

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 400**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 17200662 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3301107**

54 Título: **Péptidos novedosos que se unen a tipos del MHC de clase II y su uso en diagnóstico y tratamiento**

30 Prioridad:

05.04.2011 SE 1150297

05.04.2011 US 201161472122 P

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

11.12.2020

73 Titular/es:

CURARA AB (100.0%)

Sälgstigen 4

181 62 Lidingö, SE

72 Inventor/es:

KLARESKOG, LARS y

MALMSTSTRÖM, VIVIANNE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 798 400 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 novedosos que se unen a tipos del MHC de clase II y su uso en diagnóstico y tratamiento

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a péptidos novedosos y su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras formas de artritis.

10 Antecedentes de la técnica

Las enfermedades autoinmunitarias son afecciones patológicas en las que tejidos y sustancias presentes de forma natural en el cuerpo desencadenan una respuesta inmunitaria. Esta reacción inmunitaria indeseada e inadecuada puede ser específica de tejido, específica de órgano o sistémica. La evolución de la enfermedad pasa de síntomas leves a destrucción irreversible de tejidos y/u órganos específicos.

15 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria heterogénea y parcialmente determinada genéticamente, donde se supone que la autoinmunidad desempeña una función patógena importante, pero donde la especificidad de las reacciones autoinmunitarias y los determinantes genéticos de estas reacciones aún se conocen de forma incompleta. Es una enfermedad crónica e incurable que provoca daño irreversible al cartílago articular y al hueso y que conduce a discapacidad física progresiva.

20 El tratamiento y/o alivio de la artritis reumatoide, así como otras enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, se han basado hasta ahora en la manipulación de acontecimientos inmunitarios e inflamatorios sin conocer las bases inmunológicas detalladas de la enfermedad. Estas terapias incluyen terapias antirreumáticas modificadoras de enfermedades tradicionales (DMARD), incluyendo la administración de fármacos tales como metotrexato, sulfasalazina, azatioprina, leflunomida, hidroxicloroquina y ciclosporina. El metotrexato se considera con frecuencia el medicamento de primera elección. Este fármaco está, sin embargo, asociado con efectos secundarios más leves y reversibles, tales como ulceración de la mucosa gastrointestinal y oral, pero también con efectos secundarios más graves, irreversibles, tales como toxicidad hepática.

25 Además de los DMARD, existen nuevas terapias a base de proteínas que afectan la regulación de las citocinas o aspectos generales de la activación y migración de linfocitos T y B. Son ejemplos varios anticuerpos monoclonales y una construcción de receptor que bloquea TNF alfa, agentes bloqueantes de citocinas, tales como anticuerpos contra el receptor de IL-6 (tocilizumab), así como terapias tales como CTLA4Ig (abatacept) y anticuerpos anti-CD20 (rituximab) que influyen en clases completas de linfocitos. Muchas terapias novedosas no se basan en el conocimiento detallado de la especificidad de las reacciones autoinmunitarias en la artritis reumatoide, sino que afectan a las rutas de señalización generales. Una de esas terapias es el inhibidor de Jak-2 tofacitinib, actualmente en desarrollo clínico avanzado. Sin embargo, estas terapias novedosas aún no abordan la reacción autoinmunitaria específica, sino que son tratamientos inespecíficos que afectan a grandes partes corriente abajo del sistema de defensa inmunitario y contra la inflamación, que dan lugar de este modo a riesgos de efectos secundarios provocados por una defensa inmunitaria generalmente suprimida. Dichos efectos secundarios incluyen sensibilidad a las infecciones y respuesta reducida a la vacunación.

40 Las reacciones autoinmunitarias a determinados epítomos de autoantígenos muy probablemente contribuyan al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide. Se han identificado anticuerpos contra las proteínas propias del paciente, en particular contra variantes nativas y/o modificadas postraduccionalmente de determinadas proteínas en pacientes con artritis reumatoide. Se han identificado autoanticuerpos contra colágeno de tipo II (la proteína principal en el cartílago articular), alfa-enolasa (una enzima implicada en la glucólisis) y vimentina (una proteína de filamento intermedio).

45 Estos anticuerpos se dirigen con frecuencia, pero no siempre, hacia variantes citrulinadas de las proteínas. La citrulina es un aminoácido no convencional que resulta de la desiminación de la arginina. La citrulinación del resto de arginina es una modificación postraducciona catalizada por enzimas denominadas peptidilarginina desiminadas (PAD).

50 Anteriormente, se ha descrito el uso de péptidos citrulinados como herramienta de diagnóstico para artritis reumatoide (anti CCP) (documento WO2003/050542). El ensayo de anticuerpos de CCP usa una mezcla de péptidos que no se ha demostrado que aparezcan como autoantígenos naturales (dianas de linfocitos B) en pacientes con artritis reumatoide.

55 Otra referencia, documento WO 2007/017556, describe el uso de determinados péptidos citrulinados y no citrulinados del colágeno de tipo II para el diagnóstico de artritis reumatoide. Asimismo, la detección de un péptido de enolasa citrulinada (cep1) se ha descrito como una herramienta de diagnóstico en artritis reumatoide (documento WO2008/090360). También se han sugerido péptidos citrulinados de la proteína vimentina para el diagnóstico de artritis reumatoide (documento WO2007/123976).

Sin embargo, estos métodos de diagnóstico no proporcionan una imagen completa de la enfermedad en el individuo, ya que moléculas y mecanismos diana adicionales pueden ser importantes para la artritis reumatoide.

Los métodos disponibles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias claramente dejan margen para mejorar. Existe la necesidad de una visión más profunda de la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias, así como para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos. Con particular atención a la artritis reumatoide, existe una gran necesidad médica no satisfecha de mejorar el diagnóstico y el tratamiento. Un problema para definir la artritis reumatoide y sus subconjuntos ha sido la falta de un marcador clínico, de laboratorio o radiológico definido para la enfermedad y sus subconjuntos. Otro problema reside en encontrar un enfoque fiable para la supervisión a corto y largo plazo de la progresión o remisión de la enfermedad. Un problema adicional reside en encontrar tratamientos más específicos y eficaces, minimizando los efectos secundarios habitualmente asociados con DMARD y terapias actualmente disponibles y en desarrollo. Estos problemas, y otros evidentes para una persona experta tras estudiar la presente descripción, se abordarán a continuación.

Definiciones

Como se usa en el presente documento:

"Diagnóstico": se refiere a determinar con respecto a un individuo: si el individuo tiene una enfermedad o no y/o lo grave que es la enfermedad del individuo y/o el pronóstico de la enfermedad del individuo y/o la respuesta esperada al tratamiento del individuo y/o el riesgo de desarrollar la enfermedad, clasificación de la enfermedad, supervisión de la progresión de la enfermedad o los resultados de la intervención.

"Paciente" se refiere a un individuo que tiene una enfermedad o que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad. Por tanto, la enfermedad puede no haberse presentado necesariamente en el individuo para que el individuo se considere un paciente. El mayor riesgo puede detectarse determinando, por ejemplo, el genotipo del paciente.

La "variante" de un péptido se refiere a una variante de un péptido definido que comprende entre 8 y 20 aminoácidos, más preferentemente de entre 9 y 19, aún más preferentemente de entre 13 y 18 aminoácidos y lo más preferentemente entre 14 y 16 aminoácidos, que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 12 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 13 aminoácidos consecutivos, más preferentemente 14 aminoácidos consecutivos están presentes en el péptido definido. Los restos restantes del péptido, si los hay, pueden ser cualquier aminoácido de origen natural.

La "muestra" cuando se usa en relación con células, se refiere a las células originales y también a los descendientes de esas células, ya que las células pueden proliferar durante cultivo *in vitro*.

La "enolasa", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína alfa enolasa humana.

El "aminoácido", cuando se usa en el contexto de un péptido o una proteína, se refiere a resto de aminoácido.

La respuesta inmunitaria está controlada por linfocitos T, donde los linfocitos T activadores, tales como linfocitos T efectores, mejoran la respuesta inmunitaria y los linfocitos T reguladores constituyen uno de varios mecanismos que inhiben la respuesta inmunitaria. Por tanto, la enfermedad autoinmunitaria se controla mediante un equilibrio de estimulación de linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores. Los linfocitos T efectores y linfocitos T reguladores pertenecen a la clase de linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T efectores activados secretan diversas citocinas proinflamatorias tales como interferón gamma, TNF alfa e IL-17 que contribuyen a la inflamación.

Los loci de antígeno leucocitario humano (HLA) codifican los genes para proteínas del MHC de clase II humanas (denominadas en el presente documento "MHC" o "proteína MHC"), que desempeña una función crucial en la regulación del sistema inmunitario. La presentación de péptidos inmunogénicos por moléculas del MHC de clase II en la superficie de células presentadoras de antígenos actúa como señales para linfocitos T que a su vez controlan la reacción inmunitaria y también la progresión de la enfermedad autoinmunitaria al inducir la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos patológicos. Una etapa crucial de la activación de linfocitos T es la unión del receptor de linfocitos T del linfocito T con un complejo que consiste en un péptido antigénico unido al surco de una molécula de proteína del MHC de clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

El sistema de proteínas del MHC está adaptado para unir y presentar diversos péptidos a linfocitos T. Esto es habitualmente beneficioso ya que muchos péptidos diferentes, por ejemplo, de patógenos, pueden ser detectados de este modo por el sistema inmunitario.

Los genotipos de HLA son bien conocidos y se han descrito previamente. La subunidad beta de la proteína del MHC es la subunidad que más contribuye a la diversidad de MHC. De hecho, el locus HLA-DRB1 en el cromosoma 6 que codifica esta subunidad es uno de los más diversos en el ser humano. La mayoría de las diferencias se ubican en el

surco de unión a péptidos de la proteína del MHC.

Sumario de la invención

5 Anteriormente, se han llevado a cabo tratamiento así como diagnóstico de artritis reumatoide sin tener en cuenta la predisposición genética del paciente a la especificidad fina de las reacciones autoinmunitarias habituales de la artritis reumatoide. Ahora, los inventores desvelan métodos de diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide que anuncian la era de la medicina personalizada en la artritis reumatoide. Al usar los péptidos de la invención junto con información del genotipo del paciente, la respuesta inmunitaria particular del paciente individual se puede analizar, supervisar y tratar. En particular, el papel de la presentación de antígenos a linfocitos T en pacientes puede determinarse y supervisarse usando los reactivos de diagnóstico y métodos descritos en el presente documento.

10 Los inventores ponen a disposición péptidos novedosos y sus usos en el diagnóstico, el alivio y el tratamiento de la artritis reumatoide y otras formas de artritis, tales como osteoartritis, artritis psoriásica, espondiloartropatías o policondritis recidivante.

