

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 407**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06813012 .9**
96 Fecha de presentación: **15.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948226**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Compuesto que comprende un péptido autoantigénico y un portador con un motivo de unión a CMH**

30 Prioridad:
17.11.2005 SE 0502530
12.01.2006 US 758481 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2012

73 Titular/es:
Holmdahl, Rikard
Medevigatan 14
113 61 Stockholm, SE

72 Inventor/es:
KIHLBERG, Jan;
DZHAMBAZOV, Balik;
VESTBERG, Mikael y
HOLMDAHL, Rikard

74 Agente/Representante:
No consta

ES 2 387 407 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

Compuesto que comprende un péptido autoantigénico y un portador con un motivo de unión a CMH.

Campo de invención

- 5 La invención se refiere a un compuesto que comprende (a) un péptido y (b) un portador, en el que dicho péptido tiene al menos el motivo indicado en las reivindicaciones, en el que al menos un residuo de lisina está glicosilado, estando unido dicho péptido a la proteína de unión a péptido y dicho portador comprende al menos una región variable de CMH de clase II que se une a dicho péptido así como composiciones farmacéuticas que comprenden dicho compuesto y el uso de dicho compuesto o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad, tal como una enfermedad inflamatoria de las articulaciones.
- 10 El documento WO-A-01036448 (Cell-Sci. Corp.) da a conocer conjugados de CMH con diferentes péptidos relacionados con enfermedades autoinmunitarias y su uso en la terapia de dichas enfermedades autoinmunitarias.

Antecedentes de la invención

- 15 Hay una población creciente de seres humanos que padecen diferentes clases de enfermedades inflamatorias de las articulaciones. Enfermedades, que algunas veces son imposibles de curar, en las que el tratamiento es de por vida y en las que los síntomas a menudo empeoran durante los años. Hasta la fecha, el foco del tratamiento ha sido intentar encontrar compuestos que reduzcan los síntomas pero no curar la enfermedad o hacer que la enfermedad decaiga.

- 20 Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es la artritis reumatoide (AR), que se caracteriza por inflamación crónica de los tejidos sinoviales articulares iniciada por la infiltración de leucocitos (principalmente neutrófilos, macrófagos y células T) y la secreción de citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1, IL-6), quimiocinas y enzimas destructoras tales como metaloproteinasas de la matriz. Se cree que la activación de células T es un factor patógeno importante en la enfermedad aunque no se ha identificado aún su papel exacto y su potencial como diana terapéutica. La activación anómala de células T, sin embargo, se produce lo más probablemente años antes del diagnóstico clínico de la enfermedad ya que los anticuerpos de IgG dependientes de células T específicos para Fc de inmunoglobulinas (es decir, factores reumatoides) y los epítomos proteicos citrulinados son altamente predictivos para la enfermedad (1, 2). De manera importante, el riesgo de desarrollar artritis aumenta drásticamente en individuos que tanto tienen tales anticuerpos como expresan determinadas moléculas de CMH de clase II, que comparten un bolsillo peptídico específico, el denominado epítomo compartido del CMH (3, 4). La región de CMH de clase II también es el factor genético conocido más fuerte asociado con AR. Conjuntamente, estos hallazgos sostienen un papel patógeno de células T autorreactivas restringidas por CMH de clase II. Sin embargo, ha sido difícil identificar una especificidad única de tales células T, aunque se ha notificado reactividad de células T frente a varios autoantígenos, tales como BiP, RA33 y GPI y también antígenos específicos de articulaciones tales como colágeno de tipo II (CII) (5-8).

Puesto que no hay modo ninguno de curar enfermedades inflamatorias de las articulaciones en la actualidad, hay una necesidad de desarrollar un modo para curar la enfermedad.

- 35 Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es solucionar el problema comentado anteriormente en relación con enfermedades inflamatorias de las articulaciones.

- 40 Se ha encontrado sorprendentemente que mediante el uso de un compuesto que comprende (a) un péptido y (b) un portador, en el que dicho péptido tiene al menos los motivos mostrados en las reivindicaciones, en el que al menos un residuo de lisina está glicosilado, estando unido dicho péptido a la proteína de unión a péptido y dicho portador comprende al menos una región variable de CMH de clase II variable que está unida a dicho péptido, es posible por primera vez reducir y/o eliminar una enfermedad inflamatoria de las articulaciones. De ese modo, un mamífero que padece una enfermedad de este tipo se curará o al menos se reducirá la enfermedad.

- 45 Adicionalmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto así como el uso de dicho compuesto para el tratamiento de un trastorno o enfermedad inflamatoria, tal como artritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, osteoartritis, policondritis recidivante y enfermedad de Menieres

En una realización específica, dicho compuesto se usa para vacunar a un mamífero y de ese modo curar o prevenir un trastorno o enfermedad inflamatoria.

- 50 Se describirán en más detalle ventajas y objetos adicionales con la presente invención, entre otros con referencia a los dibujos adjuntos.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra que complejos de péptido/A^q activan hibridomas de células T específicos de antígeno. (A) hibridoma HCQ.3, específico para el epítipo GalOK264 CII259-273; (B) hibridoma HCQ.4, específico para el epítipo (K264) CII259-273 no modificado.

5 La figura 2 muestra una prueba cruzada de especificidades de hibridomas de células T para complejos de péptido/Aq. (A) Hibridoma HCQ.3, específico para el epítipo GalOK264 CII259-273; (B) Hibridoma HCQ.4, específico para el epítipo (K264) CII259-273 no modificado.

10 La figura 3 muestra que complejos de GalOK264/Aq suprimen el desarrollo de CIA. (A) Incidencia de artritis (porcentaje de ratones afectados); (B) puntuación clínica media de la gravedad de la artritis incluyendo ratones tanto artríticos como sanos; (C) niveles séricos de IgG anti-CII. Todos los datos representan la media \pm D.E. de 10 ratones por grupo. *, p<0,05; **, p<0,01 y ***, p<0,001.

La figura 4 muestra que complejos de GalOK264/A^q reducen la progresión de la artritis en un estadio crónico. (A) Puntuación de artritis media durante 202 días de los ratones crónicos elegidos para el tratamiento; (B) puntuación clínica media de ratones tratados con GalOK264/A^q tras la reinmunización; (C) niveles séricos de IgG anti-CII.

15 La figura 5 muestra que la transferencia de células T desde ratones tratados con GalOK264/A^q proporcionaba protección frente al desarrollo de CA. (A) Puntuación clínica media de artritis tras la transferencia de células T; (B) niveles séricos de IgG anti-CII.

La figura 6 muestra que el tratamiento con GalOK264/A^q bloqueaba la progresión de la artritis en ratones F1 H2q/r.

