



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 13 620 T2** 2004.02.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 041 997 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 13 620.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR98/02900**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 964 537.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/034819**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **15.07.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 38/17**

**A61K 9/16, A61P 37/00**

(30) Unionspriorität:

**9716672 30.12.1997 FR**

(73) Patentinhaber:

**Université Paul Sabatier (Toulouse III), Toulouse, FR**

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS, KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LI, NL, SE**

(72) Erfinder:

**SERRE, Guy, F-31100 Toulouse, FR; GIRBAL-NEUHAUSER, Elisabeth, F-31000 Toulouse, FR; VINCENT, Christian, F-31650 Lauzerville, FR; SIMON, Michel, F-31450 Belberaud, FR; SEBBAG, Mireille, F-31500 Toulouse, FR; DALBON, Pascal, F-69006 Lyon, FR; JOLIVET-REYNAUD, Colette, F-69500 Bron, FR; ARNAUD, Michel, F-69100 Villeurbanne, FR; JOLIVET, Michel, F-69500 Bron, FR**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON CITRULLIN ENTHALTENDEN PEPTIDEN, DIE VON FILAGGRIN ABSTAMMEN, ZUR BEHANDLUNG VON AUTOIMMUNKRANKHEITEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Peptiden, die sich von Filaggrin ableiten, bei der Behandlung von Autoimmun-Erkrankungen, insbesondere von rheumatoider Polyarthrit (PR).

[0002] Im Blut von Patienten mit rheumatoider Polyarthrit wurden zirkulierende Antikörper entdeckt und als spezifische Marker für diese Erkrankung vorgeschlagen.

[0003] Diese Antikörper wurden ursprünglich in zwei Familien eingeteilt:

– die antiperinukleären Faktoren (APF), bei denen es sich um zirkulierende Immunglobuline handelt, die durch indirekte Immunfluoreszenz auf Abstrichen von jugulären Humanzellen nachweisbar sind; ihre durchschnittliche Diagnoseleistung bei der Diagnose von PR liegt bei einer Spezifität von etwa 90% bei einer Sensitivität von 70%.

– die als "Anti-Keratin"-Antikörper (AKA) bezeichneten Antikörper, bei denen es sich um zirkulierende Immunglobuline G handelt, die durch Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten von Ratten-Ösophagus nachweisbar sind. Diese Antikörper sind sehr spezifisch für rheumatoide Polyarthrit, und ihre durchschnittliche Diagnoseleistung liegt bei einer Spezifität von 98% bei einer Sensitivität von etwa 50%.

[0004] Die früheren Arbeiten des Erfinderteams haben zur Charakterisierung der von diesen Antikörpern erkannten Antigene geführt und ermöglichten es so zu zeigen, daß sie tatsächlich ein- und dieselbe Familie von Autoantikörpern darstellen und daß sie gegen verschiedene molekulare Formen der Familie der (Pro)filaggrine gerichtet waren (für einen Review siehe beispielsweise SERRE et VINCENT, in: Autoantibodies, PETER und SHOENFELD Hrsg., Elsevier Science Publishers, 271–276, 1996). Diese Antikörper wurden als Anti-Filaggrin-Autoantikörper (AAF) bezeichnet. Die Patentanmeldung EP 0 511 116 beschreibt die Reinigung und die Charakterisierung von Antigenen der Familie der Filaggrine, die von diesen Antikörpern erkannt werden, und ihre Verwendung zur Diagnose von rheumatoider Polyarthrit.

[0005] Bei ihren folgenden Arbeiten haben die Erfinder gezeigt, daß sich die von diesen Antikörpern erkannten Epitope auf Regionen des Filaggrinmoleküls befinden, in denen die Arginine wenigstens zum Teil desiminiert und so in Citrullin transformiert waren; sie haben also die wesentlichen immunreaktiven Regionen identifiziert und haben anschließend ausgehend von diesen Peptide erhalten, die Epitope tragen, die einen Citrullinrest beinhalten und die spezifisch von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern erkannt werden. Diese Peptide und ihre Verwendung zur Diagnose von PR sind Gegenstand der Patentanmeldung FR 96 10651 im Namen von BIOMERIEUX, eingereicht am 30. August 1996, und der Patentanmeldung PCT/FR 97/01541 im Namen von BIOMERIEUX, eingereicht am 1. September 1997. Die Entdeckungen der Erfinder betreffend die Rolle von Citrullinresten bei der Reaktivität des Filaggrins mit den für PR spezifischen Autoantikörpern wurden später durch andere Forscher bestätigt [SCHELLEKENS et al., Arthritis Rheum., 40, Supplement Nr. 9, S. 5276, Zusammenfassung 1471 (1997); VISSER et al., Arthritis Rheum., 40, Supplement Nr. 9, S. S289, Zusammenfassung 1551 (1997)]. Die Patentanmeldung PCT WO 99/28344, die ein älteres Recht nach Artikel 54(3) EPÜ darstellt, beschreibt verschiedene Citrullin-haltige Peptide, die von diesen Autoantikörpern erkannt werden.

[0006] Die Erfinder haben nun die Rolle untersucht, die die Immunreaktion gegen diese Citrullin-haltigen Epitope bei der Genese von PR spielt.

[0007] Zu diesem Zweck haben sie das Verhältnis zwischen den spezifisch gegen diese Epitope gerichteten Anti-Filaggrin-Autoantikörpern der Klasse G und den gesamten IgG im Serum und in den rheumatoiden Geweben verglichen und haben gefunden, daß dieses Verhältnis bei den interstitiellen Immunglobulinen des rheumatoiden Gewebes etwa 10mal höher war als bei den Serum-Immunglobulinen. Sie haben weiterhin gezeigt, daß in den rheumatoiden Geweben eine lokalisierte Synthese dieser Anti-Filaggrin-Autoantikörper der Klasse G durch spezifische Plasmazyten in diesen Geweben erfolgte.

[0008] Diese Ergebnisse zeigen, daß auf der Ebene der rheumatoiden Gewebe eine lokale Autoimmunreaktion stattfindet, die gegen Citrullin-haltige Epitope ähnlich denen gerichtet ist, die von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern erkannt werden und von denen diese Autoantikörper eine der Komponenten darstellen. Diese Reaktion humoraler und/oder zellulärer Natur könnte an der rheumatoiden Physiopathogenese beteiligt sein.

[0009] Diese Beobachtungen legen es nahe, Moleküle, die die Citrullin-haltigen Epitope tragen, die von diesen Anti-Filaggrin-Autoantikörpern erkannt werden, dazu zu verwenden, um diese Autoimmunreaktion zu neutralisieren, und insbesondere, um die Bindung an ihr Antigen-Target der rheumatoiden Geweben, der humoralen oder zellulären Effektoren dieser Autoimmunreaktion, zu inhibieren.