15 Las figuras 1-3 proporcionan datos de experimentos usando los péptidos y se analizan más exhaustivamente a continuación y en la sección de ejemplos.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar terapias novedosas para artritis reumatoide particular y otras formas de artritis, tales como osteoartritis, artritis psoriásica, espondiloartropatías o policondritis recidivante, en particular para pacientes con los genotipos del MHC de clase II HLA-DRB1 0101, HLA-DRB1 0404, HLA-DRB1 0401, HLA-DRB1 0405, HLA-DRB1 0408 y HLA-DRB1 1001.

25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos novedosos para el diagnóstico de artritis reumatoide. En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO 22.

30 El péptido del primer aspecto puede ser capaz de unirse al MHC y puede ser capaz de inducir la unión de un receptor de linfocitos T de un linfocito T y proporcionar una señal al linfocito T que activa el linfocito T.

35 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un complejo de un péptido del primer aspecto y una proteína del MHC de clase II recombinante humana.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido del primer aspecto o un complejo del segundo aspecto.

40 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un ensayo para el análisis de linfocitos T de un paciente, que comprende

- 1) poner en contacto una muestra que comprende linfocitos T obtenidos de un paciente con un péptido del primer aspecto o un complejo del segundo aspecto; y
- 2) detectar la capacidad de los linfocitos T para ser activados por el péptido o complejo.

45 En un quinto aspecto, la invención proporciona un complejo según el segundo aspecto para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis.

50 En un sexto aspecto, la invención proporciona un péptido según el primer aspecto o un complejo según el segundo aspecto para su uso en el diagnóstico de artritis reumatoide u otros tipos de artritis.

55 Se proporciona un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87.

60 El péptido también puede consistir o consistir esencialmente en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87.

En particular, las SEQ ID NO 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 34 son adecuadas.

65 El péptido puede ser un péptido con las SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 31, 36, 45, 46, 47, 48 y las SEQ ID NO 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87 y donde dicho péptido comprende al menos un resto de citrulina.

ES 2 798 400 T3

El péptido puede ser un péptido de enolasa tal como una de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 32, 34, 35 y 36.

- 5 El péptido puede ser un péptido de enolasa citrulinado, tal como una de las SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 36, comprendiendo dicho péptido al menos un resto de citrulina.

El péptido puede tener una secuencia seleccionada de las secuencias de colágeno de tipo II SEQ ID NO 25, 26, 27, 30, 31, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47 y 48.

- 10 El péptido puede consistir en una secuencia citrulinada seleccionada de las secuencias de colágeno de tipo II SEQ ID NO 30, 31, 45, 46, 47 y 48, comprendiendo dicho péptido al menos un resto de citrulina.

- 15 El péptido puede tener una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87.

El péptido puede consistir en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87, comprendiendo dicho péptido al menos un resto de citrulina.

- 20 También se proporciona un péptido o complejo de péptido-MHC según la invención para su uso en el diagnóstico de artritis reumatoide u otros tipos de artritis.

- 25 Además, se proporciona un método para el diagnóstico de artritis reumatoide u otros tipos de artritis. En su forma más general, el método comprende las etapas de: 1) obtener una muestra de linfocitos T de un paciente, 2) poner en contacto la muestra que comprende linfocitos T con un péptido o un complejo de péptido-MHC según la invención, 3) detectar la capacidad de los linfocitos T para ser activados por el péptido o los complejos de péptido-MHC. Esta tercera etapa se puede llevar a cabo detectando un marcador en la muestra de linfocitos T o detectando la unión del péptido o complejo de péptido-MHC a los linfocitos T. Ambas etapas pueden llevarse a cabo.

- 30 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un equipo de herramientas que comprende un péptido según el primer aspecto o un complejo según el segundo aspecto.

- 35 También se proporciona un equipo de herramientas destinado a su uso en diagnóstico, comprendiendo el equipo un complejo peptídico de péptido-MHC según la invención. El equipo puede comprender al menos un recipiente de cultivo celular. Asimismo, el equipo puede proporcionar medios para detectar la expresión de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD4, Foxp3, CD25, TNF alfa, Interferón gamma, IL-17A, IL-17F, CD154, CD69, Ki 67, IL-2, IL-10 e IL-10. En particular, CD4, CD154, IL-17A, IL-17F, interferón gamma y TNF alfa son adecuados. Los medios para detectar la expresión de una proteína pueden ser un anticuerpo contra dicha proteína o un conjunto de cebadores para RT-PCR (PCR en tiempo real).

- 40 Asimismo, se proporciona el uso de un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87, o un complejo de dicho péptido y una proteína del MHC de clase II recombinante humana, para el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis. En particular, el péptido puede consistir en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87. Estos péptidos y variantes de estos péptidos, y complejos de péptido-MHC, también son adecuados para su uso en el método de diagnóstico descrito anteriormente y para su inclusión en el equipo según se ha descrito anteriormente. También se proporciona un complejo de un péptido según la invención y una proteína del MHC de clase II recombinante humana (complejo de péptido-MHC) y dicho complejo para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis. Asimismo, se proporciona un método para el tratamiento de la artritis reumatoide que comprende administrar dicho péptido o complejo de péptido-MHC desvelado en el presente documento a un paciente. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende estos péptidos o péptido-MHC y el uso de estos péptidos y complejos de péptido-MHC para la fabricación de un producto terapéutico.

- 60 Descripción detallada

- 65 En el presente documento se desvelan péptidos novedosos y el uso de estos péptidos de alfa-enolasa humana (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 a SEQ ID NO 24 y SEQ ID NO 32 a SEQ ID NO 36 y SEQ ID NO 14), colágeno humano de tipo II (SEQ ID NO 25, 26, 27, 30 y 31 y SEQ ID NO 37 a SEQ ID NO 48) y vimentina humana (SEQ ID NO 49 a SEQ ID NO 87) que se une a la proteína del MHC de clase II humana asociada con la artritis reumatoide, en particular MHC de clase II de los genotipos HLA-DRB10401, 0404, 0405, 0408, 0101 y 1001.

Los péptidos son capaces de unirse con una alta afinidad a la proteína del MHC de modo que no se desconecten fácilmente de la proteína del MHC una vez unidos. La afinidad es mayor que la afinidad del péptido CLIP por la proteína del MHC (el péptido CLIP es la parte de la cadena invariable de la proteína del MHC que se une al surco de unión a péptido de la proteína del MHC durante el ensamblaje de la proteína del MHC). La velocidad de disociación del péptido es suficiente para que el MHC cargado con péptido pueda estimular linfocitos T *in vitro*, incluso después de varios días de incubación en medios sin péptidos. La unión del péptido CLIP a la molécula del MHC de clase II en comparación con la unión del péptido se puede determinar en ensayos de inhibición y también mediante la presentación de los péptidos relevantes después de suministrar a células presentadoras de antígeno la proteína completa. Se puede determinar una velocidad de disociación aceptable mediante métodos conocidos por una persona experta en la materia, por ejemplo, mediante el uso de ensayos de filtración en gel. Los péptidos se unen en el surco presentador de antígenos de la proteína del MHC, de modo que el complejo de péptido-MHC pueda reconocerse y unirse a un receptor de linfocitos T u otra proteína específica para el péptido o para el complejo de péptido-MHC. Preferentemente, el péptido unido de este modo al receptor de linfocitos T puede proporcionar una señal al linfocito T que activa el linfocito T.

Se desvela en el presente documento un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos, más preferentemente de entre 9 y 19, aún más preferentemente de entre 13 y 18 aminoácidos y lo más preferentemente de 14 a 16 aminoácidos, que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 12 aminoácidos consecutivos, más preferentemente al menos 13 aminoácidos consecutivos, más preferentemente 14 aminoácidos consecutivos y lo más preferentemente 15 restos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13 (SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13); SEQ ID NO 15 a 27 (SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27); y SEQ ID NO 30 a SEQ ID NO 87 (SEQ ID NO 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87), en particular SEQ ID NO 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 34 y 46.

Un péptido de menos de 8 aminoácidos o más de 20 aminoácidos no se une bien a la proteína del MHC. Entre ocho y quince aminoácidos consecutivos del péptido deberían tener una secuencia presente en una de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15 a SEQ ID NO 27 y SEQ ID NO 30 a SEQ ID NO 87. Los restos restantes del péptido, si los hay, pueden ser cualquier aminoácido de origen natural, siempre que el péptido se una a la proteína del MHC y pueda inducir la unión de un receptor de linfocitos T y pueda proporcionar una señal al linfocito T que active el linfocito T como se describe en el presente documento.

El péptido puede consistir en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13 (SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13); SEQ ID NO 15 a 27 (SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27); y SEQ ID NO 30 a SEQ ID NO 87 (SEQ ID NO 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87), en particular SEQ ID NO 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 34 y 46. El péptido puede consistir, como alternativa, en la secuencia en la SEQ ID NO 14.

En particular, los péptidos citrulinados con las SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y los péptidos no citrulinados 11 y 34, o una variante de dicho péptido, son adecuados.

Algunos de los péptidos adecuados son citrulinados, tales como péptidos y variantes de péptidos que comprenden una secuencia como se define en las SEQ ID NO 14 y SEQ ID NO 15 a SEQ ID NO 24 (SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24) y SEQ ID NO 30, 31, 36, 45, 46, 47, 48 y SEQ ID NO 71 a SEQ ID NO 87 (SEQ ID NO 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87) y donde el péptido comprende al menos un resto de citrulina. Las SEQ ID NO 14 y SEQ ID NO 15 a SEQ ID NO 24 (SEQ ID NO 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24) y SEQ ID NO 36 son péptidos de alfa-enolasa citrulinados, las SEQ ID NO 30, 31, 45, 46, 47 y 48 son péptidos de colágeno citrulinado de tipo II y las SEQ ID NO 71 a SEQ ID NO 87 (SEQ ID NO 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 y 87) son péptidos de vimentina citrulinados. Una ventaja con el uso de péptidos citrulinados es que pueden ser más eficaces y específicos en el tratamiento de la artritis reumatoide ya que los autoanticuerpos que provocan artritis reumatoide se dirigen con frecuencia hacia péptidos que contienen un resto de citrulina. Asimismo, los péptidos citrulinados se unen con frecuencia mejor a la proteína del MHC que el péptido de arginina correspondiente, como se describe en el presente documento.

El péptido de la invención puede unirse a la proteína del MHC de clase II *in vivo* o *in vitro*.