Descripción detallada de la invenciónDefiniciones

20 En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

El término "molécula de CMH de clase II" pretende significar una proteína que consiste en una cadena alfa y una beta, codificada a partir de dos genes distintos. Esta proteína normalmente está unida a la superficie celular sobre las denominadas células presentadoras de antígeno (APC) y sirve como receptor para péptidos. El péptido se une a un sitio específico, el sitio de unión a péptido, en la molécula de CMH y la estructura proteica resultante (el péptido unido a la molécula de CMH de clase II de dos cadenas) se reconoce por el receptor de células T. Esta interacción es el acontecimiento molecular y específico de antígeno crucial en la respuesta inmunitaria y se ha descrito bien. El término "motivo de unión a CMH" pretende significar los aminoácidos de la región variable, (es decir, polimórfica) de una molécula de CMH de clase II, que puede entrar en contacto y unirse al péptido de la invención en el sitio de unión a péptido. La región variable de una molécula de CMH de clase II se define como los primeros residuos de aminoácido 1-90 de la cadena alfa y la beta en la forma observada sobre la superficie celular. El término "región variable en la molécula de CMH" pretende significar el primer dominio de las cadenas tanto alfa como beta que abarcan cada una los aminoácidos 1-90.

25

30

El término "región constante en una molécula de Ig o CMH" pretende significar la parte de la molécula de CMH de clase II que no es parte de los dominios/regiones variables.

35 El término "portador" pretende significar un compuesto, tal como una proteína, que puede unirse al péptido de la invención y presentar ese péptido particular a receptores de células T específicos. Receptores de células T (TCR) que normalmente se unen a células T que reconocen normalmente colágeno de tipo II, una proteína del cartílago articular.

40 El término "péptido" pretende significar una secuencia de residuos de aminoácido que tiene desde seis hasta 50 residuos de aminoácido.

El término "polipéptido" pretende significar una secuencia de residuos de aminoácido que tiene más de 51 o más residuos de aminoácido.

En el presente contexto, se usan nombres de aminoácidos y nombres de átomos tal como se definen por Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org), que se basa en la nomenclatura de la IUPAC (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (nombres de residuos, nombres de átomos etc.), Eur J Biochem., 138, 9-37 (1984) junto con sus correcciones en Eur J Biochem., 152, 1 (1985). El término "aminoácido" pretende indicar un aminoácido del grupo que consiste en alanina (Ala o A), cisteína (Cys o C), ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E), fenilalanina (Phe o F), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), lisina (Lys o K), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), asparagina (Asn o N), prolina (Pro o P), glutamina (Gln o Q), arginina (Arg o R), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), valina (Val o V), triptófano (Trp o W) y tirosina (Tyr o Y), o derivados de los mismos.

45

50

DescripciónCompuesto

La invención se refiere a un compuesto, que comprende un péptido y un portador.

5 Dicho péptido tiene al menos los motivos indicados en las reivindicaciones, en el que al menos un residuo de lisina está glicosilado, tal como una galactosa O-unida. Otros ejemplos de las estructuras glicosiladas son N-acetilgalactosamina, glucosa, N-acetilglucosamina, glucosa, manosa, fucosa, así como sus derivados mono- y di-desoxigenados, mono- y difluorogenados, y de C-glicósido. Dicho péptido está unido al portador y la unión entre dicho péptido y dicha proteína de unión a péptido puede ser covalente o pueden unirse de otro modo siempre que puedan unirse y permanecer unidos entre sí. El residuo de aminoácido glicosilado K de dicho péptido puede ser hidroxilisina. Dicho péptido comprende desde 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 residuos de aminoácido. Dicho péptido comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos IAGFKGERGPKG, A-G-F-K-G-E-A o A-A-A-K-A-A-A en las que K puede ser hidroxilisina. Adicionalmente, dicho péptido tiene también un motivo de unión a CMH de clase II, es decir, tiene la capacidad para unirse a una molécula de este tipo. Un motivo de unión a CMH de clase II puede unirse a una estructura tridimensional formada por las cadenas alfa y beta del primer dominio de la molécula de CMH de clase II. Los aminoácidos de importancia crítica para esta estructura de unión a péptido están ubicados ambos en una lámina plegada en beta que forma la parte inferior de la estructura de unión a péptido (alfa 1-49, beta 1-49) y dos hélices alfa (alfa 50-80, beta 50-90) que forman los lados de esta estructura que forma una hendidura.

20 Los péptidos que forman motivos específicos únicos para cada alelo del CMH de clase II se unen a esta estructura de unión a péptido. Los alelos del CMH de clase II asociados con artritis reumatoide forman una estructura de unión a péptido con muchas similitudes, lo que ocasiona que se unan a péptidos con determinados motivos de unión. Un ejemplo de un péptido, según la invención, se deriva del colágeno II, posiciones 260-273 (IAGFKGEQGPKEGEP) que se une a las moléculas DRB 1*0401/DRA, DRB 1*1001/DRA y DRB1*0101/DRA. Sin embargo, el péptido puede ser sintético o semisintético o derivarse de otras proteínas siempre que el péptido sea idéntico o tenga una estructura similar al péptido anterior. Se ha planteado la hipótesis de que las posiciones de unión al CMH para la unión a la molécula DRB 1*0401/DRA son F263 y E266 en este péptido y las posiciones de unión a TCR K264, Q267 y K270. Estas posiciones de contacto con TCR podrían ser de diferente importancia para diferentes TCR, es decir, podrían sustituirse en otros residuos de aminoácido.

30 Adicionalmente, el péptido mencionado anteriormente (IAGFKGEQGPKEGEP) puede tener una o más modificaciones tales como hidroxilación, galactosilación o galactoglucosilación. Ejemplos de posiciones, que podrían modificarse, son las posiciones K264 y K270 así como la desamidación de la posición Q267. Por consiguiente, uno o más de los residuos de aminoácido pueden sustituirse por otro residuo de aminoácido siempre que tengan la capacidad para ser parte del motivo de unión a CMH y funcionen como una composición que puede usarse para prevenir/reducir o tratar a un mamífero que padece un trastorno o enfermedad inflamatoria de las articulaciones o inducir una respuesta inmunitaria y de ese modo funcionar como una vacuna. Los ejemplos de mamíferos incluyen ser humano, perro, cerdo, oveja, gato, camello y caballo.

