PBS. Las mezclas A y B de sueros descritos en el ejemplo 1 se han sometido a ensayo según el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Como en el ejemplo 2, la reactividad específica del péptido en forma no amidada o en forma amidada correspondía a la diferencia entre la DO obtenida con estos dos péptidos citrulinados y la obtenida con el péptido no citrulinado $\beta 60-74$. La reactividad de la forma amidada del péptido parece claramente más intensa que la de la forma no amidada que era, sin embargo, significativa. Los resultados corresponden a la media de dos experimentos, cada uno de los cuales comprende dos determinaciones. Los resultados se presentan en la Tabla VI a continuación.

TABLA VI

Péptido	Mezcla de sueros	Delta DO
$\beta 60-74\text{Cit}_{60,72,74}$ no amidado	Mezcla A	0,30
	Mezcla B	1,16
$\beta 60-74\text{Cit}_{60,72,74}$ amidado	Mezcla A	2,13
	Mezcla B	2,74

Referencias citadas en la descripción

35 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante pretende únicamente ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europeo. Aun cuando se ha puesto el mayor esmero en su elaboración, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.*

40 Documentos de patentes citados en la descripción

- EP-0.511.116-A [0003]
- WO-0.102.437-A [0008]
- FR-0.411.782 [0062]
- FR-0.413.711 [0062]
- FR-0.508.422 [0062].

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **SERRE**; VINCENT. Autoantibodies. Elsevier Science Publishers, 1996, 271-276 [0003]
- **GIRBAL-NEUHAUSER** E y col. *J Immunol*, 1999, vol. 162, 585-94 [0004]
- **SHELLEKENS** GA y col. *J Clin Invest*, 1998, vol. 101, 273-81 [0004]
- **UNION** A y col. *Arthritis Rheum*, 2002, vol. 46, 1185-95 [0005]
- **SEBBAG** M y col. *Rev Rhum*, 2001, vol. 68, 106 [0005]
- **MASSON-BESSERA** C y col. *Clin Exp Immunol*, 2000, vol. 119, 544-52 [0007]
- **MASSON-BESSERA** C y col. *J Immunol*, 2001, vol. 166, 4177-84 [0007]
- **SEBBAG** y col. *Joint Bone Spine*, 2004, vol. 71, 493-502 [0008]

ES 2 310 853 T3

• **NIJENHUIS** y col. *Clinica Chimica Acta*, 2004, vol. 350, 17-34 [0008]

• Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. **PAUL LLOYD-WILLIAMS**; **FERNANDO ALBERICIO**; **ERNEST GIRALT**. Peptides libraries. CRC Press, 1997, 237-270 [0027]

5

• **TAM**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 5409-13 [0035]

• **NOGUEIRA L** y col. *Arthritis Res*, 2002, vol. 4, 90 [0041]

10

• **VINCENT C** y col. *Ann Rheum Dis*, 1989, vol. 48, 712-22 [0041]

• **VINCENT C** y col. *J Rheumatol*, 1998, vol. 25, 838-46 [0041].

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado reconocido por autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas (AAPC) presentes en el suero de los
 5 pacientes afectados por poliartritis reumatoide (PR), **caracterizado** porque comprende al menos un resto citrulilo y
 porque se elige entre el grupo constituido por:

- 10 a) un péptido definido por la secuencia $X_1PAPPISGGGYX_2AX_3$ (ID SEC N°: 1) en la que X_1 , X_2 y X_3 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_2 o X_3 es un resto citrulilo;
- 15 b) un péptido definido por la secuencia $GPX_1VVEX_2HQSACKDS$ (ID SEC N°: 2) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;
- 20 c) un péptido definido por la secuencia $SGIGTLDGFX_1HX_2HPD$ (ID SEC N°: 3) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;
- 25 d) un péptido definido por la secuencia $VDIDIKIX_1SCX_2GSCS$ (ID SEC N°: 4) en la que X_1 y X_2 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 o X_2 es un resto citrulilo;
- e) un péptido definido por la secuencia $X_1GHAKSX_2PVX_3GIHTS$ (ID SEC N°: 12) en la que X_1 , X_2 y X_3 representan cada uno un resto citrulilo o un resto arginilo y al menos uno de los restos X_1 , X_2 o X_3 es un resto citrulilo;
- f) un péptido que comprende al menos 5 aminoácidos consecutivos, incluyendo al menos un resto citrulilo, de uno de los péptidos a) a e) anteriores.