El péptido según la invención se puede obtener puro y en grandes cantidades por medio de síntesis orgánica, tal como síntesis en fase sólida. Una persona experta en la materia conoce bien métodos para la síntesis de péptidos. Por ejemplo, R. B. Merrifield (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85 (14): 2149-2154, Merrifield (1990) *Int. J. Peptide. Protein Res* 35: 161-214, Atherton E. *et al.* (1979) *Bioorg Chem.* 8, 351, documentos US2009/0292108 y 2009/0221792 y referencias en los mismos describen la síntesis de péptidos. Además, los péptidos pueden sintetizarse usando una máquina automática de síntesis de péptidos. Por supuesto, los péptidos pueden obtenerse fácilmente de un proveedor

comercial de péptidos. Además, pueden producirse péptidos que no comprenden un resto de citrulina usando tecnología de ADN recombinante.

5 Los péptidos pueden ser lineales o circulares. Un péptido circular puede ser adecuado para determinadas aplicaciones, tal como cuando el péptido se usa para detectar un anticuerpo patógeno, por ejemplo, en un ensayo ELISA. Un péptido circular es menos adecuado para unirse a una proteína del MHC o para ensayos de activación de linfocitos T.

10 En otro aspecto de la invención se proporciona un complejo, como se ha descrito anteriormente, de un péptido según la invención y proteína del MHC de clase II recombinante humana, en particular una de las variantes del MHC de clase II HLA-DRB1 0401, 0404, 0405, 0408, 0101 o 1001 que se unen a dicho péptido ("complejo de péptido-MHC"). No es necesario que la proteína del MHC sea la proteína de longitud completa. También se puede usar un fragmento de una proteína del MHC, como se analiza a continuación. En el presente documento, el "complejo de péptido-MHC" se refiere también a un complejo de un péptido y dicho fragmento de una proteína del MHC de clase II.

15 Son combinaciones preferidas de proteínas y péptidos del MHC de clase II las siguientes:

MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 0401 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 7, 8, 9, 10 y 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 33, 34, 36, 45, 49, 50, 54, 55, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 86, o una variante de dicho péptido. En particular, 20 son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 31, 36, 45, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 86. Los péptidos más preferidos para proteína del MHC de clase II con un genotipo 0401 son péptidos con las SEQ ID NO 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 34, o variantes de los mismos.

25 MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 0404 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 13, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 37, 38, 40, 41, 45, 49, 50, 53, 57, 58, 60, 62, 68, 70, 71, 75, 77 y 87, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 30, 31, 45, 71, 75, 77 y 87.

30 MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 0405 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 41, 44, 45, 50, 60, 65, 67, 73 y 77, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 31, 36, 45, 73 y 77.

35 MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 0408 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 33, 34, 36 y 48, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 36 y 48.

40 MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 0101 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13, (SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13), SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 16, 17, 23, 26, 32, 33, 49, 50, 52, 56, 57, 61, 63, 65, 67, 68, 72, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81 y 85, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 17, 23, 72, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81 y 85.

45 MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 1001 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 3, 10, 14, 16, 42, 43, 46, 47 y 48, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 46, 47 y 48. En particular, un péptido con la SEQ NO 46 o una variante del mismo, es adecuado.

50 El complejo de péptido-MHC se puede producir mediante métodos conocidos en la técnica. La expresión recombinante de proteína del MHC y la carga de la proteína del MHC con un péptido son bien conocidas por un experto en la materia. Un sistema de expresión adecuado para la producción de proteína del MHC es baculovirus.

55 Como se ha mencionado, se puede usar el fragmento de una proteína del MHC. La proteína del MHC debe ser estable y poder presentar un péptido a linfocitos T. Para su uso como se describe en el presente documento, la parte esencial de la molécula del MHC de clase II son los dominios externos de las cadenas alfa y beta (dominios alfa 1 y beta 1) que juntos forman el surco de unión al péptido. Por ejemplo, puede ser adecuado excluir los dominios transmembrana de dicho fragmento, para lograr la solubilidad de la proteína recombinante. Para obtener una proteína del MHC funcional que se una y presente un péptido, los dominios externos (alfa1 y beta1) pueden estabilizarse por diferentes medios. 60 Dichos medios incluyen las siguientes estrategias: a) conservar partes de los dominios internos (dominios alfa 2 y beta 2), b) estabilizar los dominios internos mediante la introducción de una estructura de cremallera de leucina, c) introducir restos de cisteína que forman enlaces disulfuro que ligan las cadenas alfa y beta, d) introducir un péptido en el surco de unión a péptido que está unido covalentemente a un alargamiento del dominio beta. Los genes adecuados que codifican la proteína del MHC son DRB1 para la cadena beta y DRA para la cadena alfa. Pueden usarse métodos de 65 biología molecular conocidos por una persona experta en la materia para alterar estos genes. Se pueden encontrar protocolos útiles en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición de Joe Sambrook.

Las siguientes referencias son relevantes para la producción de proteína del MHC recombinante: 1) Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4+ T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 1999; 104: R63-7; 2) Dzhambazov, B., *et al.* Therapeutic Vaccination of Active Arthritis with a Glycosylated Collagen Type II Peptide in Complex with MHC Class II Molecules. *J Immunol* 176, 1525-1533 (2006); 3) Smith, K.J., Pyrdol, J., Gauthier, L., Wiley, D.C. y Wucherpennig, K.W. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 188, 1511-1520 (1998); 4) Andersson, E.C., *et al.* Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7574-7579 (1998); 5) Svendsen, P., *et al.* Tracking of proinflammatory collagen-specific T cells in early and late collagen-induced arthritis in humanized mice. *J Immunol* 173, 7037-7045 (2004).

Se puede llevar a cabo unión del péptido a la proteína del MHC de clase II de modo que formen un complejo de diferentes maneras. Con frecuencia es suficiente incubar la proteína del MHC durante un tiempo determinado para que el péptido se una a la proteína. Habitualmente, se llevará a cabo incubación durante varios días, en particular 3 días es un tiempo adecuado para la incubación. El péptido puede estar presente en un exceso molar con respecto a la proteína del MHC. Un exceso molar adecuado del péptido es 20 veces. Una concentración adecuada del péptido es 0,2 mg/ml.

La proteína del MHC consiste en una cadena alfa y una cadena beta. El complejo de alfa/beta de la proteína del MHC puede ser inestable en solución a menos que un péptido se una a la proteína. Por lo tanto, puede ser adecuado almacenar la proteína del MHC con un "péptido simulado" inespecífico unido al surco de unión del péptido para mejorar la estabilidad. Antes de su uso, el péptido inespecífico se elimina y se reemplaza con el péptido de interés. También puede ser adecuado entrecruzar el péptido con la proteína del MHC de clase II.

El péptido según la invención es adecuado para su uso en el tratamiento y diagnóstico de la artritis reumatoide.

Como se ha analizado anteriormente, la respuesta inmunitaria es controlada por linfocitos T, donde los linfocitos T reguladores constituyen uno de varios mecanismos que inhiben la respuesta inmunitaria y donde la activación de linfocitos T efectoras mejora la respuesta inmunitaria. Por tanto, la enfermedad autoinmunitaria, tal como artritis reumatoide, se controla mediante un equilibrio de estimulación de linfocitos T efectoras y linfocitos T reguladores.

Una respuesta inmunitaria patológica puede atenuarse administrando los péptidos o complejos de péptido-MHC de modo que los linfocitos T reguladores u otras rutas reguladoras se estimulen de manera específica. La estimulación con complejos solubles de péptido-MHC se puede llevar a cabo sin la presencia de factores coestimulantes normalmente presentes en la superficie de células presentadoras de antígenos, tales como moléculas de superficie B7. El fin de esto es activar linfocitos T reguladores, en lugar de linfocitos T efectoras que promueven la enfermedad. El linfocito T regulador inhibe la activación de células inflamatorias patológicas, linfocitos T o linfocitos B y la producción de anticuerpos.

El péptido se puede proporcionar o administrar en una forma en la que se une a una proteína del MHC, en particular, una proteína del MHC humana de clase II recombinante (complejo de péptido-MHC). Una ventaja de proporcionar o administrar el péptido junto con una proteína de clase del MHC es que esto puede facilitar la reactividad con linfocitos T y proporcionar una inducción más eficaz de la tolerancia que el uso del péptido solo. Este complejo también puede proporcionar un fármaco más adecuado, ya que tiene una semivida más larga en el cuerpo humano. Preferentemente, se administra al paciente una proteína del MHC de clase II con un genotipo que corresponde al genotipo del paciente.

Por tanto, administrando el péptido de la invención o los complejos de péptido-MHC a pacientes con una enfermedad autoinmunitaria tal como artritis reumatoide, el sistema inmunitario puede modularse y la enfermedad puede prevenirse, curarse, controlarse o al menos atenuarse.

Los pacientes son tratados adecuadamente según a naturaleza de su respuesta autoinmunitaria y su genotipo. Los genotipos de HLA son bien conocidos y se han descrito previamente. Los pacientes que portan al menos un alelo de HLA-DRB1 0101, HLA-DRB1 0404, HLA-DRB1 0401, HLA-DRB1 0405, HLA-DRB1 0408 y HLA-DRB1 1001 son de interés para el diagnóstico y/o tratamiento usando los péptidos desvelados. Sin embargo, es posible que también sean de interés pacientes con otros genotipos.

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 0101 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 13, (SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 16, 17, 23, 26, 32, 33, 49, 50, 52, 56, 57, 61, 63, 65, 67, 68, 72, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81 y 85, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 17, 23, 72, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81 y 85.

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 0401 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 7, 8, 9, 10 y 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

30, 31, 33, 34, 36, 45, 49, 50, 54, 55, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 86, o una variante de dicho péptido. Como alternativa, se puede usar un péptido con la secuencia de la SEQ ID NO 14 o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 31, 36, 45, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 84 y 86. En particular, los péptidos citrulinados con las SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y los péptidos no citrulinados 11 y 34, o una variante de dicho péptido, son adecuados

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 0404 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 37, 38, 40, 41, 45, 49, 50, 53, 57, 58, 60, 62, 68, 70, 71, 75, 77 y 87, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 30, 31, 45, 71, 75, 77 y 87.

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 0405 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 41, 44, 45, 50, 60, 65, 67, 73 y 77, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 31, 36, 45, 73 y 77.

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 0408 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 33, 34, 36 y 48, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 36 y 48.

Los pacientes que portan el genotipo de HLA HLA-DRB1 1001 se tratan provechosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO 1, 3, 10, 14, 16, 42, 43, 46, 47 y 48, o una variante de dicho péptido. En particular, son adecuados los péptidos citrulinados y variantes de estos en ese grupo, es decir, SEQ ID NO 14, 16, 46, 47 y 48. Un péptido con la SEQ ID NO 46 o una variante del mismo es el péptido más preferido.