[0010] Eine solche in vivo-Neutralisation dieser Autoimmunreaktion kann zur Behandlung von PR oder anderen Erkrankungen beitragen, bei denen Läsionen eine Rolle spielen, die durch eine Immunreaktion induziert sind, die gegen Citrullin-haltige Epitope gerichtet ist, die Kreuzreaktionen mit denjenigen zeigen, die von den Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannten werden.

[0011] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Peptidantigens, das spezifisch von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern im Serum von Patienten mit rheumatoider Polyarthrit erkannt wird, das aus einem Peptid besteht, das sich ganz oder teilweise von der Sequenz einer Filaggrin-Einheit ableitet, in der

wenigstens ein Argininrest durch einen Citrullinrest substituiert wurde, und das wenigstens ein Tripeptid-Motiv Ser-Cit-His umfaßt, in dem Cit einen Citrullinrest bedeutet, zur Herstellung eines Inhibitormedikaments zur Behandlung einer Pathologie, die eine Autoimmunreaktion gegenüber Citrullin-haltigen Epitopen umfaßt, die von diesen Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannt werden, ausgenommen die Verwendung einer Peptidsequenz:

Gln Gly Ser Cit His Gln Gln Ala Arg

und von Peptiden, die diese Sequenz enthalten, abgeleitet von einem der folgenden Peptide:

- Gly Gly Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly Ser;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro Gly Ser Ser;

die in der Patentanmeldung PCT WO 99/28344 beschrieben sind.

[0012] Im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man unter:

- "Sequenz einer Filaggrin-Einheit" die Sequenz des Translationsprodukts irgendeiner der Untereinheiten des Gens für das humane Profilaggrin oder für das einer anderen Spezies von Lebewesen, das für eine Filaggrin-domäne codiert, oder auch eine theoretische Konsensussequenz, erhalten ausgehend von den Sequenzen der Filaggrindomänen;

- "Peptid, das sich ganz oder teilweise von der Sequenz einer Filaggrin-Einheit ableitet"

a) jedes Polypeptid oder Oligopeptid, das diese gesamte Sequenz oder ein Fragment von dieser umfaßt und das wenigstens einen Citrullinrest umfaßt; es kann sich beispielsweise um ein Proteolysefragment des (Pro)filaggrins oder auch um ein synthetisches oder rekombinantes Peptid handeln;

b) jedes Peptid, das aus der Modifikation eines wie oben unter a) definierten Peptids resultiert, unter der Bedingung, daß diese Modifikation das spezifische Reaktionsverhalten mit den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern nicht beeinträchtigt.

[0013] Modifizierte Peptide, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind beispielsweise Mimotope von Peptiden, wie sie oben unter a) definiert sind.

[0014] Vorteilhaft werden zur Verabreichung in vivo Peptide eingesetzt, die so modifiziert sind, daß ihre Lebensdauer im Organismus verlängert wird, insbesondere indem ihre Resistenz gegen Proteasen verbessert wird; es kann sich beispielsweise um Pseudopeptide vom retro-Typ handeln, in denen L-Aminosäuren in einer Reihenfolge invers zu der des nachzumachenden Peptids miteinander verknüpft sind, oder auch um Pseudopeptide vom retro-inverso-Typ, die aus D-Aminosäuren (anstelle der L-Aminosäuren der natürlichen Peptide) bestehen, die in einer Reihenfolge invers zu der des nachzumachenden Peptids miteinander verknüpft sind, oder auch um Pseudopeptide, die eine CH<sub>2</sub>-NH-Bindung anstelle einer CO-NH-Peptidbindung enthalten. Diese Pseudopeptide erlauben es, die dreidimensionale Struktur natürlicher Peptide und demzufolge ihre immunologische Reaktivität zu imitieren. Pseudopeptide dieser verschiedenen Typen sind beispielsweise bei BENKIRANE et al. [J. Biol. Chem., 270, S. 11921-11926, (1995); J. Biol. Chem., 271, S. 33218-33224, (1996)]; BRIAND et al. [J. Biol. Chem., 270, S. 20686-20691, (1995); GUICHARD et al. [J. Biol. Chem., 270, S. 26057-26059, (1995)] beschrieben.

- "Molekül mit derselben Erkennungsspezifität wie die Anti-Filaggrin-Autoantikörper": jedes Molekül (Antikörper oder zellulärer Rezeptor), das die Eigenschaft besitzt, spezifisch, in vivo oder in vitro, an die von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern erkannten Epitope zu binden.

[0015] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verwendet man wenigstens ein Citrullin-haltiges Peptid, das ganz oder teilweise wenigstens eine Sequenz umfaßt, die sich von einer der folgenden Regionen einer humanen Filaggrin-Einheit ableitet:

- der Region, die dem C-terminalen Teil (Aminosäuren 144 bis 324) und insbesondere den Aminosäuren 144 bis 314 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht, oder
- der Region, die den Aminosäuren 76 bis 144 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht, oder

– der Region, die den Aminosäuren 71 bis 119 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht.

[0016] Diese Regionen wurden bereits früher als Regionen identifiziert, die nach Citrullinierung gegenüber Anti-Filaggrin-Autoantikörpern stark immunreaktiv sind (siehe Patentanmeldung FR 96 10651 und Patentanmeldung PCT/FR97/01541, wie oben erwähnt).

[0017] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verwendet man wenigstens ein Citrullinhaltiges Peptid, das umfaßt:

a) wenigstens eine Citrullin-haltige Sequenz, die das Motiv Ser-Cit-His umfaßt, abgeleitet von einer der im nachfolgenden Sequenzprotokoll unter den Nummern SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenzen, oder

b) wenigstens ein Fragment, das das Motiv Ser-Cit-His umfaßt und das wenigstens 3, vorzugsweise wenigstens 5 und vorteilhaft wenigstens 10 aufeinanderfolgende Aminosäuren dieser Sequenz umfaßt.

[0018] Peptide, die erfindungsgemäß verwendet werden können, um eine Immunreaktion gegenüber Citrullin-haltigen Epitopen, die von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern erkannt werden, abzuschwächen oder zu neutralisieren, indem sie die Bindung an ihr Antigen-Target, humorale oder zelluläre Effektoren dieser Autoimmunreaktion, reduzieren oder inhibieren, sind vorteilhaft Peptide, die sich, durch Citrullinierung, von Peptiden ableiten, die das Pentapeptid-Motiv X1-Ser-Arg-His-X2 umfassen, in dem X1=Ser oder Gly und X2=Ser oder Pro, und darunter wiederum Peptide, die das Hexapeptid-Motiv X0-X1-Ser-Arg-His-X2 oder das Heptapeptid-Motiv X0-X1-Ser-Arg-His-X2-X3 umfassen, in denen X1 und X2 wie oben definiert sind, X0=Asp und X3=Gly oder Arg.

[0019] Zur Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet man ein Peptid, das wenigstens 5 Aminosäuren, vorzugsweise wenigstens 10 Aminosäuren und vorteilhaft wenigstens 14 Aminosäuren umfaßt. Vorteilhaft kann man auch Peptide verwenden, die mehrere wie oben definierte Citrullin-haltige Sequenzen umfassen, die gleich oder voneinander verschieden sein können.