2. Péptido según la reivindicación 1,

caracterizado porque se elige entre el grupo constituido por:

- 35 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 1 en la que al menos X_3 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 40 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 2 en la que al menos X_2 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 45 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 3 en la que al menos X_2 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- 50 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 4 en la que al menos X_1 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo;
- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 12 en la que al menos X_3 es un resto citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dicho resto citrulilo.

3. Péptido según la reivindicación 2,

caracterizado porque se elige entre el grupo constituido por:

- 55 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 1 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido de al menos 16 aminoácidos que comprende dicha secuencia;
- 60 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 2 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;
- 65 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 3 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;

ES 2 310 853 T3

- un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 4 en la que X_1 y X_2 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo;

5 - un péptido definido por la secuencia ID SEC N°: 12 en la que X_1 , X_2 y X_3 son restos citrulilo, o un péptido que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia que contiene dichos restos citrulilo.

10 4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la función carboxilo (COOH) terminal se sustituye por una función carboxamida (CONH₂).

5. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para detectar la presencia de AAPC específicos de la PR en una muestra biológica.

15 6. Composición antigénica, **caracterizada** porque comprende al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

20 7. Composición antigénica según la reivindicación 6, **caracterizada** porque comprende un péptido de secuencia ID SEC N°: 1 y un péptido de secuencia ID SEC N°: 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Composición antigénica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizada** porque comprende un péptido de secuencia ID SEC N°: 3 y/o un péptido de secuencia ID SEC N°: 4 y/o un péptido de secuencia ID SEC N°: 12, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25 9. Procedimiento de detección de la presencia de AAPC en una muestra biológica, procedimiento que se **caracteriza** porque comprende:

30 - la puesta en contacto de dicha muestra biológica con al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición antigénica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los AAPC eventualmente presentes en dicha muestra;

- la detección, por todos los medios apropiados, del complejo antígeno/anticuerpo eventualmente formado.

35 10. Procedimiento de detección de la presencia de AAPC en una muestra biológica, procedimiento que se **caracteriza** porque comprende:

40 - el suministro de un primer péptido citrulinado capaz de entrar en competencia para la unión a dichos AAPC con un péptido como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;

- la puesta en contacto de dicho primer péptido con dicha muestra biológica en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los AAPC eventualmente presentes en dicha muestra;

45 - la detección, por todos los medios apropiados, del complejo antígeno/anticuerpo eventualmente formado.

50

55

60

65

ES 2 310 853 T3

A.

MFSMRIVCLV	LSVVGTAWTA	DSGEGDFLAE	GGGVRGPRVV	ERHQSACKDS	DWPFCSDEDW	60
NYKCPSGCRM	KGLIDEVNQD	FTNRINKLKN	SLFEYQKNNK	DSHSLTNNIM	EILRGDFSSA	120
NNRDNTYNRV	SEDLRSRIEV	LKRKVIKQVQ	HIQLLQKNVR	AQLVDMKRLE	VDIDIKIRSC	180
RGSCSRALAR	EVDLKDYEDQ	QKQLEQVIAK	DLLPSRDRQH	LPLIKMKPVP	DLVPGNFKSQ	240
LQKVPPPEWKA	LTDMPQMRME	LERPGGNEIT	RGGSTSYGTG	SETESPRNPS	SAGSWNSGSS	300
GPSTGNRNP	GSSGTGGTAT	WKPGSSGPGS	TGSWNSGSSG	TGSTGNQNP	SPRPGSTGTW	360
NPGSSERGSA	GHWTSESSVS	GSTGQWHSSE	GSFRPDSPGS	GNARPNNPDW	GTFEEVSGNV	420
SPGTRREYHT	EKLVTSKGDK	ELRTGKEKVT	SGSTTTTTRS	CSKTVTKTVI	GPDGHKEVTK	480
EVVTSLEDGSD	CPEAMDGLTL	SGIGTLDGFR	HRHPDEAAFF	DTASTGKTFP	GFFSPMLGEF	540
VSETESRGSE	SGIFTNTKES	SSHHPGIAEF	PSRGKSSSYS	KQFTSSTSYN	RGDSTFESKS	600
YKMADEAGSE	ADHEGTHSTK	RGHAKSRPVR	GIHTS			635

B.