Los pacientes con una respuesta inmunitaria contra la enolasa se tratan adecuadamente con un péptido de alfa-enolasa según la invención, preferentemente, un péptido que corresponde al epítipo al que se dirige la autoinmunidad. Sin embargo, también otros pacientes con artritis reumatoide pueden ser adecuados para el tratamiento con estos péptidos.

Los pacientes con una respuesta inmunitaria contra el colágeno de tipo II se tratan adecuadamente con un péptido de colágeno de tipo II desvelado en el presente documento, preferentemente, un péptido que corresponde al epítipo al que se dirige la autoinmunidad. Sin embargo, también otros pacientes con artritis reumatoide pueden ser adecuados para el tratamiento con estos péptidos.

Los pacientes con una respuesta autoinmunitaria contra la vimentina se tratan adecuadamente con un péptido de vimentina desvelado en el presente documento. Sin embargo, también otros pacientes con artritis reumatoide pueden ser adecuados para el tratamiento con estos péptidos.

El péptido o los complejos de péptido-MHC pueden administrarse al paciente usando diferentes métodos. Se conocen protocolos de tolerancia y se revisan en Larche y Wraith, Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune disease. Suplemento de Nature Medicine; 2005; 11; 4; S69-S76. Se describen ejemplos de protocolos de tratamiento en Ludvigsson *et al.*, GAD N Engl J Med. 30 de octubre de 2008; 359 (18): 1909-20; Tisch *et al.*, J Immunol. 2009; 183; 4809-4816; Vestberg *et al.*, J Immunol. 2006; 176; 1525-1533; Shah *et al.*, Journal of Internal Medicine 2009; 266, 221-23 Gianfrani *et al.*, J Immunol. 2009; 182; 4158-4166). Por tanto, el péptido o los complejos de péptido-MHC se pueden usar como vacuna. Como alternativa, los péptidos pueden estar ligados a células dendríticas tolerogénicas.

Las vacunas pueden administrarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, en el intestino o por las vías respiratorias (administración mucosa). La dosis se debe ajustar después de supervisar los efectos sobre las respuestas inmunitarias específicas de los pacientes (véase posteriormente). La vacuna se administra inicialmente al paciente 1, 2, 3 o 4 veces, más preferentemente 2, 3 o 4 veces. Sin embargo, también se puede administrar repetidamente durante varios años de enfermedad.

El péptido o complejo de péptido-MHC se administra al paciente en una cantidad eficaz y no tóxica. Estos parámetros se pueden supervisar usando métodos clínicos e inmunológicos conocidos previamente. En particular, la eficacia de la vacunación se puede supervisar en pacientes que usan los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento (véase posteriormente).

En otro aspecto más de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido según la invención o un complejo de un péptido según la invención y una proteína del MHC de clase II recombinante humana (complejo de péptido-MHC). La composición farmacéutica puede comprender aditivos adecuados tales como

potenciadores de la biodisponibilidad, conservantes, potenciadores de la solubilidad, adyuvantes y estabilizadores. En particular, la composición farmacéutica puede comprender un adyuvante inmunológico, tal como una sal de aluminio. La composición farmacéutica puede incluir un componente micelar para la administración del péptido.

5 Los péptidos y los complejos de péptido-MHC se pueden usar en el diagnóstico de la artritis reumatoide. La respuesta inmunitaria que provoca la artritis reumatoide se controla mediante un equilibrio de linfocitos T reguladores (caracterizados por la expresión de CD4, CD25 y Foxp3) y linfocitos T efectores estimulantes (caracterizados por la expresión y de citocinas proinflamatorias tales como IFN gamma, TNF o IL-17A e IL-17F y expresión de superficie de CD154 y CD69) donde un cambio en el equilibrio hacia menos linfocitos T reguladores o linfocitos T reguladores menos
10 activos u otros mecanismos reguladores conduce a una respuesta inmunitaria continua o mejorada y al avance de la enfermedad. Los péptidos y complejos de péptido-MHC desvelados pueden usarse para supervisar la cantidad de linfocitos T que son reactivos para epítomos autoinmunitarios. En particular, se puede determinar la relación entre la cantidad de linfocitos T reguladores y la cantidad de linfocitos T efectores, donde un aumento de la proporción de linfocitos T efectores, en particular linfocitos T efectores activados, indica avance de la enfermedad.

15 De esta manera, la enfermedad del paciente, y el perfil de los linfocitos T que provocan las enfermedades, puede supervisarse en el paciente. Esto puede llevarse a cabo en diversos puntos temporales para seguir la progresión de la enfermedad en el paciente. Los péptidos y los complejos de péptido-MHC también se pueden usar para supervisar la respuesta inmunitaria durante diversas intervenciones, tales como vacunación, u otra terapia.

20 El ensayo puede usarse adecuadamente para análisis de linfocitos T de un paciente. De manera adecuada, se llevan a cabo las siguientes etapas: 1) obtener una muestra de linfocitos T de un paciente, 2) poner en contacto la muestra que comprende linfocitos T con un péptido o un complejo de péptido-MHC según la invención y 3) detectar la capacidad de los linfocitos T para ser activados por el péptido o los complejos de péptido-MHC. Esta tercera etapa se puede
25 llevar a cabo detectando un marcador en la muestra de linfocitos T o detectando la unión del péptido o complejo de péptido-MHC a los linfocitos T.

30 La detección de marcadores puede cumplir el fin de clasificar los linfocitos T auxiliares en cuatro grupos: linfocitos T reguladores en reposo, linfocitos T reguladores activados, linfocitos T efectores en reposo (vírgenes) y linfocitos T efectores activados. Adecuadamente, se detectan marcadores que indican la naturaleza de la activación y el estado de activación (activo/inactivo) de los linfocitos T. La cantidad de células y la proporción de estos tipos de células entre sí también se pueden cuantificar.

35 La detección solo de la unión del péptido o el complejo de péptido-MHC, sin detectar necesariamente la activación posterior de linfocitos T, cumple el fin de detectar linfocitos T que se unen y, por tanto, pueden reaccionar con, y ser activados por, el péptido o complejo de péptido-MHC en cuestión. Una ventaja de este método es que no se necesita tiempo de incubación.

40 El método puede incluir el análisis de las propias células o una parte de los medios de cultivo celular. Por tanto, la "muestra de linfocitos T" a la que se ha hecho referencia anteriormente incluye las propias células y cualquier medio de cultivo celular usado. Son habitualmente necesarios medios de cultivo celular para que las células sobrevivan en cultivo más de unas pocas horas.

45 Puede ser adecuado poner en contacto la muestra que comprende linfocitos T en condiciones que permitan la activación de los linfocitos T. La muestra de linfocitos T comprende adecuadamente linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares se caracterizan por la expresión en superficie de CD4.

50 Se ponen en contacto linfocitos T con el péptido o los complejos de péptido-MHC en condiciones que permiten la activación de los linfocitos T, tal como, por ejemplo, en condiciones adecuadas de cultivo celular. Adecuadamente, los linfocitos T se mantienen en un medio de cultivo celular a 37 °C, con CO₂ al 5 %.

55 Preferentemente, el tiempo de contacto de los linfocitos T con el péptido está en el intervalo de 6 horas a 6 días cuando se estudia el cambio de expresión de un marcador. Un tiempo adecuado es de 5 días. Cuando solo se estudia la unión del péptido o péptido-MHC con linfocitos T, se puede usar un tiempo de contacto más corto como conoce una persona experta en la materia.

60 El método de diagnóstico cuantifica la cantidad de linfocitos T que reaccionan con y son activados por el péptido y, por tanto, "ven" inmunológicamente el péptido. Los linfocitos T identificados de este modo pueden caracterizarse adicionalmente como linfocitos T reguladores o estimulantes, o caracterizarse de otras maneras, mediante el uso de diversos marcadores.

65 Adecuadamente, se determina el genotipo de HLA del paciente como una primera etapa, antes de determinarse la reactividad de linfocitos T con péptidos. Esto puede reducir la cantidad de péptidos para analizar, ya que el MHC con un determinado genotipo solo se une y confiere reactividad a un conjunto determinado de péptidos como se describe en el presente documento. La naturaleza de los diversos genotipos de HLA es conocida por una persona experta en la materia.

5 El genotipado puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando PCR, secuenciación de ADN genómico, transferencia de Southern, transferencia de Northern u otros métodos conocidos por una persona experta. Por ejemplo, el genotipado se puede llevar a cabo como se describe en Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-35.

10 El diagnóstico puede llevarse a cabo *in vitro*, es decir, usando linfocitos T aislados del paciente. Los linfocitos T pueden aislarse de sangre. En particular, se puede usar una muestra de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de un paciente. Por tanto, el diagnóstico puede llevarse a cabo poniendo en contacto una muestra de PBMC con el péptido. Las PBMC purificadas a partir de aproximadamente 10 ml de sangre periférica del paciente son suficientes para llevar a cabo el análisis. Las PBMC pueden purificarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación en gradiente. En particular, se puede usar centrifugación en gradiente usando Ficoll®. Preferentemente, el método elimina plasma, células polinucleares, y células no nucleadas, tales como glóbulos rojos.

15 Convenientemente, los linfocitos T se caracterizan con la ayuda de marcadores. CD3 se puede usar como marcador general para todos los linfocitos T. CD4 se puede usar como marcador para linfocitos T auxiliares (que son tanto linfocitos T efectores como linfocitos T reguladores).

20 Los linfocitos T efectores activados pueden identificarse mediante expresión en superficie de, por ejemplo, CD 154 o CD69, o la expresión en superficie de MHC de clase II, proliferación y tinción con Ki67. Las citocinas adecuadas para la detección de la activación de linfocitos T efectores es la secreción de TNF alfa, interferón gamma, IL-17A, IL-17F, IL-2, IL-13 o IL-10.

25 Los linfocitos T reguladores se pueden identificar mediante la coexpresión de CD4, CD25 y Foxp3. Los linfocitos T reguladores activados se pueden identificar mediante la regulación positiva de estos marcadores.

30 Los marcadores se pueden identificar convenientemente con el uso de métodos que son bien conocidos por un experto en la materia. Una forma adecuada de detectar marcadores es usar anticuerpos disponibles en el mercado que sean específicos para esos marcadores y que estén marcados. Existen muchos tipos de marcadores adecuados, por ejemplo, marcadores fluorescentes y/o enzimas, tales como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante.

35 Los métodos adecuados para detectar marcadores incluyen citometría, luminex, elispot, ELISA o transferencia de Western. También se pueden usar métodos basados en ARNm tales como, por ejemplo, RT-PCR o transferencia de Northern para detectar marcadores.