40 El portador del compuesto al que se une el péptido comprende al menos la región variable de la molécula de CMH de clase II, definiéndose como los primeros dominios de la cadena alfa y la beta, es decir, los primeros residuos de aminoácido 1-90 de la cadena alfa y la beta y una región constante. Las cadenas alfa y beta se unen entre sí, tal como mediante un dominio de cremallera de leucinas. El portador comprende al menos al menos un motivo de unión a CMH que se une a dicho péptido. Sin embargo, pueden sustituirse uno o más residuos de aminoácido siempre que el portador pueda unirse al péptido e inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. La parte variable puede modificarse por hasta 30 residuos de aminoácido, tales como 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, 28, 29 ó 30 residuos de aminoácido. Ejemplos de regiones variables son las que se originan a partir de las moléculas de CMH de clase II DRB 1*0401/DRA, DRB1*0402/DRA, DRB1*0403/DRA, DRB1*0404/DRA, DRB1*0405/DRA, DRB1*0406/DRA, DRB1*0407/DRA, DRB1*0408/DRA, DRB1*0409/DRA, DRB1*0410/DRA, DRB1*0101/DRA, DRB1*0102/DRA, DRB1*1001/DRA, DRB1*1002/DRA. Se representan secuencias de ejemplo de una de las secuencias que van a usarse; SEQ NO 1, dominio DRA V y SEQ NO 2, dominio DRB 1*0401 V.

50 Según una realización, el compuesto comprende el péptido identificado anteriormente y el portador comprende una región variable y una constante, en el que dicha región variable comprende un péptido que tiene el 80% de identidad con la secuencia polipeptídica en su longitud completa mostrada en SEQ ID NO 1 y un segundo polipéptido que tiene el 80% de identidad en su longitud completa con la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 2, tal como el 85, el 90, el 95 o el 100% de identidad en su longitud completa con uno o ambos de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NO 1 y 2.

55 El portador también puede contener una o más regiones constantes, tales como las regiones constantes de la molécula de CMH de clase II o regiones de una inmunoglobulina tales como las regiones constantes de IgG. Por ejemplo, el primer dominio de clase II (es decir, el dominio variable o polimórfico) puede unirse covalentemente a la estructura de IgG cambiando los primeros dominios V de las cadenas VH y VL. Las regiones constantes y variables pueden

unirse covalentemente entre sí. Dicha región constante puede seleccionarse del grupo que consiste en la región constante de una molécula de CMH de clase II o una inmunoglobulina. Un ejemplo de una región constante es una que comprende un péptido que tiene el 80% de identidad con la secuencia polipeptídica en su longitud completa mostrada en SEQ ID NO 3 y un segundo polipéptido que tiene el 80% de identidad en su longitud completa con la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 4, tal como que tiene el 90% o el 95% de identidad con la secuencia polipeptídica en su longitud completa mostrada en SEQ ID NO 3 y un segundo polipéptido que tiene el 90% o el 95% de identidad en su longitud completa con la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 4 o que es idéntico a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 3 y 4.

En otra realización, la región constante del portador puede ser una secuencia polipeptídica que es al menos el 25% de las secuencias polipeptídicas SEQ ID NO 3 y 4, es decir, la región constante del CMH de clase II, tal como el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100%. Adicionalmente, puede haber una o más sustituciones de los polipéptidos siempre que las secuencias polipeptídicas se unan entre sí para formar un portador tal como se definió anteriormente. Las secuencias polipeptídicas pueden unirse covalentemente entre sí a través de un dominio de cremallera de leucinas o parte de un dominio de cremallera de leucinas.

SEQ ID NO1:

Dominio DR alfa V:

**IKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGD EIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFA
SFEAQGALANIAVDKANLEIMTKRSNYT**

SEQ ID NO2:

El dominio DR beta V (a partir de DRB 1*0401)

**GDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSADVGEYRAV
TELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTYCRHNYGVGESFT**

SEQ ID NO3:

Dominio constante DR alfa que va a usarse:

**PITNVPPEVTVL TNSPVELREPNV LICFIDKFTPPVVNVTWLRNGKPVTTGVSETVF
LPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWEF
DAPSPLPETTEN**

SEQ ID NO4:

Dominio constante DR beta (a partir de DRB 1*0401) que va a usarse:

**VQRRVYPEVTVYP AKTQPLQH HLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGV
VSTGLIQNGDWFQTLV MLETVPRSGEVYTCQVEHPSL TSPLTVEWRARSES
AQS**

Composición farmacéutica

Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido anteriormente y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones farmacéuticas del compuesto de la invención se administran normalmente en una composición que incluye uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que es suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para su administración a seres humanos y animales. La composición farmacéutica puede estar liofilizada.

“Farmacéuticamente aceptable” significa un portador, diluyente o excipiente que a la dosificación y concentraciones empleadas no provoca ningún efecto no deseado en los pacientes a los que se administra. Tales portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica (véase Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000).

5 La composición farmacéutica puede mezclarse con adyuvantes tales como lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinil-pirrolidina y/o poli(alcohol vinílico), prepararse en comprimidos o encapsularse para administración convencional. Alternativamente, pueden disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceites (tales como aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma tragacanto y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien en la técnica farmacéutica. El portador o diluyente puede incluir un material de retraso temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc., por ejemplo, tal como se describió en otra parte en el presente documento.

15 La composición farmacéutica según la invención puede administrarse de manera local o sistémica tal como por vía tópica, por vía intravenosa, por vía oral, por vía parenteral o como implantes e incluso uso rectal si es posible. Formas de preparación farmacéutica sólida o líquida adecuadas son, por ejemplo gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o disolución inyectable en forma de ampolla y también se usan de manera habitual preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en la preparación de excipientes, diluyentes, adyuvantes o portadores tal como se describió anteriormente.

20 La composición farmacéutica se administrará a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Por "dosis farmacéuticamente eficaz" quiere decirse una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados en relación con el estado para el que se administra. La dosis exacta depende de la actividad del compuesto, manera de administración, naturaleza y gravedad del trastorno, edad y peso corporal del paciente y pueden necesitarse dosis diferentes. La administración de la dosis puede llevarse a cabo tanto mediante una única administración en forma de una unidad de dosis individual o si no varias unidades de dosis más pequeñas como también mediante administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos, por ejemplo vacunación.

25 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. Estos agentes pueden incorporarse como parte de la misma composición farmacéutica o pueden administrarse por separado.

30 El "paciente" para los fines de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros mamíferos. Por tanto, los métodos son aplicables a tanto terapia de seres humanos como aplicaciones veterinarias.

35 Las formulaciones farmacéuticas de la molécula de secuencia de nucleótidos o polipéptido de la invención se administran normalmente en una composición que incluye uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que es suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para su administración a seres humanos y animales.

40 En un aspecto final, el compuesto mencionado anteriormente así como la composición farmacéutica pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno tal como una enfermedad inflamatoria de las articulaciones, a través de vacunación. Ejemplos de enfermedades son artritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, osteoartritis, policondritis recidivante y enfermedad de Menieres.