[0020] Die vorliegende Erfindung umfaßt ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, insbesondere zur Behandlung von rheumatoider Polyarthrit, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie als Wirkstoff wenigstens ein wie oben definiertes antigenes Peptid enthalten.

[0021] Erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen können auf jede an sich bekannte geeignete Weise verabreicht werden. Sie können beispielsweise systemisch, auf oralem oder parenteralem Weg, als subkutane, intravenöse oder intramuskuläre Injektion verabreicht werden. Sie können auch lokal verabreicht werden, beispielsweise durch intraartikuläre Injektionen oder durch Mikroinjektionen unter Arthroskopie in das inflammatorische Synovialgewebe.

[0022] Die vorliegende Erfindung läßt sich mit Hilfe der folgenden ergänzenden Beschreibung besser verstehen, die sich auf Beispiele bezieht, die die Akkumulation von Anti-Filaggrin-Autoantikörpern der Klasse G in rheumatoiden Geweben und die Synthese dieser Autoantikörper durch die Plasmazyten in diesen Geweben demonstrieren.

#### BEISPIEL 1: VERGLEICH DER ANTI-FILAGGRIN-ANTIKÖRPER (AAF)-KONZENTRATIONEN IM SERUM UND IN DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT VON PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER POLYARTHRTIS.

[0023] Probenpaare von Serum und Synovialflüssigkeit wurden von 31 erwachsenen Patienten mit rheumatoider Polyarthrit erhalten, die nach den klinischen, radiographischen und biologischen Kriterien der AMERICAN RHEUMATISM ASSOCIATION (ARA) (ARNETT AR 31 315–324 1988) diagnostiziert war. Die Proben der Synovialflüssigkeiten wurden aus den entzündeten Gelenken entnommen und dann zentrifugiert und bei –80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

[0024] Die Konzentrationen an gesamtem IgG und an AAF in den Seren und den Synovialflüssigkeiten wurden gemäß den folgenden Vorschriften mittels Sandwich-ELISA bestimmt:

#### Messung von gesamtem IgG

[0025] Die Vertiefungen von Mikrotiterplatten (NUNC IMMUNOPLATE MAXISORP) wurden eine Nacht lang bei 4°C mit 100 µl Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, gereinigt über Affinitätschromatographie (BIOSYS), in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS inkubiert.

[0026] Die mit Ziegenantikörpern beschichteten Vertiefungen wurden direkt mit 100 µl einer Verdünnungsreihe von Serum (Verdünnung von 1/400 bis 1/1600) oder von Synovialflüssigkeit (Verdünnung von 1/100 bis 1/10000) und anschließend mit 100 µl von mit Peroxydase markiertem Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper inkubiert und auf 1/5000 verdünnt. Zur Quantifizierung der Messungen wurde als Eichskala auf jeder ELISA-Platte eine Verdünnungsskala (von 500 bis zu 7,8 ng/ml) mit gereinigten humanen IgGs (JACKSON IMMUNORESEARCH LABORATORIES, West Grove, PE) verwendet.

[0027] Alle Inkubationen erfolgten eine Stunde lang bei 37°C und es folgten 3 Waschschritte. Der Puffer zum verdünnen und Waschen ist PBS, enthaltend 0,5% (W/V) Fischgelatine und 0,05 (V/V) Tween-20. Die Peroxydase-Aktivität wurde mit einer chromogenen Lösung aus O-Phenylendiamin (2 mg/ml, SIGMA)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03%, SIGMA) festgestellt.

[0028] Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, und die optische Dichte bei 492 nm wird mit einem MULTISCAN RC-Plattenlesegerät (LABSYSTEM, Helsinki, Finnland) bestimmt.

#### Bestimmung von Anti-Filaggrin-Autoantikörpern

##### ELISA-Test auf neutral/saures humanes Filaggrin.

[0029] Die Vertiefungen von Mikrotiterplatten (NUNC IMMUNOPLATE MAXISORP, LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, UK) wurden mit neutral/saurem humanen Filaggrin durch eine Nacht Inkubation bei 4°C mit 100 µl einer Lösung von neutral/saurem humanen Filaggrin à 2,5 mg/ml in PBS beschichtet. Diese Vertiefungen wurden anschließend 30 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl einer Lösung behandelt, die 2,5% (W/V) Fischgelatine (SIGMA), 0,05% (V/V) Tween-20 (PIERCE) in PBS enthielt. Jede der mit Filaggrin beschichteten Vertiefungen wurde mit 100 µl einer Serumverdünnung (1/400 bis 1/1600) oder einer Verdünnung von Synovialflüssigkeit (1/100 bis 1/1600) und dann mit 100 µl Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, der mit Peroxydase (SOUTHERN BIOTECHN INC., Birmingham, AL) markiert und auf 1/2000 verdünnt war, inkubiert.

[0030] Die Inkubationszeiten, die eingesetzten Puffer und das Detektionssystem sind mit den oben im Fall des ELISA auf Gesamt-IgG angegebenen identisch.

[0031] Um die Anti-Filaggrin-Antikörper zu quantifizieren, wurde ein Pool verwendet, der 13 PR-Seren mit erhöhten Titern für Anti-Filaggrin-Antikörper vereinigte, die zuvor durch Immunfluoreszenz und Immuntransfer bestimmt worden waren. Dieser Pool wurde bezüglich gereinigter Anti-Filaggrin-Antikörper kalibriert. Die Immunreaktivität des Pools war äquivalent zu einer Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentration von 1600 µg/ml. Eine serielle Verdünnungsreihe (1/100 bis 1/12800) dieses Pools, entsprechend Konzentrationen von 0,125 bis 16 µg Anti-Filaggrin-Antikörper pro ml, wurde auf jeder ELISA-Platte als Eichskala für die auf derselben Platte analysierten Proben verwendet. Die Eichkurve wurde mittels Log/Logit linearisiert und zur Umrechnung der optischen Dichten der Proben in Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentrationen verwendet. Eine unter eine Konzentration von 0,125 µg/ml verdünnte Probe (niedrigster Punkt der Eichkurve) wurde als Null angesehen, und für eine Konzentration oberhalb von 4 µg/ml wurde der Analyt erneut bei einer höheren Verdünnung getestet. Ein PR-Kontrollserum wurde ebenfalls auf jede ELISA-Platte gegeben, um die Inter-Assay-Variabilität abzuschätzen. Alle Messungen erfolgten wenigstens zweifach.

#### Ergebnisse

[0032] Die Ergebnisse sind in **Fig. 1** dargestellt (**Fig. 1A**: IgG; **Fig. 1B**: AAF), die zeigt, daß die Konzentration an Gesamt-IgG im Serum bei allen Patienten höher ist ( $14,2 \pm 0,7$  mg/ml) als in der Synovialflüssigkeit ( $8,9 \pm 0,8$  mg/ml). Der Wert für das Verhältnis der Gesamt-IgG-Konzentration im Serum im Verhältnis zur Synovialflüssigkeit für einen gegebenen Patienten variiert zwischen 1 und 3.