40 Cuando se usa un péptido desnudo (es decir, un péptido no unido a una proteína del MHC) para el diagnóstico, se pueden añadir a cultivos celulares con PBMC a una concentración de 2-100 ug/ml, aún más preferentemente 5-50 ug/ml. Las PBMC se incuban después con los péptidos durante un periodo de tiempo en el intervalo de 6 horas a 6 días, aún más preferentemente 3-6 días y lo más preferentemente 5 días. Las células y/o los medios de cultivo celular se analizan posteriormente para determinar los marcadores como se ha descrito anteriormente.

45 Cuando los complejos de péptido-MHC se usan para diagnóstico, el diagnóstico puede llevarse a cabo usando recipientes de cultivo celular, tales como placas de cultivo celular. Por ejemplo, se pueden usar pocillos en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. El recipiente de cultivo celular puede ser tal que permita el cultivo de 500.000 a 2 millones de células. Cuando se usan complejos de péptido-MHC, la superficie del recipiente de cultivo celular puede recubrirse con los complejos de péptido-MHC. Una concentración adecuada para su uso en el recubrimiento del recipiente de cultivo celular con complejo de péptido-MHC es de aproximadamente 1-10 µg/ml). Convenientemente, una placa de cultivo celular comprende pocillos con un conjunto de complejos de péptido-MHC que son de interés para un paciente con un genotipo de HLA particular. Se añaden PBMC al pocillo de tal manera que los linfocitos T puedan unirse a los complejos de péptido-MHC y activarse. Un tiempo adecuado para la incubación está en el intervalo de 6 horas a 6 días. Las células y/o los medios de cultivo celular se analizan posteriormente para determinar los marcadores como se ha descrito anteriormente.

55 Adecuadamente, puede realizarse diagnóstico usando tetrámeros que comprenden los péptidos de la invención. Un tetrámero es un complejo que comprende a) una molécula de avidina o estreptavidina unida a b) cuatro moléculas de MHC que portan cada una un péptido en el surco de unión a péptido. El tetrámero se puede obtener mediante biotinylation de la proteína del MHC y posteriormente permitiendo que la proteína del MHC biotinilada se una a estreptavidina. Debido a que la estreptavidina tiene cuatro sitios de unión para biotina, se forma un complejo que comprende una molécula de estreptavidina unida a cuatro complejos de péptido-MHC, de ahí el nombre de "tetrámero". Snir *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, vol 63, n.º 10 págs. 2873-2883 y Novak *et al.*, *J Clin Invest* 1999; 104: R63-7 proporciona detalles sobre la producción y el uso de tetrámeros. El tetrámero se puede conjugar con un marcador, tal como un marcador fluorescente. El complejo de péptido-MHC se unirá a linfocitos T que están implicados en la regulación de la artritis reumatoide porque expresan un receptor de linfocitos T específico para el péptido. Los linfocitos T pueden detectarse por el marcador del tetrámero. Una ventaja con el uso de tetrámeros es que la señal se amplifica porque los tetrámeros se unen más fuerte con los linfocitos T.

El marcador fluorescente puede detectarse, por ejemplo, en un procedimiento citométrico tal como FACS. Por tanto, la cantidad de linfocitos T que reaccionan con el complejo de péptido-MHC se puede detectar en una muestra de sangre de un paciente.

5 Por tanto, se desvela en el presente documento un complejo que comprende una molécula de avidina o estreptavidina y un complejo de péptido biotinilado-MHC.

10 Como alternativa, el método de diagnóstico puede comprender una cualquiera de las siguientes etapas: a) obtener una muestra de linfocitos T de un individuo, b) poner en contacto la muestra con un péptido o un complejo de péptido-MHC según la invención, c) determinar la unión del péptido o el complejo de péptido-MHC con una población de linfocitos T en la muestra. El método de diagnóstico también puede comprender una etapa de determinación del genotipo de HLA del individuo. El método de diagnóstico se lleva a cabo *in vitro*, es decir, no es invasivo.

15 Los péptidos también pueden usarse para detectar la presencia o cantidad de anticuerpos contra los epítomos presentes en los péptidos.

20 La presencia de anticuerpos para un epítomo determinado es otro medio para calificar la naturaleza de la autoinmunidad del paciente. Por tanto, el método de diagnóstico puede comprender las etapas de obtener una muestra del paciente 2), poner en contacto la muestra con un péptido o complejo de péptido-MHC y 3) determinar la unión de anticuerpos en la muestra con el péptido. La muestra puede ser una muestra de sangre, suero, plasma, saliva o líquido sinovial que contiene anticuerpos. Existen diversos inmunoensayos que pueden usarse para detectar la unión de anticuerpos, ejemplos de los cuales son ELISA, transferencia de Western y radioinmunoensayo, pero también pueden usarse otros métodos.

25 Además, los péptidos y los complejos de péptido-MHC pueden usarse como una herramienta de investigación como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los péptidos y los complejos de péptido-MHC se pueden usar para supervisar la progresión de la artritis reumatoide, para agrupar pacientes con artritis reumatoide en subtipos y para correlacionar el resultado clínico con la autoinmunidad.

30 También se proporciona un equipo de herramientas que comprende un péptido o un complejo de péptido-MHC según la invención destinado a su uso en diagnóstico. Adecuadamente, el equipo también comprende otros componentes, tales como tampones de unión, adecuados para su inclusión en un equipo de diagnóstico. El equipo puede incluir uno o más de los complejos tetrámeros descritos anteriormente. Convenientemente, se proporciona un grupo de péptidos en un equipo para pruebas de diagnóstico, comprendiendo el equipo péptidos o complejos de péptido-MHC de interés particular para un paciente con un genotipo particular como se ha descrito anteriormente. Al usar dicho equipo, se puede probar la reactividad para varios péptidos relevantes simultáneamente. Opcionalmente, el equipo puede comprender componentes para establecer el genotipo de HLA del paciente.

40 El equipo puede comprender al menos un recipiente de cultivo celular que contiene al menos un péptido o complejo de péptido-MHC según la invención. El equipo puede comprender varios recipientes combinados de cultivo celular, tales como los pocillos en una placa de cultivo celular, donde cada pocillo de la placa de cultivo celular contiene un tipo de péptido o complejo de péptido-MHC. Adecuadamente, cada pocillo de la placa de cultivo celular está recubierto con péptido o complejo de péptido-MHC. Cuando se usa un péptido desnudo, el péptido puede proporcionarse en forma liofilizada en el recipiente de cultivo celular. El recipiente de cultivo celular está destinado al cultivo de células, de modo que las células pueden sobrevivir durante varios días cuando se mantienen en el recipiente en condiciones adecuadas.

50 Se desvela aquí un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en particular artritis reumatoide, que comprende administrar un péptido o un complejo de péptido-MHC según la invención a un paciente. El método de tratamiento puede comprender las etapas de 1) determinar el genotipo de HLA del paciente como se describe en el presente documento y 2) determinar la naturaleza de la autoinmunidad usando el método de diagnóstico descrito en el presente documento, 3) seleccionar el péptido o los péptidos o el complejo o los complejos de péptido-MHC adecuados para el paciente, 4) administrar el péptido o complejo de péptido-MHC al paciente y, opcionalmente, 5) supervisar la enfermedad del paciente, preferentemente usando el método de diagnóstico proporcionado en el presente documento. Dicha supervisión puede incluir la relación de linfocitos T reguladores con respecto a linfocitos T efectores activadores y los cambios en dicha relación. Preferentemente, se selecciona un péptido que reacciona con los linfocitos T para el tratamiento del paciente, ya que dicho péptido activará los linfocitos T reguladores. Cuando se usa un complejo de péptido-MHC, el genotipo de HLA de la proteína del MHC se selecciona según el genotipo del paciente, como se describe en el presente documento.

60 El método de tratamiento también puede comprender la etapa de determinar cuál de los antígenos peptídicos y/o complejos de péptido-MHC de la invención son adecuados para su administración al paciente. Por tanto, El método puede comprender la etapa de determinar la naturaleza de la reactividad autoinmunitaria que es al menos parcialmente responsable de la enfermedad. Esta etapa puede llevarse a cabo midiendo la activación de linfocitos T como se describe en el presente documento o midiendo la presencia en el paciente de anticuerpos que reaccionan con un

péptido determinado como se describe en el presente documento.

Adecuadamente, el paciente se examina para detectar autoinmunidad mediante pruebas de autoinmunidad contra varios péptidos diferentes. El método de tratamiento puede comprender la etapa de determinar contra qué péptido y/o complejos de proteína del MHC-péptido se dirige el autoanticuerpo o autoanticuerpos que provocan la enfermedad.

Figuras

Figura 1. (A) Respuestas de linfocitos T CD4+ a péptidos de alfa-enolasa (ENO) en un paciente HLA-DR*0401 positivo. (B) Respuestas de linfocitos T CD4+ a péptidos de colágeno-II (CII) en un paciente HLA-DR*1001 positivo. Se cultivaron PBMC de pacientes durante 5 días con medio (barra blanca) o con dos péptidos (barras grises) o dos variantes citrulinadas (CIT) correspondientes (barras negras). Se llevó a cabo análisis por FACS de la coexpresión de CD154 junto con IFN-gamma e IL-17 en linfocitos T CD4+ después de estimulación *in vitro* de PBMC con los péptidos indicados (se muestran los números de referencia del péptido). Se proporcionan detalles adicionales en los ejemplos 13 y 15.

Figura 2. Las PBMC de un paciente con artritis reumatoide HLA-DRB1*0401 positiva se estimularon con diferentes péptidos de enolasa durante 5 días. Se realizó tinción intracelular para las citocinas 6 horas después de la reestimulación y la adición de Brefeldina A. El control positivo (HA) genera principalmente una respuesta de IFNgamma. Las versiones de arginina de los péptidos de a-enolasa producen una respuesta en este paciente, mientras que los péptidos citrulinados de a-enolasa dan lugar a la secreción de IL17A (los tres péptidos) e IFN gamma (un péptido). Se demuestran detalles adicionales en los ejemplos 4, 6 y 11.

Figura 3. Se usa un tetrámero de HLA-DRB1*0401 cargado con el péptido de enolasa citrulinado 313 (SEQ ID NO 23) y marcado con el fluorocromo PE para teñir PBMC de un paciente con artritis reumatoide *0401 positiva. Las células en el cuadrante superior derecho son linfocitos T con un receptor de linfocitos T que reconoce este complejo de péptido-MHC particular. Se demuestran detalles adicionales en los ejemplos 16 y 17.

Ejemplos

(El péptido de la SEQ ID NO: 22 queda dentro del alcance de las reivindicaciones).