MKRMVSWSFH	KLKTMKHLIL	LLLCVFLVKS	QGVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	60
PAPFPISGGG	YRARPAKAAA	TQKKVERKAP	DAGGCLHADP	DLGVLCPGTC	QLQEALLQQE	120
RPIRNSVDEL	NNNVEAVSQT	SSSSFQYMYL	LKDLWQKRQK	QVKDNENVVN	EYSSELEKHQ	180
LYIDETVNSN	IATNLRVLR	ILENLRSKIQ	KLESDVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSQKE	240
CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	DMNTENGGWT	VIONRQDGSV	DFGRKWDPYK	300
QGFNVATNT	DGKNYCGLPG	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTL	LIEMEDWKGD	KVKAHYGGFT	360
VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	NALMDGASQL	MGENRTMTIH	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDP	420
RKQCSKEDGG	GWWYNRCHAA	NPNGRYWGG	QYTWDMAKHG	TDDGVVWMNW	KGSWYSMRKM	480
SMKIRPFFPQ	Q					491

FIGURA 1

ES 2 310 853 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIOMERIEUX
SERRE, Guy
5 SEBBAG, Mireille

<120> Péptidos citrulinados derivados de la fibrina reconocidos por autoanticuerpos específicos de la poliartritis reumatoide y usos de los mismos.

<130> MJPbv-F1067/2

10 <150> FR 0411782
<151> 04-11-2004
<150> FR 0413711
<151> 22-12-2004

15 <150> FR 0508422
<151> 08-08-2005
<160> 12

20 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 15
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> X = resto citrulilo o arginilo

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)

40 <223> X = resto citrulilo o arginilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

45 <223> X = resto citrulilo o arginilo

<400> 1

50 Xaa Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Xaa Ala Xaa
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15

55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

60 <223> Péptido citrulinado
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)