45 La vacunación puede realizarse mediante el uso de cualquier sistema de vacunación tal como vacunación con ADN en la que se usa ADN que se traduce en proteínas *in vivo* que corresponden a las estructuras descritas anteriormente. Dicho ADN puede administrarse como ADN puro o insertarse en estructuras portadoras.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención de cualquier manera, forma, o modo, o bien explícitamente o bien implícitamente.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Diseño de los constructos de A^q de CMH de clase II

50 Se amplificaron los ADNc para Aalfa^q y Abeta^q a partir de una reacción de ADNc de primera hebra (ADNc de primera hebra, Pharmacia, Piscataway, NJ). Se modificaron además los ADNc para incluir sitios de clonación inmediatamente en el sentido de 5' del codón de iniciación, y se reemplazó el extremo 3' del dominio de transmembrana y en el sentido de 3' por un sitio de clonación en marco. Luego, se clonó en marco el ADN para el dominio de cremallera de leucinas (13) de Jun incluyendo un extremo 3' que codifica para 6 histidinas con el ADNc de cadena beta. Se añadió el ADN para el dominio de cremallera de leucinas de Fos al constructo de cadena alfa. Se clonaron los constructos resultantes por separado en pMTAL (Invitrogen, La Jolla, CA) o pRmHa-3 (14) para permitir la expresión inducida

por metales pesados en células de insecto. pMTAL contiene el gen de resistencia a la higromicina. Cuando se usó pRmHa-3, se usó un gen de higromicina dirigido por el promotor Copia como marcador de selección.

EJEMPLO 2

Transfección, expresión y purificación de A^q soluble

5 Se cotransfectaron los constructos de cadena alfa de A^q y cadena beta de A^q linealizados a razones equimolares en células SL2 de *Drosophila melanogaster* (ATCC, CRL-1963) usando transfección con fosfato de calcio. Se derivaron transfectantes estables mediante selección con higromicina y se mantuvieron bajo selección en medio de *Drosophila* de Schneider (Gibco™, Paisley, Escocia, RU) que contenía 100 µg/ml de higromicina B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Se prepararon cultivos celulares a gran escala en botellas Fernbach usando un agitador magnético. Para la expresión de A^q soluble, se hicieron crecer células transfectadas en medio completo de expresión de insectos libre de suero (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) a 25°C, se indujeron con CuSO₄ 0,7 mM durante tres días y se clarificaron los sobrenadantes mediante centrifugación y filtración. Las células SL2 produjeron ~2-3 mg de proteína recombinante por litro de cultivo. Se purificaron las moléculas de A^q solubles expresadas del medio clarificado usando cromatografía de afinidad de Ni-NTA (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y el protocolo recomendado del fabricante. Se examinaron las fracciones de proteína dializadas mediante análisis de ELISA, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. El análisis de SDS-PAGE no reductor de A^q purificada con NiNTA sobre un gel en gradiente del 4-20% mostró dos bandas con pesos moleculares de 29 y 33 kDa (aproximadamente los tamaños previstos de las cadenas alfa y β beta), lo que demuestra que las proteínas expresadas forman heterodímeros que consisten en cadenas alfa y beta. Se agruparon fracciones positivas, se concentraron de 5 a 10 veces mediante dispositivos de filtración centrífuga MICROSEP 30K OMEGA (PALL, GelmanSciences, Ann Arbor, MI) o Amicon® (MILLIPORE Co, Billerica, MA) y se cargaron con un péptido para formar complejos de péptido-CMH. Se terminaron todas las concentraciones de proteína usando un ensayo de proteína Dc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

EJEMPLO 3

Análisis de ELISA, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de A^q

25 Se detectaron las cadenas alfa y beta de la proteína A^q purificada mediante ELISA de tipo sándwich, usando AcM Y3P (específico para la cadena alfa nativa) como anticuerpos de captura y AcM 7-16.17 biotinilado (BD PharMingen, Los Angeles, CA) (específico para la cadena beta) como anticuerpos de detección. Se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con Y3P 2,5 µg/ml y se incubaron durante la noche a 4°C. Entonces se lavaron las placas con PBS, se bloquearon con BSA al 1% (Sigma, St Louis, MO) en PBS durante 1 h, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 2 h con 50 µl de las fracciones de proteína a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo las placas, seguido por la adición de 7-16.17 1 µg/ml biotinilado durante 1 h. Tras lavar, se detectó el anticuerpo marcado con biotina mediante estreptavidina marcada con europio usando el sistema DELFIA (Wallac, Turku, Finlandia).

35 Se evaluó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE. Se sometieron a electroforesis muestras en minigeles Ready en gradiente de poliacrilamida del 4-20% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en condiciones desnaturalizantes y no reductoras y se tiñeron los geles con plata según las instrucciones del fabricante. En experimentos paralelos, se electrotransfirieron los geles sobre membranas de nitrocelulosa (0,45 µm). Se bloquearon las membranas en leche en polvo desnatada al 5% en PBS durante 1 h y se sometieron a inmunotransferencia con diferentes anticuerpos específicos de CMH de clase II (M5/114, 7-16.17, 7-23.1, PCQ.6, 34-5-3, Y3P) a 4°C durante la noche. Tras lavar repetidamente, se incubaron las inmunotransferencias con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón o de cabra anti-IgG de rata (para M5/114) conjugados con peroxidasa (Jackson) durante 1 h. Se revelaron las inmunotransferencias usando DAB (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

EJEMPLO 4

Preparación de complejos de péptido/A^q

Se cargaron moléculas de A^q solubles vacías con un exceso molar de 5 a 50 veces de péptidos GalOK264 CII259-273, CII259-273 no modificados o MOG79-90 a 4°C durante 72 h. GalOK264 CII259-273 es un péptido de la posición 259-273 de colágeno de tipo II (CII) que tiene una lisina en la posición 264, que está hidroxilada y galactosilada.