Ejemplo 1

Los inventores han identificado péptidos de colágeno humano de tipo II, alfa-enolasa y vimentina que se unen específicamente a las variantes del MHC que están asociadas con un riesgo de desarrollar artritis reumatoide y con la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas específicas. Estos péptidos se unen a MHC con los genotipos HLA DRB1 0101, 0401, 0404, 0405, 0408 y 1001 como se indica en las tablas 1, 2 y 3. Resulta interesante que ninguno de los péptidos se une a MHC con los genotipos HLA-DR 03 y 0402, genotipos que no están asociados con el desarrollo de artritis reumatoide.

La unión de los péptidos a la proteína del MHC de clase II recombinante de diversos alelos se ha confirmado en un ensayo de unión *in vitro* y los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3. En las tablas 1, 2 y 3, el listado del alelo en la columna para el alelo indica unión. Por lo tanto, "0401" en la columna "Se une a 0401" indica unión del péptido a MHC de clase II del genotipo HLA DRB1 0401. "No" o ningún dato indica que no se une a una proteína de ese genotipo. Los cuadros vacíos indican que no hay unión o que la unión no se ha determinado. En las tablas también se indica si el péptido tiene un resto de citrulina, donde "sí" indica la presencia de un resto de citrulina y "no" indica la ausencia de un resto de citrulina.

Además, los inventores han identificado péptidos previamente desconocidos de alfa-enolasa (SEQ ID NO 15 a 22 y 24) y un péptido citrulinado de colágeno de tipo II (SEQ ID NO 30) que se une específicamente a HLA-DRB1 0401, donde el péptido no citrulinado no se unió. Por tanto, para estos péptidos no se observó unión a HLA-DR0401 cuando se intercambiaba citrulina con el aminoácido original arginina (tabla 4). No se observó unión de los péptidos citrulinados a las variantes de HLA-DR 03 o 02.

Por tanto, los péptidos identificados y presentados en la tabla 4 se unen a las variantes de HLA-DR que se asocian con artritis reumatoide y respuestas de anticuerpos anti-alfa-enolasa y anti-colágeno de tipo II (HLA-DRB1 0401 y/o 0404).

Tabla 1.

Proteína	N.º de ref del péptido	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrulinación	SEQ ID NO
a-enolasa	1	*0101	no	*0404	*0405	no	*1001	no	1
a-enolasa	6	*0101	no	*0404	*0405	no	no	no	2
a-enolasa	12	*0101	no	no	*0405	*0408	*1001	no	3
a-enolasa	13	*0101	no	*0404	no	no	no	no	4
a-enolasa	14	*0101	no	*0404	no	*0408	no	no	5
a-enolasa	15	*0101	no	*0404	no	*0408	no	no	6
a-enolasa	26	*0101	*0401	*0404	*0405	*0408	no	no	7
a-enolasa	34	*0101	*0401	*0404	*0405	no	no	no	8
a-enolasa	38	*0101	*0401	no	*0405	*0408	no	no	9
a-enolasa	57	*0101	*0401	*0404	*0405	*0408	*1001	no	10
a-enolasa	66	*0101	*0401	*0404	*0405	*0408	no	no	11
a-enolasa	80	*0101	no	no	*0405	*0408	no	no	12
a-enolasa	81	*0101	no	*0404	no	no	no	no	13
a-enolasa	287	*0101	*0401	*0404	*0405	no	*1001	sí	14
a-enolasa	289	no	*0401	no	*0405	no	no	sí	15
a-enolasa	291	*0101	*0401	*0404	*0405	no	*1001	sí	16
a-enolasa	292	*0101	*0401	*0404	*0405	no	no	sí	17
a-enolasa	297	no	*0401	no	*0405	no	no	sí	18
a-enolasa	300	no	*0401	no	*0405	no	no	sí	19
a-enolasa	301	no	*0401	*0404	*0405	no	no	sí	20
a-enolasa	302	no	*0401	*0404	*0405	no	no	sí	21
a-enolasa	305	no	*0401	no	*0405	no	no	sí	22
a-enolasa	313	*0101	*0401	*0404	*0405	no	no	sí	23
a-enolasa	324	no	*0401	*0404	*0405	no	no	sí	24
a-enolasa	36	*0101	no	no	*0405	no	no	no	32
a-enolasa	45	*0101	*0401	*0404	*0405	*0408	no	no	33
a-enolasa	49	no	*0401	*0404	*0405	*0408	no	no	34
a-enolasa	69	no	no	no	*0405	no	no	no	35
a-enolasa	299	no	*0401	no	*0405	*0408	no	sí	36

Tabla 2

Proteína	N.º de ref del péptido	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrulinación	SEQ ID NO
Colágeno de tipo II	195		*0401	*0404				no	25
Colágeno de tipo II	242	*0101	*0401	*0404	*0405			no	26
Colágeno de tipo II	257			*0404				no	27
Colágeno de tipo II	137	*0101	*0401	*0404				no	28
Colágeno de tipo II	138	*0101	*0401					no	29
Colágeno de tipo II	386		*0401	*0404				sí	30
Colágeno de tipo II	411		*0401	*0404	*0405			sí	31
Colágeno de tipo II	100			*0404				no	37
Colágeno de tipo II	166			*0404				no	38
Colágeno de tipo II	178				*0405			no	39
Colágeno de tipo II	224			*0404				no	40

ES 2 798 400 T3

(continuación)

Proteína	N.º de ref del péptido	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrulinación	SEQ ID NO
Colágeno de tipo II	241		no	*0404	*0405			no	41
Colágeno de tipo II	263						*1001	no	42
Colágeno de tipo II	268						*1001	no	43
Colágeno de tipo II	272				*0405			no	44
Colágeno de tipo II	332		*0401	*0404	*0405			sí	45
Colágeno de tipo II	357						*1001	sí	46
Colágeno de tipo II	362						*1001	sí	47
Colágeno de tipo II	384					*0408	*1001	sí	48

Tabla 3

Proteína	N.º de ref del péptido	Se une a	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrulinación	SEQ ID NO
vimentina	1	*0101	*0401	*0404	no			no	49
vimentina	3	*0101	*0401	*0404	*0405			no	50
vimentina	6							no	51
vimentina	13	*0101	no					no	52
vimentina	14			*0404				no	53
vimentina	16	no	*0401					no	54
vimentina	20		*0401					no	55
vimentina	27	*0101		no				no	56
vimentina	32	*0101		*0404				no	57
vimentina	33	no	*0401	*0404	no			no	58
vimentina	34	no	*0401		no			no	59
vimentina	41		*0401	*0404	*0405			no	60
vimentina	42	*0101	*0401	no				no	61
vimentina	44			*0404				no	62
vimentina	55	*0101	*0401					no	63
vimentina	59		*0401					no	64
vimentina	64	*0101	*0401		*0405			no	65
vimentina	71		*0401					no	66
vimentina	77	*0101			*0405			no	67
vimentina	79	*0101	no	*0404				no	68
vimentina	81	no	*0401	no	no			no	69
vimentina	92	92		*0404				no	70
vimentina	93	no	*0401	*0404				sí	71
vimentina	95	*0101	*0401					sí	72
vimentina	98		*0401		*0405			sí	73
vimentina	99	*0101	*0401					sí	74
vimentina	104	*0101	*0401	*0404	no			sí	75
vimentina	105	*0101	*0401	no	no			sí	76
vimentina	106	*0101	*0401	*0404	*0405			sí	77
vimentina	108	no	*0401	no	no			sí	78
vimentina	111	*0101	*0401	No	no			sí	79
vimentina	117	*0101		No	no			sí	80
vimentina	132	*0101						sí	81
vimentina	133	no	*0401	No	no			sí	82
vimentina	145		*0401					sí	83
vimentina	150		*0401					sí	84
vimentina	156	*0101						sí	85
vimentina	159		*0401	No				sí	86

(continuación)

Proteína	N.º de ref del péptido	Se une a	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrulinación	SEQ ID NO
vimentina	166	no	no	*0404	no			sí	87

Tabla 4.

Proteína	N.º de péptido	Se une al subtipo de HLA	Citrulinación	El péptido no citrulinado correspondiente se une al subtipo de HLA:	Citrulinación necesaria para la unión a estos genotipos de HLA:	SEQ ID NO
α-enolasa	287	*0401	sí	0101, 0404	0401	14
α-enolasa	289	*0401	sí	-	0401	15
α-enolasa	291	*0401, *0404	sí	0404	0401	16
α-enolasa	292	*0401	sí	-	0401	17
α-enolasa	297	*0401	sí	0101	0401	18
α-enolasa	300	*0401	sí	-	0401	19
α-enolasa	301	*0401	sí	0404	0401	20
α-enolasa	302	*0401	sí	-	0401	21
α-enolasa	305	*0401	sí	-	0401	22
α-enolasa	313	*0401	sí	0101, 0401	-	23
α-enolasa	324	*0401	sí	-	0401	24
Colágeno de tipo II	195	*0404	no	nd	-	25
Colágeno de tipo II	242	*0401, *0404	no	nd	-	26
Colágeno de tipo II	257	*0404	no	nd	-	27
Colágeno de tipo II	137	*0401	no	nd	-	28
Colágeno de tipo II	138	*0401	no	nd	-	29
Colágeno de tipo II	386	*0401	sí	0404	0401	30
Colágeno de tipo II	411	*0401, *0404	sí	0401, 0404	-	31

5 Ejemplo de referencia 1

Se aislaron PBMC de varios pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 14 (número de referencia del péptido 287). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFNγ, IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T.

Ejemplo de referencia 2

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 15 (número de referencia del péptido 289). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFNγ, IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación.

30 Ejemplo de referencia 3

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células

el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 16 (número de referencia del péptido 291). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. Se muestran datos de un paciente en la figura 2, que muestra un fuerte aumento de IL-17 en comparación con los controles. Se muestran datos de un paciente en la figura 2. El péptido no citrulinado correspondiente (número de referencia del péptido 6, SEQ ID NO 2) no dio lugar a una respuesta, lo que era esperable porque la SEQ ID NO 2 no se une al MHC con el genotipo 0401 (tabla 1).

Ejemplo de referencia 4

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 17 (número de referencia del péptido 292). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación.

Ejemplo de referencia 5

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 18 (número de referencia del péptido 297). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. Se muestran datos de un paciente en la figura 2 que muestra un fuerte aumento de IFN γ e IL-17 en comparación con los controles. Se muestran datos de un paciente en la figura 2.

Ejemplo de referencia 6

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 19 (número de referencia del péptido 300). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación.

Ejemplo de referencia 7

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 20 (número de referencia del péptido 301). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T.

Ejemplo de referencia 8

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células

el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 21 (número de referencia del péptido 302). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación.

Ejemplo de referencia 9

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa no citrulinado con la SEQ ID NO 34 (número de referencia del péptido 49). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T.