[0033] Um einen akzeptablen Vergleich zu erhalten, wurde die Konzentration an Anti-Filaggrin-Antikörpern in der Synovialflüssigkeit eines jeden Patienten ausgewertet, indem das Verhältnis der Gesamtkonzentration an IgG in der Synovialflüssigkeit zur Gesamtkonzentration an IgG im Serum desselben Patienten berücksichtigt wurde. Die Ergebnisse der Serum/Synovialflüssigkeit-Paare wurden verglichen und als verschieden angesehen, wenn die Immunreaktivität der Anti-Filaggrin-Antikörper in der Synovialflüssigkeit 2mal höher oder 2mal niedriger als im Serum war.

[0034] Unter diesen Bedingungen waren die Konzentrationen von Anti-Filaggrin-Antikörpern im Serum und in der Synovialflüssigkeit von allen außer von 3 Patienten ähnlich oder lagen sehr nahe beieinander. Für diese 3 Patienten waren die Konzentrationen an Anti-Filaggrin-Antikörpern in der Synovialflüssigkeit signifikant (4- bis 16mal) niedriger als im Serum. Dennoch sind die Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentrationen im Serum und in der Synovialflüssigkeit im Ergebnisdurchschnitt nicht signifikant verschieden. Dies zeigt, daß der Anteil an IgGs, die für das Filaggrin spezifisch sind, in der Synovialflüssigkeit nicht bedeutender ist als im Serum.

#### BEISPIEL 2: VERGLEICH DER ANTI-FILAGGRIN-ANTIKÖRPER-KONZENTRATIONEN IM SERUM UND IM SYNOVIALGEWEBE VON PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER POLYARTHRITIS

[0035] Verletztes Synovialgewebe wurde während chirurgischer Eingriffe bei 4 Patienten mit rheumatoider Polyarthrititis als Probe entnommen und von der Kapsel und dem Gelenkknorpel abgetrennt. Ein Extrakt dieses Gewebes wurde wie folgt hergestellt:

[0036] Fragmente von Synovialgewebe wurden 20 bis 30 Sekunden lang bei 0°C mit einem ULTRA-TUR-

RAX-Homogenisator (JANKE & KUNKEL, Staufen, Deutschland) bei höchster Geschwindigkeit in 3 ml des folgenden Puffers pro g Gewebe homogenisiert (5 Homogenisierungsdurchgänge): 40 mM Tris-HCl, pH 7,4, enthaltend 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,02 Natriumnitrat, 2 µg/ml Aprotinin (SIGMA) und 1 mM PMSF.

[0037] Nach jeder Extraktion wurden die Homogenate bei 4°C 20 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert, und die Überstände wurden entnommen und dann bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Coomassie Plus-Tests (PIERCE CHEMICALS, Rockford, IL) bestimmt.

[0038] Die Konzentrationen an Gesamt-IgG und an Anti-Filaggrin-Antikörpern des für jeden der 4 Patienten erhaltenen Synovialgewebe-Extrakts wurden wie oben in Beispiel 1 beschrieben mittels ELISA bestimmt. Der Synovialgewebe-Extrakt wurde zur Bestimmung der gesamten IgGs in einer Verdünnung von 1/400 bis 1/32000 und zur Bestimmung der Anti-Filaggrin-Antikörper in einer Verdünnung von 1/2 bis 1/20 verwendet.

[0039] Diese Konzentrationen an Gesamt-IgG und an Anti-Filaggrin-Antikörpern wurden mit denen verglichen, die in den Seren der gleichen Patienten bestimmt wurden.

[0040] Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle I dargestellt.

TABELLE I

Patient	Serum			Synovialextrakt			Relativer Anteil an AAF
	IgG (mg/ml)	AAF (µg/ml)	AAF/IgG (%)	IgG (mg/g)	AAF (µg/g)	AAF/IgG (%)	
1	10,5	33,5	0,32	1,5	53,2	3,65	11,5
2	10,8	41,3	0,38	1,2	28,6	2,36	6,1
3	5,6	42,3	0,76	2,4	67,7	2,85	3,7
4	14,6	90,0	0,62	4,7	256,2	5,39	8,7
Mittelwert	10,4±1,9	51,8±12,9	0,52±0,10	2,4±0,8	101,4±52,2	3,56±0,67	7,5±1,7

[0041] Diese Ergebnisse zeigen, daß die mittlere Gesamt-IgG-Konzentration in den Seren  $10,4 \pm 1,9$  mg/ml beträgt, was einem normalen physiologischen Wert für die IgG-Serumkonzentration entspricht, mit Ausnahme eines einzigen Patienten (Patient 3), der eine niedrige Gesamt-IgG-Serumkonzentration aufwies (5,6 mg/ml). Die mittlere Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentration beträgt  $51,8 \pm 12,9$  µg/ml. Die Anti-Filaggrin-Antikörper entsprechen also im Durchschnitt  $0,52 \pm 0,1\%$  des Gesamt-IgG, wobei der Patient 3 wenig von diesem Durchschnitt abweicht.

[0042] In den Synovialextrakten werden die Antikörperkonzentrationen in mg Gesamt-IgG oder in µg Anti-Filaggrin-Antikörper pro Gramm Synovialgewebe ausgedrückt. Die mittlere synoviale Gesamt-IgG-Konzentration ist 5mal niedriger als die, die in den Seren gemessen wurde ( $2,4 \pm 0,8$  mg/g). Dagegen ist die mittlere Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentration im Synovialgewebe zweimal höher als die, die in den Seren gemessen wurde:  $101,4 \pm 52,2$  µg/g. Folglich beträgt das durchschnittliche Verhältnis von AAF/IgG im Synovialgewebe  $3,56 \pm 0,67\%$  gegenüber  $0,52 \pm 0,10$  im Serum.

[0043] Es ist also möglich, den relativen durchschnittlichen Anteil an Anti-Filaggrin-Antikörpern im Synovialgewebe zu berechnen, der gleich dem Verhältnis der 2 Verhältnisse von AAF/IgG in den Synovialextrakten bzw. im Serum ist. Dieser relative durchschnittliche Anteil an AAF beträgt  $7,5 \pm 1,7\%$ . Anders ausgedrückt ist die durchschnittliche Menge an Anti-Filaggrin-Antikörpern im Synovialgewebe für die 4 Patienten  $7 \frac{1}{2}$  mal größer als die Menge, die im Serum gemessen wurde.

### BEISPIEL 3: HISTOLOGISCHER NACHWEIS VON PLASMOZYTEN IM SYNOVIALGEWEBE

[0044] Es wurden  $5 \text{ mm}^3$ -Proben von Synovialgewebe hergestellt und 24 Stunden lang bei Umgebungstemperatur in einer 10% Formol-Salzlösung fixiert. Diese Fragmente wurden anschließend in Alkohol entwässert und in Paraffin eingelegt. Es wurden Schnitte von 4 Mikron Dicke hergestellt und in Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Diese gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop untersucht.