50 No modificado es el mismo péptido pero con una lisina sin modificaciones de su cadena lateral. MOG= glicoproteína oligodendrocítica de mielina. Se separaron los complejos de CMH-péptido mediante HPLC de intercambio aniónico (columna Resource™ Q) usando un sistema ÄKTA™ explorer 100 Air (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) con el software UNICORN V4.00. Se realizaron las separaciones con una disolución de carga de Tris 10 mM pH 8,5 (tampón A) y una elución en gradiente hasta NaCl 1 M (tampón B) en Tris 10 mM. Se concentraron las fracciones de proteína eluidas mediante ultrafiltración (MICROSEP 30K OMEGA), se dializaron frente a PBS y se examinaron mediante pruebas de ELISA, SDS-PAGE e hibridoma de células T. Se purificaron además complejos de CMH-péptido en una columna de filtración en gel Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sue-

cia), se concentraron de nuevo mediante dispositivos de filtro centrífugo Amicon® (MILLIPORE Co, Billerica, MA) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

EJEMPLO 5

Activación de hibridomas de células T

5 Se diluyeron complejos de péptido/A^q en PBS estéril y se recubrieron sobre placas mediante incubación a 4°C durante la noche o se añadieron directamente en forma soluble a los hibridomas. Entonces se lavaron dos veces las placas recubiertas con PBS estéril para eliminar los complejos proteicos no unidos, y se añadieron 5x10⁴ células de hibridoma T por pocillo en 200 µl de DMEM complementado con FCS al 5%, penicilina 100 UI/ml y estreptomina 100 µg/ml. Se han usado hibridomas de células T HCQ.3 y HCQ.4, específicos para GalOK264 y para CII259-273 no modificado (K264), respectivamente (12) en la figura 1. Para bloquear la activación de los hibridomas, se añadieron 10 5 ug/ml de anticuerpos 7-16.17 a los complejos inmovilizados. En la prueba cruzada (figura 2), se añadieron directamente cinco ug/ml de complejos de péptido/A^q solubles (sin recubrimiento) a células de hibridoma HCQ.3 y HCQ.4 (5x10⁴). Se usó medio solo (sin antígeno) como control negativo.

15 Después de 24 h, se midió la IL-2 en los sobrenadantes del cultivo mediante ELISA de tipo sándwich usando el sistema DELFIA (Wallac, Turku, Finlandia). IL-2 de ratón recombinante sirvió como control positivo y patrón. Se representan los datos como media ± D.E. de muestras por triplicado.

EJEMPLO 6

Inducción y evaluación clínica de la artritis

Animales

20 Se usaron ratones macho B10.Q, (B10.QxB10.RIII)F1 o B10.Qx(BALB/cxB10.Q)F2, de 8-10 semanas de edad, en los experimentos. Los fundadores de los ratones B10.Q y B10.RIII los proporcionó originariamente el Dr. Jan Klein (Tübingen, Alemania) y los ratones BALB/c se adquirieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se criaron y usaron los ratones en el departamento animal de Medical Inflammation Research (<http://www.inflam.lu.se>) y se mantuvieron en condiciones normalizadas.

25 En la figura 3 se usan ratones B10.Q (10 animales por grupo), que se inmunizaron con 100 ug de CII de rata en CFA en el día 0 y se reforzaron en el día 35 con 50 ug de CII de rata en IFA. En los días 20 y 34 (flechas), se trataron los ratones mediante administración intravenosa de complejos de péptido/A^q purificados (100 ug en 200 ul de PBS). Se recogieron sueros de muestra en los días 35 y 70 tras la inmunización y se incubaron en diluciones en serie en pocillos recubiertos con CII de rata. Se midieron los niveles de anticuerpos anti-CII de IgG mediante ELISA.

30 En la figura 4 se usan ratones B10.Q(BALB/cxB10.Q)F1 que se inmunizaron con 100 ug de CII de rata emulsionado en IFA en el día 0 en la base de la cola y se reforzaron en el día 35 con 50 ug de CII de rata en IFA. Se puntuaron los ratones durante un periodo de 202 días para detectar el desarrollo de artritis. Se seleccionaron los ratones que desarrollaban artritis crónica para el experimento de tratamiento. Se reinmunizaron todos los animales seleccionados en el día 205 (día 0 de la reinmunización) con 50 ug de CII de rata en IFA y se puntuaron los siguientes 75 días para 35 detectar signos clínicos de artritis. En los días 7, 11 y 28 tras la reinmunización (flechas), se trataron los ratones mediante administración intravenosa (100 ug en 200 ul de PBS) de complejos GalOK264/A^q purificados (10 ratones en este grupo). Se administró PBS (i.v.) como control en los mismos días (7 ratones en este grupo). Se recogieron sueros de muestra en los días 0 y 75 tras la reinmunización y se midieron mediante ELISA. Los datos se representan como media ± D.E.

40 En la figura 5 se inyectaron i.v. a tres grupos de ratones B10.Q donantes (5 ratones en cada grupo) 200 ug de GalOK264/A^q en 100 ul de PBS, 200 ug de MOG/A^q en 100 ul de PBS o 100 ul de PBS solo. Cinco días después, se purificaron células T de cada ratón individualmente mediante selección negativa y se transfirieron i.v. (1x10⁶ células por ratón) a los receptores inmunizados con CII (5 días tras la inmunización). Se recogieron sueros de muestra en los días 35 y 70 tras la inmunización y se midieron mediante ELISA. Los resultados se expresan como la media ± 45 D.E.

En la figura 6 se inmunizan ratones (B10.QxB10.Rin)F1 en el día 0 con CII bovino. En los días 20 y 34 (flechas), se trataron los ratones mediante administración intravenosa de complejos de péptido/A^q purificados (100 ug en 200 ul de PBS (9 ratones por grupo) (A). Se recogieron sueros de muestra en los días 35 y 70 tras la inmunización y se midieron para determinar los niveles de anticuerpos anti-CII mediante ELISA (B). En otro experimento, se administraron una vez a ratones (B10.QxB10.RIII)F1 (5 ratones por grupo) 200 ug en 200 ul de PBS de complejos de péptido/A^q en el día de la inmunización (día 0) y se recogieron los sueros en el día 18 (C). Todos los datos representan la 50 media ± D.E. *, p<0,05; **, p<0,01.

Antígenos

Se preparó colágeno de tipo II de rata (CII) a partir de condrosarcoma de Swarm y CII bovino a partir de cartílago articular, mediante digestión con pepsina limitada, y se purificaron adicionalmente tal como se describió previamente (15). Se sintetizaron los péptidos de CII (CII259-273 no modificado: GIAGFKGEQGPKEP, GalOK264 CII259-273: GIAGFK(Gal-Hyl)GEQGPKEP y los diversos péptidos galactosilados que se desoxigenaron en grupos OH en la galactosa (posición 2, 3 y 4 respectivamente), se purificaron y se caracterizaron tal como se describió previamente (9, 10, 11, 16, 17). Se disolvió el CII en ácido acético 0,1 M. Se adquirió el péptido MOG79-90 de glicoproteína oligodendrocítica de mielina de ratón (GKVTLRIQNVRF) de Schafer-N (Copenhague, Dinamarca). Se disolvieron todos los péptidos en PBS. Se almacenaron el colágeno y los péptidos a 4°C hasta su uso.