Ejemplo 2

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 22 (número de referencia del péptido 305). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. Se muestran datos de un paciente en la figura 2.

Ejemplo de referencia 10

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa no citrulinado con la SEQ ID NO 11 (número de referencia del péptido 66). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T.

Ejemplo de referencia 11

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 23 (número de referencia del péptido 313). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFN γ , IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. Se muestran datos de un paciente en la figura 1A.

Ejemplo de referencia 12

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinado con la SEQ ID NO 24 (número de referencia del péptido 324). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo. Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un

marcador de activación) y citocinas IFNgamma, IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación.

5

Ejemplo de referencia 13

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo de HLA HLA DRB1-1001. Se añadió a las células péptido de colágeno de tipo II citrulinado con la SEQ ID NO 46 (número de referencia del péptido 357). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de gripe como control positivo. Además, la versión no citrulinada del péptido se usó como control negativo (número de referencia del péptido 148). Los péptidos se añadieron a concentraciones que varían de 5 a 50 ug/ml y, después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO₂, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizaron tinciones de citocinas intracelulares. Se usaron anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y citocinas IFNgamma, IL-17A y TNF alfa para análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado tuvieron doble tinción positiva tanto para CD154 como para al menos una citocina, lo que indica que ha tenido lugar la activación de linfocitos T. El péptido no citrulinado no dio como resultado activación. Se muestran datos de un paciente en la figura 1B.

10

15

20

Ejemplo 2 y ejemplos de referencia 1-13

Los datos del ejemplo 2 y los ejemplos de referencia 1-13 se resumen en la tabla 5. La activación de linfocitos T significa que todos los pacientes son positivos para al menos una citocina. Esto no se indica necesariamente en las figuras 1A y B, que muestran datos seleccionados de pacientes individuales para citocinas seleccionadas.

25

Tabla 5.

Proteína	N.º de ref del péptido	HLA probado	Citrulinación	Se une al MHC <i>in vitro</i>	Activación de linfocitos T	SEQ ID NO
a-enolasa	66	*0401	no	sí	sí	11
a-enolasa	287	*0401	sí	sí	sí	14
a-enolasa	289	*0401	sí	sí	sí	15
a-enolasa	291	*0401	sí	sí	sí	16
a-enolasa	292	*0401	sí	sí	sí	17
a-enolasa	297	*0401	sí	sí	sí	18
a-enolasa	300	*0401	sí	sí	sí	19
a-enolasa	301	*0401	sí	sí	sí	20
a-enolasa	302	*0401	sí	sí	sí	21
a-enolasa	305	*0401	sí	sí	sí	22
a-enolasa	313	*0401	sí	sí	sí	23
a-enolasa	324	*0401	sí	sí	sí	24
a-enolasa	49	*0401	no	sí	sí	34
Colágeno de tipo II	357	*1001	sí	sí	sí	46

Ejemplo de referencia 14

30

Producción de complejo de péptido-MHC: Se produjo HLA-DRB1 *0401 recombinante como se describe en Novak *et al.*, J Clin Invest 1999; 104: R63-7. Se purificó DR0401 brevemente soluble a partir de sobrenadantes de cultivo de células de insecto y se biotiniló en un sitio específico de secuencia usando biotina ligasa (Avidity) antes de la diálisis en tampón de almacenamiento de fosfato. El monómero biotinilado se cargó con 0,2 mg/ml del péptido con la SEQ ID NO 23 (número de referencia del péptido 313) mediante incubación a 37 °C durante 72 horas en presencia de n-octil-beta-D-glucopiranosido 2,5 mg/ml y Prefabloc SC 1 mM (Sigma-Aldrich).

35

Ejemplo de referencia 15

40

Producción y uso de tetrámeros. Los complejos de péptido-MHC en el ejemplo de referencia 14 se conjugaron con tetrámeros usando R-ficoeritrina-estreptavidina (Invitrogen) en una relación molar de 8:1. Se tiñeron PBMC de un paciente con artritis reumatoide, tipo de HLA *0401, usando los tetrámeros y se analizó inmediatamente mediante FACS. Se identificaron varios linfocitos T auxiliares CD4 positivos. Se podría estimar que aproximadamente 1 de cada 350.000 células CD4 positivas reaccionaron con el péptido, lo que indica una respuesta inmunitaria significativa. Los datos se presentan en la fig. 3, donde las células en la esquina superior derecha se unen al complejo de péptido-MHC.

45

ES 2 798 400 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Curara AB

<120> Péptidos novedosos que se unen a tipos del MHC de clase II y su uso en diagnóstico y tratamiento

5 <130> P114034EP1

<150> SE1150297
<151> 05/04/2011

10 <150> US61/472122
<151> 05/04/2011

<160> 87

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg
1 5 10 15

25 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 2

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

35 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 3

Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys Ala Val Glu His Ile Asn
1 5 10 15

45 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 4

Gly Val Ser Lys Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro
1 5 10 15

55 <210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys
1 5 10 15

60

ES 2 798 400 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

5 <400> 17

Phe	Xaa	Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ile	Tyr	Glu
1				5					10					15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 18

Xaa	Tyr	Met	Gly	Lys	Gly	Val	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	His	Ile	Asn
1				5					10					15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 19

Tyr	Xaa	His	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Glu	Val	Ile	Leu
1				5					10					15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 20

Gln	Glu	Phe	Met	Ile	Leu	Pro	Val	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Xaa	Glu
1				5					10					15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 21

Leu	Pro	Val	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Xaa	Glu	Ala	Met	Xaa	Ile	Gly
1				5					10					15

60 <210> 22

ES 2 798 400 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

10 <400> 22

	Val	Ile	Gly	Met	Asp	Val	Ala	Ala	Ser	Glu	Phe	Phe	Xaa	Ser	Gly
	1				5					10					15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

20 <400> 23

	Lys	Xaa	Ile	Ala	Lys	Ala	Val	Asn	Glu	Lys	Ser	Cys	Asn	Cys	Leu
	1				5					10					15

25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

35 <400> 24

	Lys	Ala	Lys	Phe	Ala	Gly	Xaa	Asn	Phe	Xaa	Asn	Pro	Leu	Ala	Lys
	1				5					10					15

40 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 25

	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile
	1				5					10					15

50 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 26

	Gly	Ile	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Pro
	1				5					10					15

60 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

65 <400> 27

ES 2 798 400 T3

Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28
 Gly Glu Pro Gly Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29
 Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 30
 Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Xaa Gly Ala Ala Gly Ile
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 31
 Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Xaa Gly Glu Xaa Gly Phe Pro
 1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32
 Ala Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 798 400 T3

<400> 33
 Lys Glu Gly Leu Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly
 1 5 10 15

5 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 34
 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly
 1 5 10 15

15 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 35
 Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu Ser Leu Gln
 1 5 10 15

25 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 36
 Lys Gly Val Pro Leu Tyr Xaa His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn
 1 5 10 15

35 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 37
 Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly
 1 5 10 15

45 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 38
 Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Asn Gly Glu Pro Gly
 1 5 10 15

55 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 39

ES 2 798 400 T3

Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40
 Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 41
 Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly
 1 5 10 15
 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42
 Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Met Gly Pro Ser
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43
 Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly Glu Pro Gly
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44
 Gly His Arg Gly Phe Thr Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 45
 Xaa Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Xaa Gly Phe Pro Gly Thr
 1 5 10 15

ES 2 798 400 T3

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 10
 <400> 46

 Ala Pro Gly Asn Xaa Gly Phe Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly
 1 5 10 15

 15 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

 25 <400> 47

 Pro Lys Gly Ala Asn Gly Asp Pro Gly Xaa Pro Gly Glu Pro Gly
 1 5 10 15

 30 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

 40 <400> 48

 Gln Gly Pro Xaa Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Thr Asp Gly Pro
 1 5 10 15

 45 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 50 <400> 49

 Met Ser Thr Arg Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Arg Met Phe
 1 5 10 15

 55 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 60 <400> 50

 Tyr Arg Arg Met Phe Gly Gly Pro Gly Thr Ala Ser Arg Pro Ser
 1 5 10 15

 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 798 400 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

5 Ser Ser Arg Ser Tyr Val Thr Thr Ser Thr Arg Thr Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

15 Tyr Ala Thr Arg Ser Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

25 Ser Ala Val Arg Leu Arg Ser Ser Val Pro Gly Val Arg Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

35 Gly Val Arg Leu Leu Gln Asp Ser Val Asp Phe Ser Leu Ala Asp
 1 5 10 15

<210> 55

35 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

40 Phe Lys Asn Thr Arg Thr Asn Glu Lys Val Glu Leu Gln Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 56

45 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 56

50 Leu Leu Ala Glu Leu Glu Gln Leu Lys Gly Gln Gly Lys Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 57

55 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

 Glu Leu Arg Arg Gln Val Asp Gln Leu Thr Asn Asp Lys Ala Arg
 1 5 10 15

ES 2 798 400 T3

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58
 Val Asp Gln Leu Thr Asn Asp Lys Ala Arg Val Glu Val Glu Arg
 1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59
 Asn Asp Lys Ala Arg Val Glu Val Glu Arg Asp Asn Leu Ala Glu
 1 5 10 15
 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 60
 Asn Thr Leu Gln Ser Phe Arg Gln Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 61
 Phe Arg Gln Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu Ala Arg Leu Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 62
 Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Val Glu Ser Leu Gln Glu Glu
 1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63
 Asp Val Arg Gln Gln Tyr Glu Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln
 1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 60

ES 2 798 400 T3

<400> 64
 Tyr Lys Ser Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg Asn
 1 5 10 15

5 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 65
 Ser Thr Glu Tyr Arg Arg Gln Val Gln Ser Leu Thr Cys Glu Val
 1 5 10 15

15 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 66
 Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu
 1 5 10 15

25 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 67
 Arg Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile
 1 5 10 15

35 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 68
 Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu Glu
 1 5 10 15

45 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 69
 Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Leu Pro Leu
 1 5 10 15

55 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 70
 Gly Gln Val Ile Asn Glu Thr Ser Gln His His Asp Asp Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 71

ES 2 798 400 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

10

<400> 71

	Met	Ser	Thr	Xaa	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Met	Phe
	1				5					10					15

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

20

<4> 72

	Tyr	Xaa	Xaa	Met	Phe	Gly	Gly	Pro	Gly	Thr	Ala	Ser	Xaa	Pro	Ser
	1				5					10					15

25

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <221> Misc-feature
 <223> Xaa es citrulina

35

<400> 73

	Ser	Ser	Xaa	Ser	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Xaa	Thr	Tyr	Ser	Leu
	1				5					10					15

40

<210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

<400> 74

	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Xaa	Thr	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Leu	Xaa
	1				5					10					15