[0045] Diese Untersuchung machte eine Hyperplasie der Umgrenzungsschicht der Synovia und eine bedeutende Infiltration mit mononukleären, in nodulären Aggregaten um germinale Zentren angeordneten Zellen (lymphoide Follikel) deutlich. Die Plasmazyten wurden durch ihren exzentrischen Kern identifiziert, der ein

Chromatincluster enthielt und von abundantem Zytoplasma umgeben war. Der größte Teil der Zellen war in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße lokalisiert sowie mit Synovialzellen der Umgrenzung vermischt und kapselte die lymphoiden Follikel ein. Die Plasmazyten scheinen der in den mononukleären Infiltraten der Synovialzotten vorherrschende Zelltyp zu sein, und sie machen in den meisten untersuchten Proben einen signifikanten Teil der mononukleären Zellpopulation aus. Die Zahl der mononukleären Zellen pro untersuchtem Feld variiert zwischen 580 und 560 und die der Plasmazyten zwischen 68 und 280; diese letzteren machen also etwa 10 bis 50% der Gesamtpopulation der mononukleären Zellen aus.

#### Immunfluoreszenzuntersuchung

[0046] Proben von Synovialgewebe wurden auch zur Immunfluoreszenzuntersuchung präpariert. Gewebefragmente, eingefroren in Isopentan, das zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühlt war, wurden bis zur Untersuchung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die eingefrorenen Fragmente wurden in TISSUE-TEK-Medium (REICHERT-JUNG, Heidelberg, Deutschland) eingebracht und in einem Kryostaten wurden Schnitte mit 4 Mikron Dicke hergestellt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden 10 Minuten lang an der Luft getrocknet und bis zur immunhistochemischen Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

[0047] Zur Immunfluoreszenz wurden die Schnitte zunächst 15 Minuten in PBS hydratisiert, dann 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtekammer mit einer 1/50-Verdünnung von Ziege-Fab-Fragmenten in PBS inkubiert, die gegen die schwere  $\gamma$ -Kette der humanen IgGs gerichtet waren und mit Fluorescein markiert waren. Nach Spülen in PBS, das 0,05% TWEEN-20 enthielt, und anschließendem Spülen in PBS allein werden die Objektträger mit FLUOPREP-Milieu (BIOMERIEUX, Lyon, Frankreich) montiert. Die mikroskopische Untersuchung mit Ultraviolett-Auflicht zeigt eine intensive Fluoreszenz des Synovialgewebeverbands, die die Anwesenheit der interstitiellen IgGs widerspiegelt, die dieses infiltrieren.

#### BEISPIEL 4: IN VITRO-SYNTHESE UND -SEKRETION VON ANTI-FILAGGRIN-ANTIKÖRPERN DURCH DIE SYNOVIALEN PLASMOZYTEN

[0048] Um festzustellen, ob von den synovialen Plasmazyten Anti-Filaggrin-Antikörper produziert worden waren, wurden Synovialgewebekulturen von Patienten mit rheumatoider Polyarthrititis wie folgt durchgeführt: Das frische Synovialgewebe wurde in kleine Fragmente mit etwa 1 bis 2 mm Durchmesser geteilt, die unverzüglich auf Kulturplatten mit 24 Vertiefungen transferiert (ein Fragment pro Vertiefung) und mit 2 ml RPMI 1640-GLUTAMAX aufgefüllt wurden, das mit 10% fötalem Kälberserum und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin (LIFE TECHNOLOGIES) supplementiert war.

[0049] Die Kulturplatten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter einer Atmosphäre von 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Feuchtigkeit inkubiert.

[0050] Um die in vitro-Produktion der gesamten IgGs und der Anti-Filaggrin-Antikörper zu bestimmen, wurde das Synovialgewebe 34 Tage lang in Kultur gehalten. Das gesamte Kulturmedium wurde am 1. Tag, am 6. Tag, am 13. Tag, am 20. Tag und am 27. Tag der Kultivierung ausgetauscht. Die entsprechenden Kulturüberstände wurden bis zur Analyse bei  $-30^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

[0051] Die Gesamt-IgG- und die Anti-Filaggrin-Antikörper-Konzentration in diesen Kulturüberständen wurde wie oben in Beispiel 1 beschrieben mittels ELISA bestimmt. Die Kulturüberstände wurden zur Bestimmung des Gesamt-IgG in einer Verdünnung von 1/100 und zur Bestimmung der Anti-Filaggrin-Antikörper in einer Verdünnung von 1/10 eingesetzt.

[0052] Um die Wiederabgabe von Immunglobulinen zu bestimmen, die das Synovialgewebe infiltrieren, wurden Schnitte, die nach 24 Stunden Kultur hergestellt worden waren, wie oben in Beispiel 4 beschrieben präpariert und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Fluoreszenz des Synovialgewebeverbands war verschwunden, was eine Wiederabgabe der Immunglobuline, die ihn infiltrierten, erkennen läßt; dafür beobachtet man Zellen mit plasmazytärer Morphologie, die in Clustern gruppiert sind und eine intrazytoplasmatische Fluoreszenz zeigen, die von ihrer plasmazytären Natur zeugt, und Produktion von Immunglobulinen durch diesen Zellen.

[0053] Insofern zeigen diese Immunfluoreszenzuntersuchungen, daß die während des 1. Tags der Kultivierung abgegebenen IgGs zum größten Teil den das Gewebe infiltrierenden Antikörpern entsprechen, wobei die Konzentration an Anti-Filaggrin-Antikörpern und an IgG, die in den Kulturüberständen von Tag 0 und von Tag 1 gemessen wurden, zur Berechnung der kumulierten Konzentrationen, die während der gesamten Dauer der Kultivierung produziert wurden, nicht berücksichtigt wurden.

[0054] Die Konzentrationen von Anti-Filaggrin-Antikörpern oder von IgG, die für den Patienten Nr. 3 bestimmt wurden, sind in **Fig. 2** dargestellt.

[0055] **Fig. 2a** stellt die Konzentrationen von Anti-Filaggrin-Antikörpern (?) und von IgG (?) dar, die in den Kulturüberständen an Tag 0 und an Tag 1 gemessen wurden. Die Anti-Filaggrin-Antikörper entsprechen 2,8% des gesamten IgG im Kulturüberstand der Tage 0 und 1, was den Ergebnissen entspricht, die mit den Synovialge-

webe-Extrakten desselben Patienten erhalten wurden.

[0056] **Fig. 2b** stellt die Konzentrationen an Anti-Filaggrin-Antikörpern (untere Kurve) und an IgG (obere Kurve) dar, die während der Dauer der Kultivierung produziert wurden.