Para inducir a CIA, se inyectó a cada ratón 100 µg de CII (CII de rata para ratones B10.Q y CII bovino para ratones (B10. QxB10.RIII) F1), emulsionado 1:1 en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco, Detroit, MI) en la base de la cola en un volumen total de 100 µl. Treinta y cinco días después, se les administró a los ratones una inyección de refuerzo de 50 µg de CII de rata emulsionado 1:1 en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco, Detroit, MI) en un volumen total de 50 µl. Se siguió el desarrollo de la artritis clínica a través de puntuación visual de los animales basándose en el número de articulaciones inflamadas en cada pata, comenzando dos semanas tras la inmunización y continuando hasta el final del experimento. Se usó un protocolo de puntuación prolongado (18) que oscila entre 1-15 para cada pata con una puntuación máxima de 60 por ratón. Se examinaron los ratones de 2 a 4 veces a la semana durante al menos 70 días tras la inmunización.

Se inmunizaron los ratones B10.Q(BALB/cxB 10.Q)F2 con 100 µg de CII de rata emulsionado en IFA por vía intradérmica (i.d.) en la base de la cola en el día 0 y se reforzaron en el día 35 i.d. con 50 µg de CII de rata en IFA. Se puntuaron los ratones durante un periodo mínimo de 202 días para detectar el desarrollo de la artritis. Los ratones que desarrollaron artritis crónica (los ratones con artritis grave durante un periodo mínimo de 120 días se consideraron crónicos), incluyendo aquéllos con recidivas claras, se seleccionaron para el protocolo de tratamiento.

Protocolos de tratamiento con complejo de péptido/Aq

Se trataron los animales mediante administración o bien intravenosa (i.v.) o bien intranasal (i.n.) de complejos de péptido/A^q purificados. En el tratamiento intravenoso del modelo de CIA, se inyectaron a los ratones GalOK264/Aq, GalOK264/Aq desoxigenado, K264/Aq o como control negativo complejo de MOG/Aq (100 µg en 200 µl de PBS) en los días 20 y 34 tras la inmunización (para el modelo crónico en los días 7, 11 y 28 tras la reinmunización). Se inyectaron a los ratones control por vía intravenosa 200 µk de PBS en los mismos días. En los experimentos de tratamiento intranasal, se administraron a los ratones 10 µg (en 20 µl de PBS) de complejo de péptido/A^q en los días mencionados anteriormente.

EJEMPLO 6

Medición de los niveles séricos de anticuerpo anti-CII

Se les extrajo sangre a los ratones en el momento de la inmunización de refuerzo (día 35) así como a la finalización del experimento (día 70) y se analizaron los sueros para determinar los niveles de anticuerpo de IgG anti-CII mediante ELISA cuantitativo (19). Brevemente, se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante la noche a 4°C con CII de rata nativo 10 µg/ml en PBS. Se lavaron los pocillos tres veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y luego se añadieron 150 µl de tampón de bloqueo (BSA al 5% en PBS) a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar, se añadieron 50 µl de muestras en diluciones en serie desde 1/100 hasta 1/10⁵ y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de un lavado prolongado, se revelaron las placas usando ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como sustrato y entonces se midió la absorbancia a 405 nm en un lector Spectra Max Plus (Göteborgs Termometerfabrik, Göteborg, Suecia). Se añadió un suero patrón de ratones singénicos artríticos y no inmunizados a cada placa en diluciones en serie como controles positivo y negativo, respectivamente.

Tabla 1

Los complejos de péptido/A^q suprimen el desarrollo de CIA en ratones B10.Q

Tratamiento	Incidencia	Día medio de aparición	Pico medio de gravedad	IgG anti-CII medio (ug/ml)	
				día 35	día 70
GalOK264/A ^q (i.v.)	0/10 (0%)	N/A	N/A	54,3±10,5	36,9±10,5
GalOK264/A ^q (i.n.)	1/10 (10%)	60	2	59,8±15,4	38,8±15,8
PBS (control) (i.v.)	8/10 (80%)	44+/-5	26,2+/-15,4	135,9±30,9	96,6±35,1

Se inmunizaron ratones B10.Q (10 ratones por grupo) con 100 microgramos de CII de rata en CFA en el día 0 y se reforzaron en el día 35 con 50 microgramos de CII de rata en IFA. En los días 20 y 34, se trataron los ratones mediante administración intravenosa (i.v.) (100 microgramos en 200 microlitros de PBS) o intranasal (i.n.) (10 microgramos en 20 microlitros de PBS) de complejo de GalOK264/Aq purificado. Se administró PBS (200 microlitros) (i.v.) como control en los mismos días. Se monitorizaron los ratones para detectar signos clínicos de artritis durante 70 días. Se midieron los niveles de IgG anti-CII en los días 35 y 70 mediante ELISA. Se muestran todos los valores como media \pm desviación estándar. N/A indica no aplicable.

EJEMPLO 7

Histología

Se extirparon las patas traseras tras finalizar el experimento, se fijaron en formaldehído tamponado neutro al 4% durante la noche y entonces se descalcificaron en EDTA al 5% (p/v) a 4°C hasta que los huesos eran flexibles. Entonces se deshidrataron los tejidos en un gradiente de alcoholes, se incrustaron en parafina, se cortaron a 5 μ m, se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se analizaron microscópicamente las secciones teñidas con H&E en serie para determinar el grado de inflamación y detectar destrucción del cartílago y hueso. Se realizaron los análisis de una manera ciega.

EJEMPLO 8

Transferencia de células T

Para el experimento de transferencia de células T, se inmunizaron 15 ratones B10.Q (receptores) con CH/CFA (día 0) y se reforzaron con CII/IFA en el día 35 usando el protocolo de inmunización convencional. Al mismo tiempo (día 0), se inyectaron i.v. a tres grupos (5 ratones por cada grupo) de otros ratones B10.Q (donantes) 200 μ g de GalOK264/Aq en 100 μ l de PBS, 200 μ g de MOG/Aq en 100 μ l de PBS o 200 μ l de PBS solo, respectivamente. Cinco días después, se hicieron pasar células de ganglios linfáticos y bazo libres de eritrocitos de cada ratón a través de un filtro de células de nailon de 40 μ m (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA) y entonces se purificaron las células T mediante selección negativa usando anticuerpos contra células que expresan CMH de clase II+ (M5/114) y CD11b+ (M1/70) (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA) y Dynabeads® (DynaL ASA, Oslo, Noruega) seguido por clasificación magnética. Se midió la pureza de las células T resultantes mediante citometría de flujo y se encontró que estaban contaminadas con <0,3% de células que expresan CMHII+. Se analizaron las células T purificadas mediante FACS para determinar la expresión de marcadores de superficie CD25+, CD62L+, CD45RB+ y NK 1.1+ pero no se encontraron diferencias entre los ratones individuales o grupos. Se resuspendieron las células T purificadas (1x10⁶) a partir de cada donante individual en un volumen final de 200 μ l de PBS estéril y se transfirieron por vía intravenosa a ratones receptores.