50

<210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina

60

<400> 75

ES 2 798 400 T3

Ser Pro Gly Gly Val Tyr Ala Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu
 1 5 10 15
 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 76
 Tyr Ala Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro
 1 5 10 15
 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 77
 Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro Gly Val Xaa Leu Leu
 1 5 10 15
 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 78
 Gly Val Xaa Leu Leu Gln Asp Ser Val Asp Phe Ser Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Xaa es citrulina
 <400> 79
 Phe Lys Asn Thr Xaa Thr Asn Glu Lys Val Glu Leu Gln Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 798 400 T3

<223> Xaa es citrulina

<400> 80

5 Leu Leu Ala Glu Leu Glu Gln Leu Lys Gly Gln Gly Lys Ser Xaa
 1 5 10 15

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
10 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina
15 <

<400> 81

20 Phe Xaa Gln Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu Ala Xaa Leu Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
25 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina

30 <400> 82

 Asp Asn Ala Ser Leu Ala Xaa Leu Asp Leu Glu Xaa Lys Val Glu
 1 5 10 15

<210> 83
35 <211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina

<400> 83

45 Ser Thr Glu Tyr Xaa Xaa Gln Val Gln Ser Leu Thr Cys Glu Val
 1 5 10 15

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina
55

<400> 84

 Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Xaa Leu
 1 5 10 15

60 <210> 85
<211> 15

ES 2 798 400 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
5 <221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina

<400> 85

10 Xaa Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile
1 5 10 15

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina

20 <400> 86

Xaa Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Xaa Ile Ser Leu Pro Leu
1 5 10 15

25 <210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Xaa es citrulina

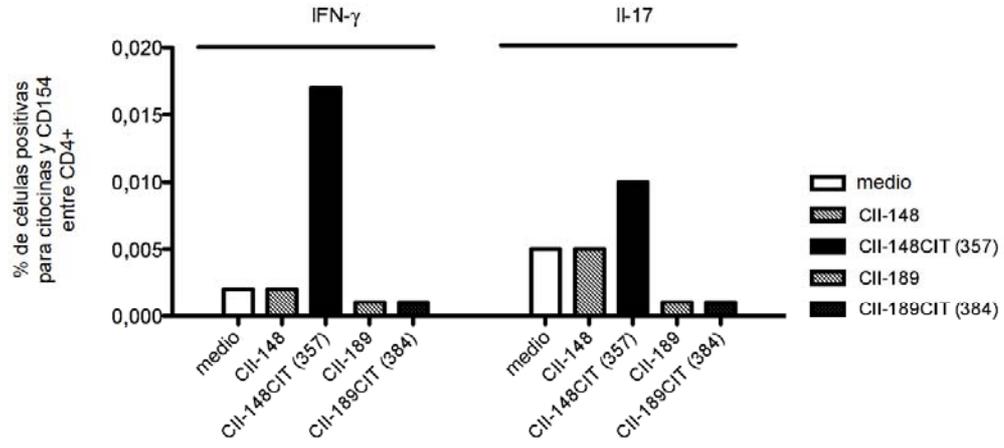
<400> 87

35 Thr His Ser Lys Xaa Thr Leu Leu Ile Lys Thr Val Glu Thr Xaa
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO 22.
- 5 2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido se une al MHC y es capaz de inducir la unión de un receptor de linfocitos T de un linfocito T y proporcionar una señal al linfocito T que activa el linfocito T.
3. Un complejo de un péptido según la reivindicación 1 o 2 y una proteína del MHC de clase II recombinante humana.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según la reivindicación 1 o 2 o un complejo según la reivindicación 3.
5. Un ensayo para el análisis de linfocitos T de un paciente, que comprende
 - 15 1) poner en contacto una muestra que comprende linfocitos T obtenidos de un paciente con un péptido según la reivindicación 1 o 2 o un complejo según la reivindicación 3; y
 - 2) detectar la capacidad de los linfocitos T para ser activados por el péptido o complejo.
- 20 6. Un complejo según la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis.
7. Un péptido según la reivindicación 1 o 2 o un complejo según la reivindicación 3 para su uso en el diagnóstico de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis.
- 25 8. Un equipo de herramientas que comprende un péptido según la reivindicación 1 o 2 o un complejo según la reivindicación 3.

A)



B)

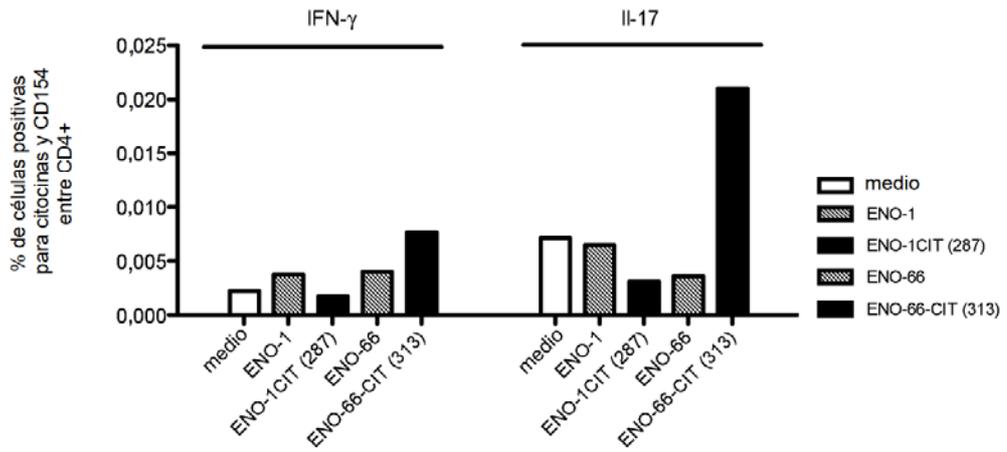


Fig. 1

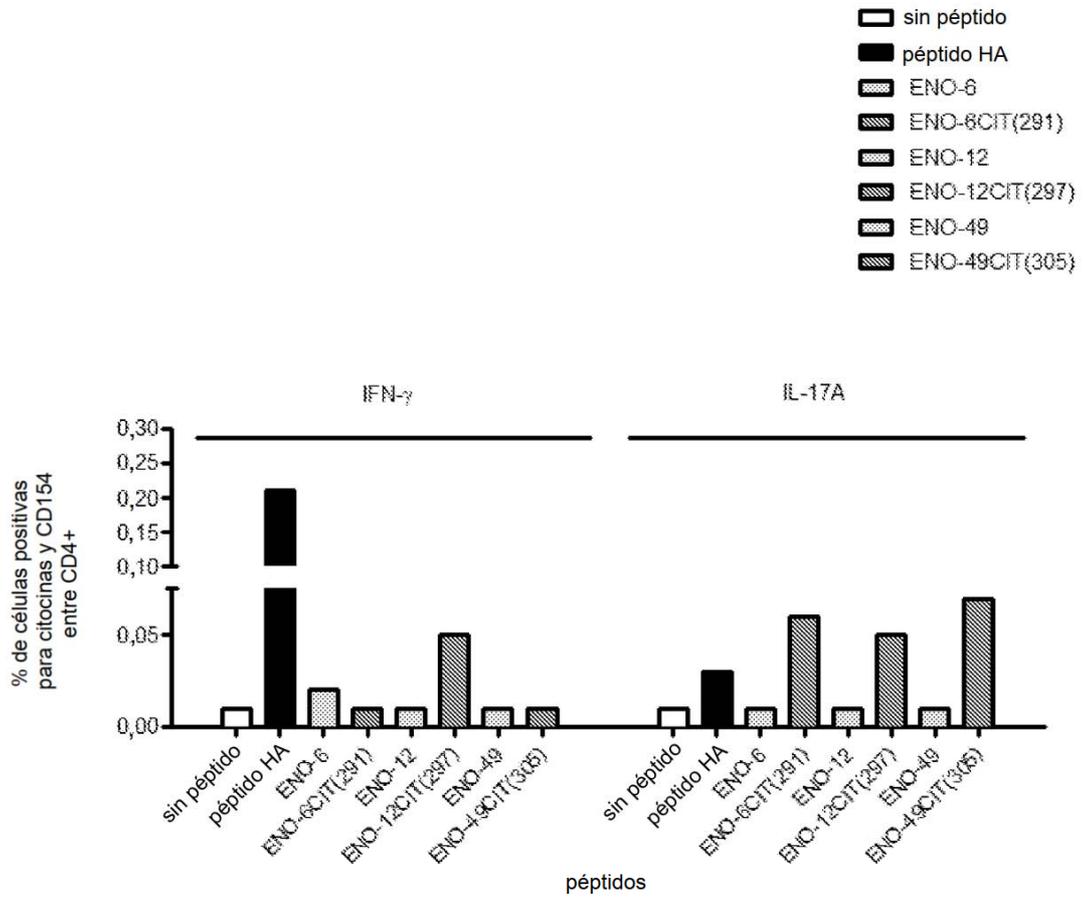


Fig. 2

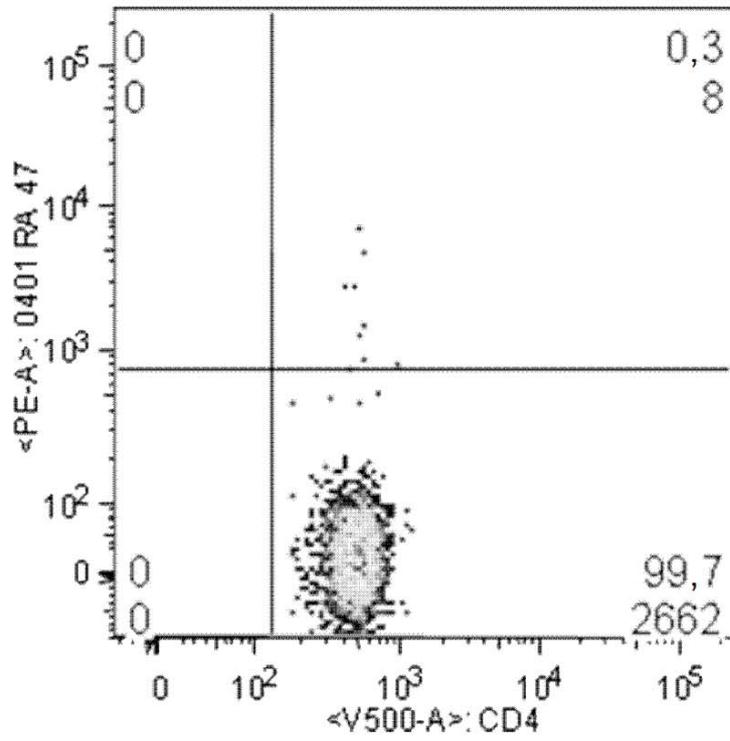


Fig 3.