[0057] Man stellt fest, daß die Produktion der IgG und der AAF am 6. Tag niedrig ist, dann ansteigt und am 27. Tag einen Peak erreicht. Dieses Produktionsprofil läßt sich nur mit einer "de novo"-Synthese von IgG erklären, die sich ab dem 27. Tag abschwächt.

[0058] Bei Kulturende machen die Anti-Filaggrin-Antikörper 34% des gesamten IgG aus.

[0059] Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anti-Filaggrin-Antikörper einen sehr hohen Anteil des von dem rheumatoiden Pannus sekretierten Gesamt-IgG ausmachen.

#### BEISPIEL 5: INHIBITORISCHE EIGENSCHAFTEN VON PEPTIDEN, DIE DAS MOTIV SER-CIT-HIS ENTHALTEN, AUF DIE REAKTION VON SEREN VON PATIENTEN MIT PR GEGENÜBER CITRULLIN-HALTIGEN FILAGGRINEN

[0060] Zwei Antigenpräparate, nämlich: rekombinantes, durch Desiminierung citrulliniertes Filaggrin (erhalten nach der in der Patentanmeldung PCT/FR97/01541 beschriebenen Vorschrift) oder ein teilweise gereinigtes Präparat von sauer/neutralen humanem Filaggrin (erhalten nach der bei SIMON et al., J. Clin. Invest., 92, 1387, 1993 beschriebenen Vorschrift) wurden auf ein Elektrophoresegel (PHAST®-SDS-Gel, PHARMACIA) aufgetragen (0,2 µg pro Auftrag); nach Elektrophorese mit einer PHAST-SYSTEM®-Apparatur (PHARMACIA) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit einem Serum (verdünnt auf 1/4000) eines Patienten mit PR und in Gegenwart von 40 µl/ml eines jeden der Peptide E12Hcit und E12Dcit (bzw. Derivaten der Peptide SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3 durch Ersatz des zentralen Arginins des Motivs Ser-Arg-His durch ein Citrullin) oder einer Mischung dieser Peptide inkubiert (1 Nacht, 4°C). Für jedes Antigen wurden 2 Seren mit einem erhöhten Anti-Filaggrin-Antikörper-Titer getestet, die von zwei verschiedenen Patienten stammten.

[0061] Als Kontrolle wurden ferner Inkubationen durchgeführt:

- in Gegenwart eines Citrullin-haltigen Peptids (T12Ecit), das sich von Peptid SEQ ID NO: 4 ableitet, das das Motiv Ser-Arg-His nicht enthält;
- in Abwesenheit jeglicher Peptide.

[0062] Für jeden Assay wurde das Reaktionsprodukt aus den Anti-Filaggrin-Antikörpern des Serums des Patienten und dem auf die Nitrocellulose aufgebrachten Antigen mittels Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörpern, die mit Peroxidase markiert waren, nachgewiesen.

[0063] Die Ergebnisse sind wie folgt:

- Für jedes der zwei getesteten PR-Seren beobachtet man eine starke Markierung, wenn die Inkubation in Abwesenheit von Peptid oder in Gegenwart des Peptids T12Ecit erfolgte. Wenn die Inkubation in Gegenwart des Peptids E12Hcit oder E12Dcit erfolgte, beobachtet man im Fall des einen getesteten Serums nur eine schwache Markierung und im Fall des anderen Serums keine Markierung.

[0064] Wenn die Inkubation überdies in Gegenwart einer Mischung aus den Peptiden E12Dcit und E12Hcit erfolgte, beobachtet man unabhängig vom jeweils betroffenen PR-Serum keine Markierung.

[0065] Die gefundenen Ergebnisse sind für die zwei getesteten Antigene (rekombinantes desiminiertes Filaggrin oder sauer/neutralen Filaggrinpräparat) identisch.

[0066] Diese Ergebnisse zeigen, daß die Peptide E12Dcit und E12Hcit, die das Motiv Ser-Cit-His umfassen, in der Lage sind, die Reaktion der "Anti-Filaggrin"-Antikörper, die im Serum von Patienten mit PR vorliegen, mit den von diesen Antikörpern erkannten Epitopen kompetitiv zu inhibieren.

#### SEQUENZPROTOKOLL

[0067] <110> UNIVERSITE PAUL SABATIER/TOULOUSE III

SERRE, Guy

GIBRAL-NEUHAUSER, Elisabeth

VINCENT, Christian

SIMON, Michel

SEBBAG, Mireille

DALBON, Pascal

JOLIVET-REYNAUD, Colette

ARNAUD, Michel

JOLIVET, Michel

[0068] <120> VERWENDUNG CITRULLIN-HALTIGER PEPTIDE, DIE SICH VON FILAGGRIN ABLEITEN,



## IM RAHMEN DER BEHANDLUNG VON AUTOIMMUN-ERKRANKUNGEN

[0069] &lt;130&gt; MJPcb1249/1

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

[0070] &lt;150&gt; FR9716672

[0071] &lt;151&gt; 1997-12-30

&lt;160&gt; 4

[0072] &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt;

[0073] &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

STGHSGSQHS HTTTQGRSDA SRGSSGSRST SRETRDQEQS GDGSRHSGS

49

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt;

[0074] &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

eqsadssrhs gsgH

14

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt;

[0075] &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

essrdgsrhp rshd

14

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt;

[0076] &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

tgsstggrqg shhe

14

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines Peptidantigens, das spezifisch von den Anti-Filaggrin-Autoantikörpern im Serum von Patienten mit rheumatoider Polyarthrits erkannt wird und aus einem Peptid besteht, das das Tripeptid-Motiv Ser-Cit-His umfaßt, in dem Cit einen Citrullinrest bedeutet, wobei sich das Peptid ganz oder teilweise von der Sequenz einer Filaggrin-Einheit durch Substitution wenigstens eines Argininrests durch einen Citrullinrest ableitet, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Pathologie, die eine Autoimmunreaktion gegenüber Citrullin-haltigen Epitopen umfaßt, die von diesen Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannt werden, ausgenommen die Verwendung eines Peptids mit der Sequenz:

Gln Gly Ser Cit His Gln Gln Ala Arg

und von Peptiden, die diese Sequenz enthalten, abgeleitet von einem der folgenden Peptide:

- Gly Gly Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His  
Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg  
Gly Ser;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His  
Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro  
Gly Ser Ser;

durch Substitution wenigstens eines Argininrests durch einen Citrullinrest.

2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Antigen aus einem Peptid besteht, das ganz oder teilweise wenigstens eine Sequenz umfaßt, die sich

- von der Sequenz, die den Aminosäuren 144 bis 324 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht, oder
- von der Sequenz, die den Aminosäuren 76 bis 144 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht, oder
- von der Sequenz, die den Aminosäuren 71 bis 119 einer humanen Filaggrin-Einheit entspricht, durch Substitution wenigstens eines Argininrests durch einen Citrullinrest ableitet.

3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen aus einem Peptid besteht, das ganz oder teilweise wenigstens eine Sequenz umfaßt, die sich von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 durch Substitution wenigstens eines Argininrests durch einen Citrullinrest ableitet.

4. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid das Pentapeptid-Motiv X1-Ser-Cit-His-X2 umfaßt, in dem Cit einen Citrullinrest bedeutet, X1 einen Serin- oder Glycinrest bedeutet und X2 einen Serin- oder Prolinrest bedeutet.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von rheumatoider Polyarthrit, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Wirkstoff wenigstens ein wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 definiertes antigenes Peptid enthält, ausgenommen die Verwendung eines Peptids der Sequenz:

Gln Gly Ser Cit His Gln Gln Ala Arg

und von Peptiden, die diese Sequenz enthalten, abgeleitet von einem der folgenden Peptide:

- Gly Gly Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His  
Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg  
Gly Ser;
- Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His  
Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro  
Gly Ser Ser;

durch Substitution wenigstens eines Argininrests durch einen Citrullinrest.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

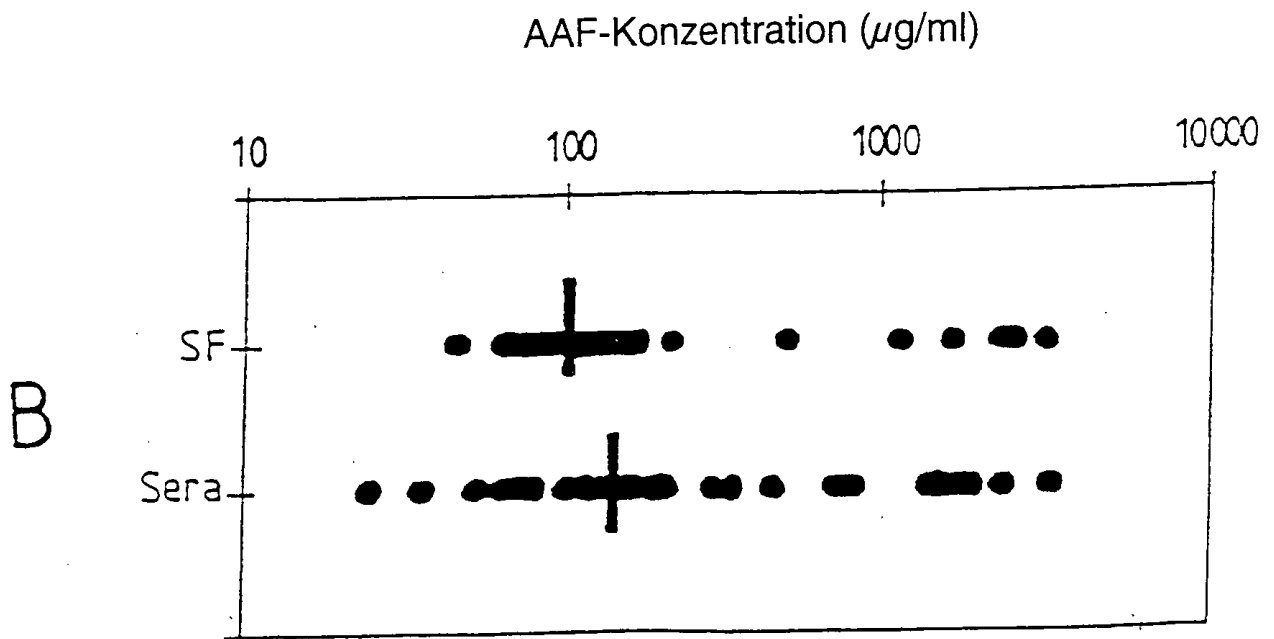
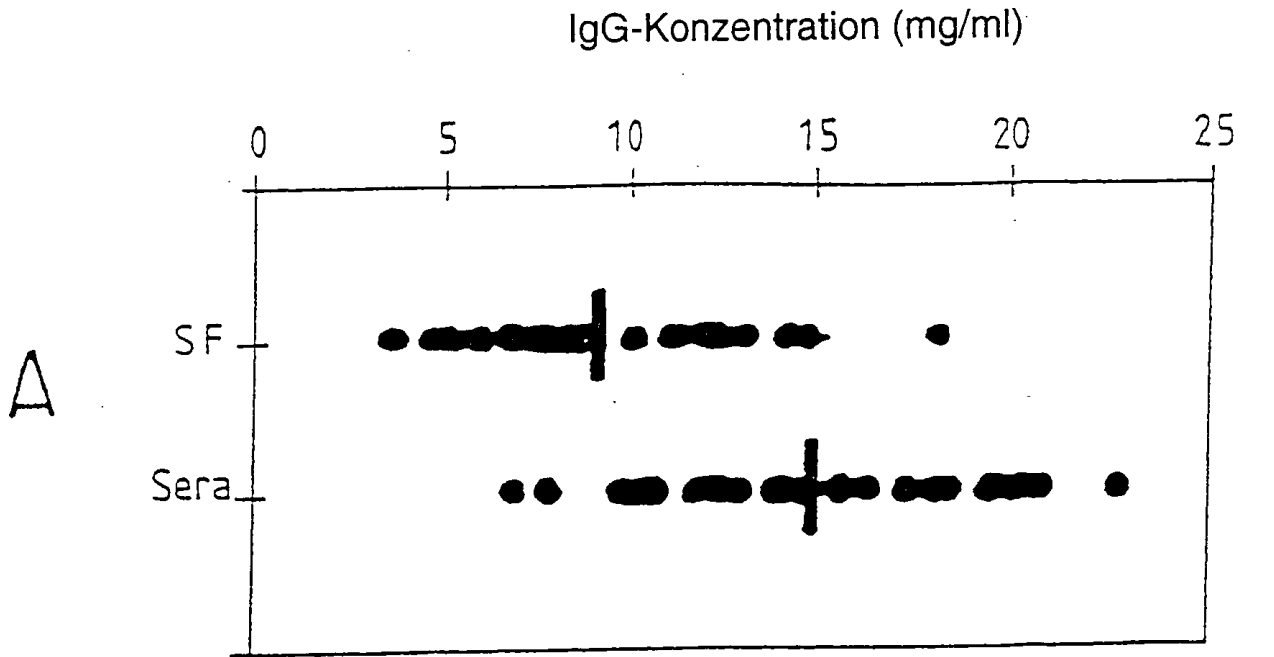