65 <223> X = resto citrulilo o arginilo
<220>

ES 2 310 853 T3

```

<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> X = resto citrulilo o arginilo
5
<400> 2

      Gly Pro Xaa Val Val Glu Xaa His Gln Ser Ala Cys Lys Asp Ser
10      1          5          10          15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> X = resto citrulilo o arginilo
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
30 <223> X = resto citrulilo o arginilo

<400> 3

      Ser Gly Ile Gly Thr Leu Asp Gly Phe Xaa His Xaa His Pro Asp
35      1          5          10          15

<210> 4
<211> 15
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
45 <220>
<221> misc_feature
<222> (8) .. (8)
50 <223> X = resto citrulilo o arginilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
55 <223> X = resto citrulilo o arginilo

<400> 4

      Val Asp Ile Asp Ile Lys Ile Xaa Ser Cys Xaa Gly Ser Cys Ser
60      1          5          10          15

<210> 5
65 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

ES 2 310 853 T3

<220>
<223> Péptido citrulinado
<220>
5 <221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> X = resto citrulilo
10 <400> 5
Glu Ser Ser Arg Asp Gly Ser Xaa His Pro Arg Ser His Asp
1 5 10
15 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
<220>
25 <221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> X = resto citrulilo
30 <400> 6
Thr Gly Ser Ser Thr Gly Gly Xaa Gln Gly Ser His His Glu
1 5 10
35 <210> 7
<211> 14
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
<220>
45 <221> misc_feature
<222> (8) .. (8)
<223> X = resto citrulilo
50 <400> 7
Glu Gln Ser Ala Asp Ser Ser Xaa His Ser Gly Ser Gly His
1 5 10
55 <210> 8
<211> 19
<212> PRT
60 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
<220>
65 <221> misc_feature
<222> (7)..(7)

ES 2 310 853 T3

<223> X = resto citrulilo
<220>
<221> misc_feature
5 <222> (9) .. (9)
<223> X = resto citrulilo

<400> 8
10
 Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Xaa Ser Arg Gly Arg Ser Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Gly Ser
15
<210> 9
<211> 18
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido citrulinado
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> X = resto citrulilo
30
<400> 9

 Thr Ile His Ala His Pro Gly Ser Xaa Xaa Gly Gly Arg His Gly Tyr
35 1 5 10 15

 His His

<210> 10
40 <211> 635
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
45

50

55

60

65

ES 2 310 853 T3

<400> 10

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

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 853 T3

	Met	Arg	Met	Glu	Leu	Glu	Arg	Pro	Gly	Gly	Asn	Glu	Ile	Thr	Arg	Gly
				260					265					270		
5	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Gly	Thr	Gly	Ser	Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Arg	Asn
			275					280					285			
	Pro	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser
		290					295					300				
10	Thr	Gly	Asn	Arg	Asn	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr
	305					310					315					320
	Trp	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Trp	Asn	Ser
				325						330					335	
	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Asn	Gln	Asn	Pro	Gly	Ser	Pro
15			340						345				350			
	Arg	Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Thr	Trp	Asn	Pro	Gly	Ser	Ser	Glu	Arg	Gly
		355						360					365			
	Ser	Ala	Gly	His	Trp	Thr	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly
20		370					375					380				
	Gln	Trp	His	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Arg	Pro	Asp	Ser	Pro	Gly	Ser
	385				390						395					400
	Gly	Asn	Ala	Arg	Pro	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu	Val
25				405					410						415	
	Ser	Gly	Asn	Val	Ser	Pro	Gly	Thr	Arg	Arg	Glu	Tyr	His	Thr	Glu	Lys
			420						425					430		
	Leu	Val	Thr	Ser	Lys	Gly	Asp	Lys	Glu	Leu	Arg	Thr	Gly	Lys	Glu	Lys
		435					440						445			
30	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Cys	Ser	Lys	Thr
	450					455						460				
	Val	Thr	Lys	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Asp	Gly	His	Lys	Glu	Val	Thr	Lys
	465				470					475						480
	Glu	Val	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Ser	Asp	Cys	Pro	Glu	Ala	Met	Asp
35				485					490						495	
	Leu	Gly	Thr	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	His	Arg
			500						505					510		
	His	Pro	Asp	Glu	Ala	Ala	Phe	Phe	Asp	Thr	Ala	Ser	Thr	Gly	Lys	Thr
40		515						520					525			
	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Pro	Met	Leu	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Glu	Thr
	530					535						540				
	Glu	Ser	Arg	Gly	Ser	Glu	Ser	Gly	Ile	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Ser
45		545				550					555					560
	Ser	Ser	His	His	Pro	Gly	Ile	Ala	Glu	Phe	Pro	Ser	Arg	Gly	Lys	Ser
			565						570					575		
	Ser	Ser	Tyr	Ser	Lys	Gln	Phe	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Gly
			580						585					590		
50	Asp	Ser	Thr	Phe	Glu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Lys	Met	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly
		595						600					605			
	Ser	Glu	Ala	Asp	His	Glu	Gly	Thr	His	Ser	Thr	Lys	Arg	Gly	His	Ala
		610					615					620				
55	Lys	Ser	Arg	Pro	Val	Arg	Gly	Ile	His	Thr	Ser					
	625					630					635					

<210> 11

<211> 491

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 310 853 T3

<400> 11

5 Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys
 1 5 10 15
 His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly
 20 25 30
 Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro
 35 40 45
 10 Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro
 50 55 60
 Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 15 Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu
 85 90 95
 His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu
 100 105 110
 20 Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp
 115 120 125
 Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser
 130 135 140
 25 Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys
 145 150 155 160
 Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu
 165 170 175
 Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Ala
 180 185 190
 30 Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys
 195 200 205
 Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg
 210 215 220
 35 Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu
 245 250 255
 40 Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met
 260 265 270
 Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly
 275 280 285
 45 Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly
 290 295 300
 Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly
 305 310 315 320
 Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly
 325 330 335
 50 Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val
 340 345 350
 Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr
 355 360 365
 55 Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met
 370 375 380

60

65

ES 2 310 853 T3

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His
 385 390 395 400
 5 Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu
 405 410 415
 Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp
 420 425 430
 Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp
 435 440 445
 10 Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly
 450 455 460
 Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met
 465 470 475 480
 15 Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln
 485 490

<210> 12

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido citrulinado

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

30 <223> X = resto citrulilo o arginilo

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (7) .. (7)

<223> X = resto citrulilo o arginilo

<220>

<221> misc_feature

40 <222> (10) .. (10)

<223> X = resto citrulilo o arginilo

<400> 12

45 Xaa Gly His Ala Lys Ser Xaa Pro Val Xaa Gly Ile His Thr Ser
 1 5 10 15

50

55

60

65