Estadística

Se determinó la diferencia estadística en la incidencia de enfermedad entre grupos de ratones descritos en los ejemplos usando la prueba de Chi cuadrado. Para comparar los datos no paramétricos para determinar la significación estadística, se aplicó la prueba de la U de Mann-Whitney o de Kruskal Wallis en todos los resultados clínicos y experimentos *in vitro* usando el programa StatView™ (SAS, Institute Inc., E.E.U.U).

Bibliografía

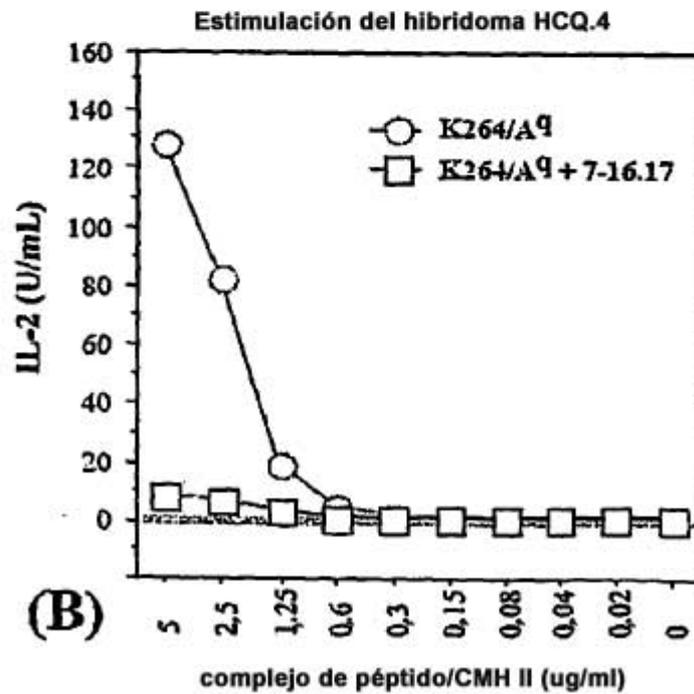
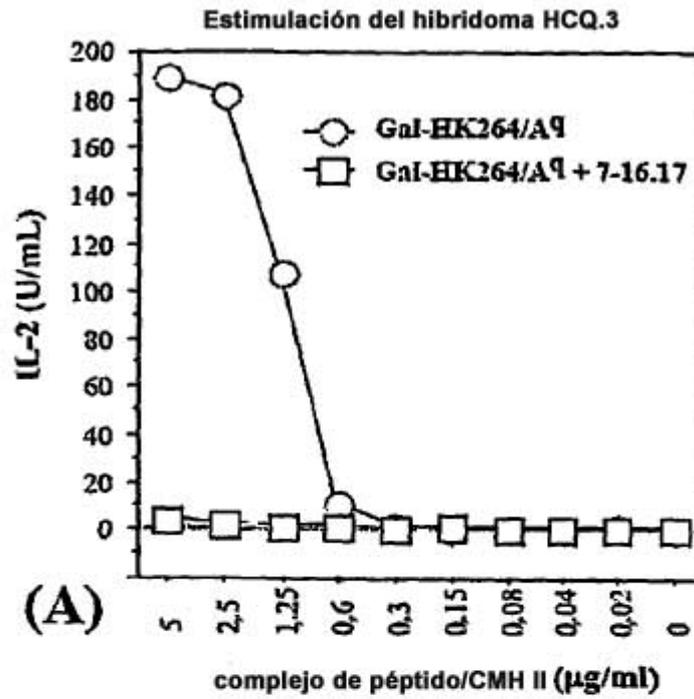
1. Aho, K., Palosuo, T., Raunio, V., Puska, P., Aromaa, A. & Salonen, J. T. (1985) Arthritis Rheum 28, 485-489.
2. Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U. & van Venrooij, W. J. (2003) Arthritis Rheum 48, 2741-9.
3. Berglin, E., Padyukov, L., Sundin, U., Hallmans, G., Stenlund, H., Van Venrooij, W. J., Klareskog, L. & Dahlqvist, S. R. (2004) Arthritis Res Ther 6, R303-8.
4. van Gaalen, F. A., van Aken, J., Huizinga, T. W., Schreuder, G. M., Breedveld, F.C., Zanelli, E., van Venrooij, W. J., Verweij, C. L., Toes, R. E. & de Vries, R. R. (2004) Arthritis Rheum 50, 2113-21.
5. Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Fife, M.S., Canas, B., Myers, L. K., Wooley, P., Soh, C., Staines, N. A., Pappin, D. J., Berlo, S. E., van Eden, W., van Der Zee, R, Lanchbury, J. S. & Panayi, G. S. (2001) J Immunol 166, 1492-8.
6. Fritsch, R., Eselbock, D., Skriner, K., Jahn-Schmid, B., Scheinecker, C., Bohle, B., Tohidast-Akrad, M., Hayer, S., Neumuller, J., Pinol-Roma, S., Smolen, J. S. & Steiner, G. (2002) J Immunol 169, 1068-76.
7. Cook, A. D., Rowley, M. J., Mackay, I. R., Gough, A. & Emery, P. (1996) Arthritis Rheum 39, 1720-1727.
8. Bäcklund, J., Carlsen, S., Höger, T., Holm, B., Fugger, L., Kihlberg, J., Burkhardt, H. & Holmdahl, R. (2002) Proc Natl Acad Sci U S A 99, 9960-9965.