FIG.1

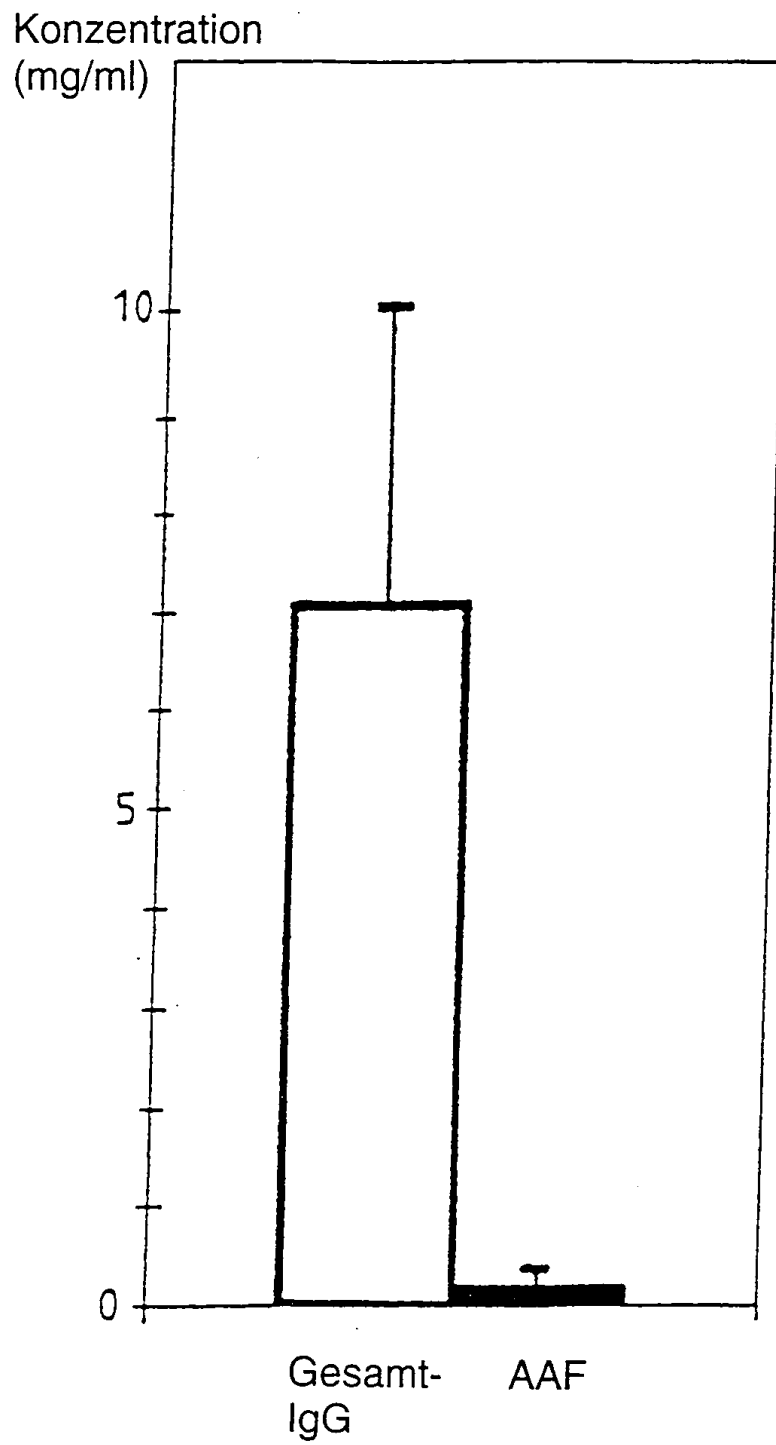


FIG. 2a

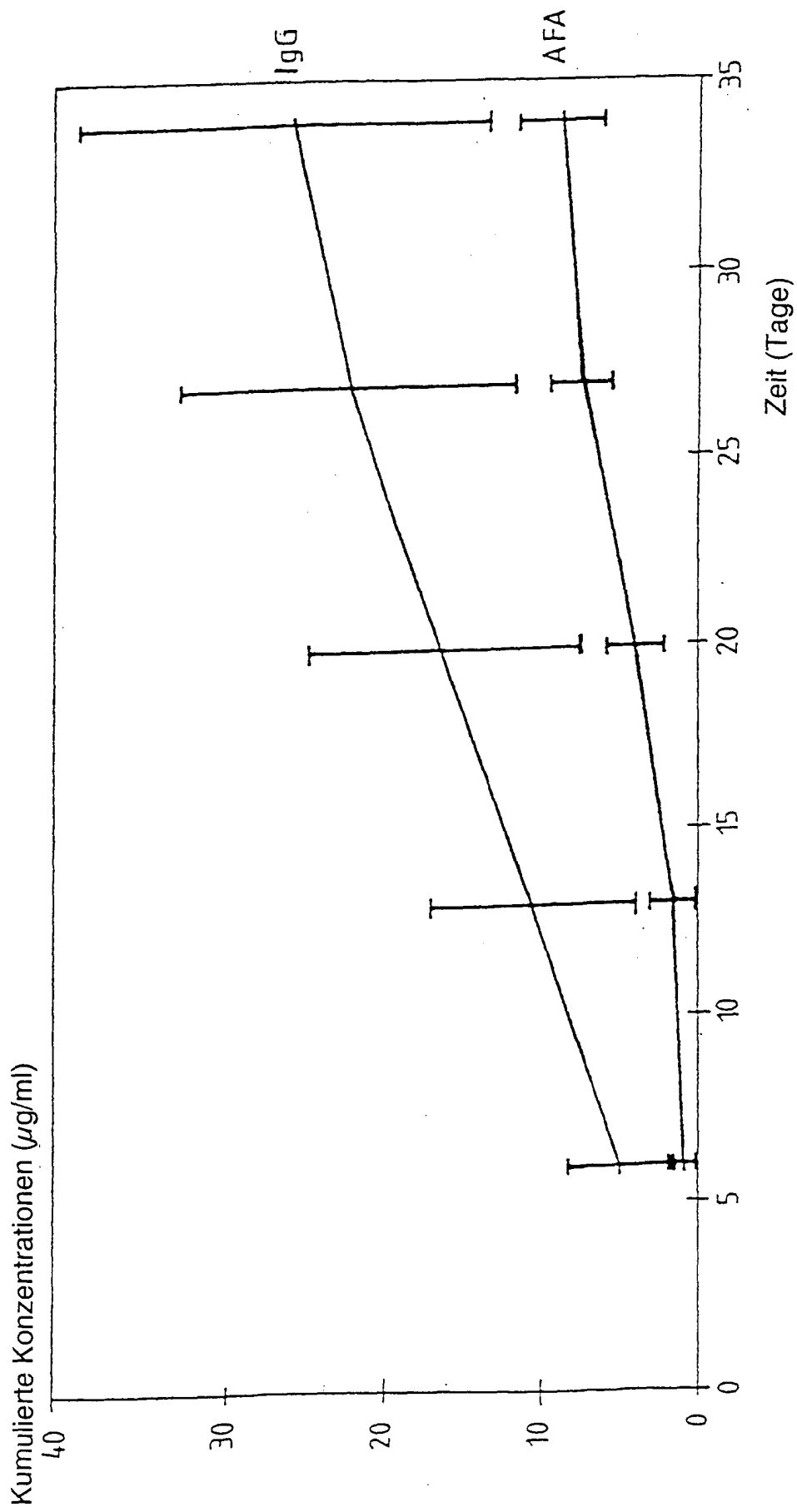


FIG.2b