9. Michaëlsson, E., Andersson, M., Engström, A. & Holmdahl, R (1992) *Eur J Immunol* 22, 1819-25.
10. Holm, B., Backlund, J., Recio, M. A., Holmdahl, R & Kihlberg, J. (2002) *Chembiochem* 3, 1209-1222.
11. Holm, B., Baquer, S. M., Holm, L., Holmdahl, R. & Kihlberg, J. (2003) *Bioorganic y Medicinal Chemistry* 11, 3981-7.
- 5 12. Corthay, A., Bäcklund, J., Broddefalk, J., Michaëlsson, E., Goldschmidt, T. J., Kihlberg, J. & Holmdahl, R. (1998) *Eur J Immunol* 28, 2580-2590.
13. Scott, C. A., Garcia, K. C., Carbone, F. R., Wilson, I. A. & Teyton, L. (1996) *J Exp Med* 183, 2087-95.
14. Bunch, T. A., Grinblat, Y. & Goldstein, L. S. (1988) *Nucleic Acids Res* 16, 1043-61.
15. Andersson, M. & Holmdahl, R. (1990) *Eur J Immunol* 20, 1061-1066.
- 10 16. Broddefalk, J., Bäcklund, J., Almqvist, F., Johansson, M., Holmdahl, R. & Kihlberg, J. (1998) *J Am Chem Soc* 120, 7676-7683.
17. Holm, B., Broddefalk, J., Flodell, S., Wellner, E. & Kihlberg, J. (2000) *Tetrahedron* 56, 1579-1586.
18. Holmdahl, R., Carlsen, S., Mikulowska, A., Vestberg, M., Brunsberg, U., Hansson, A.-S., Sundvall, M., Jansson, L. & Pettersson, U. (1998) en *Human Genome Methods*, ed. Adolpho, K. W. (CRC press, Nueva York), págs. 215-238.
- 15 19. Holmdahl, R., Klareskog, L., Andersson, M. & Hansen, C. (1986) *Immunogenetics* 24, 84-89.
20. Documento WO-A-01036448 (Cell-Sci. Corporation).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que consiste en (a) un péptido y (b) un portador, en el que
 - a. dicho péptido tiene al menos un motivo seleccionado del grupo que consiste en A-G-F-K-G-E-A, A-A-A-K-A-A-A e I-A-G-F-K-G-E-Q-G-P-K-G, en el que al menos un residuo de aminoácido K que es hidroxilisina está glicosilado, y
 - b. dicho portador comprende al menos la región variable de una molécula de CMH de clase II que está unida a dicho péptido.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho residuo de aminoácido K en dicho péptido se reemplaza por hidroxinorvalina.
3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho al menos un residuo de aminoácido en dicho péptido está glicosilado O-unido.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el residuo de aminoácido F en dicho péptido se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W y Y.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el residuo de aminoácido E en dicho péptido se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W y Y.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el residuo de aminoácido Q en dicho péptido se reemplaza por E.
7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho péptido (a) comprende 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 residuos de aminoácido.
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho portador comprende la región variable de una molécula de CMH de clase II seleccionada del grupo que consiste en DRB1*0401/DRA, DRB1*0402/DRA, DRB1*0403/DRA, DRB1*0404/DRA, DRB1*0405/DRA, DRB1*0406/DRA, DRB1*0407/DRA, DRB1*0408/DRA, DRB1*0409/DRA, DRB1*0410/DRA, DRB1*0101/DRA, DRB1*0102/DRA DRB1*1001/DRA y DRB1*1002/DRA.
9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que dicha región variable comprende un péptido que tiene el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de identidad con la secuencia polipeptídica en su longitud completa mostrada en SEQ ID NO 1 y un segundo polipéptido que tiene el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de identidad en su longitud completa con la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 2.
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho péptido (a) está covalentemente unido a dicho portador (b).
11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho portador comprende una región constante que está unida a dicho motivo de unión a CMH.
12. Compuesto según la reivindicación 11, en el que dicha región constante se selecciona del grupo que consiste en la región constante de una molécula de CMH de clase II o una inmunoglobulina.
13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha región constante comprende un péptido que tiene el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de identidad con la secuencia polipeptídica en su longitud completa mostrada en SEQ ID NO 3 y un segundo polipéptido que tiene el 80%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% de identidad en su longitud completa con la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO 4.
14. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de las articulaciones.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, osteoartritis, policondritis recidivante y enfermedad de Menieres.

Fig. 1



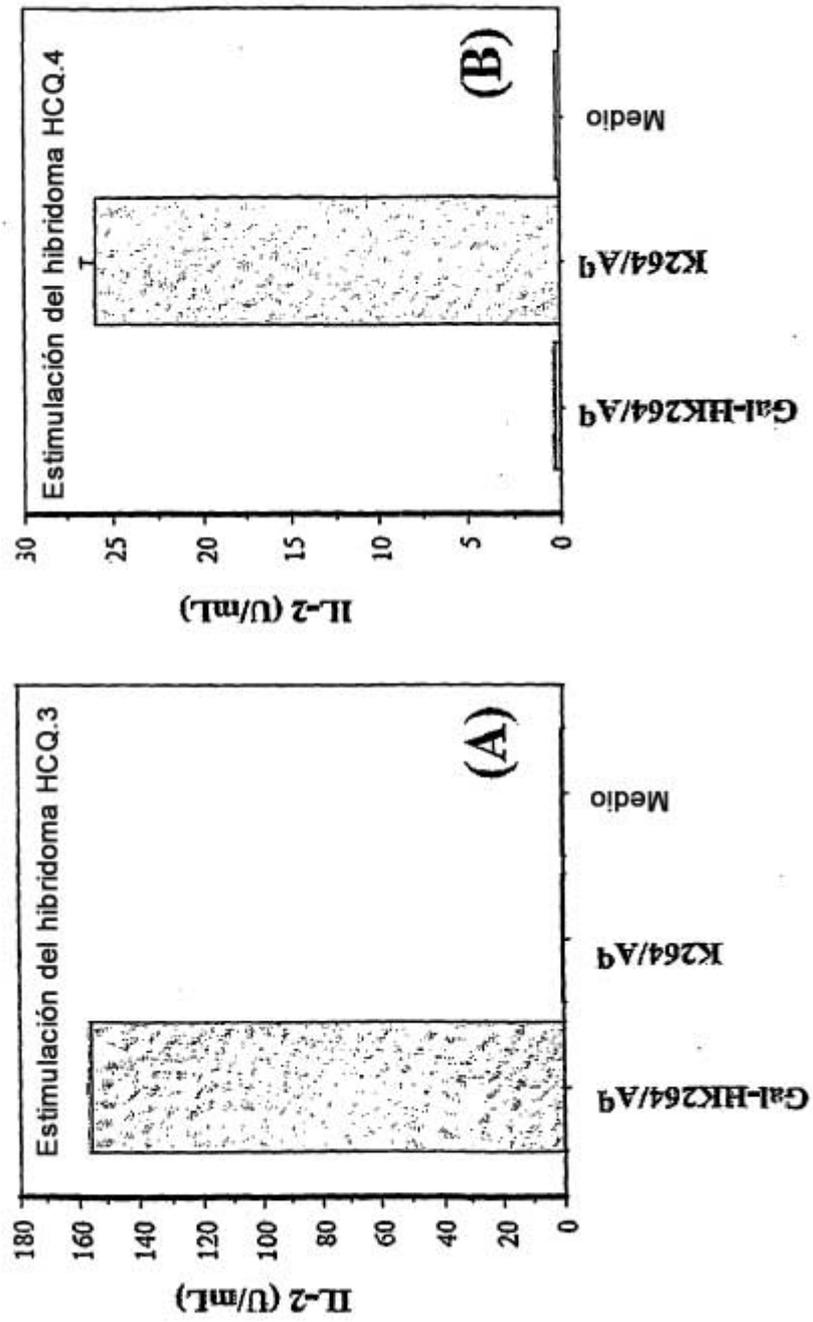
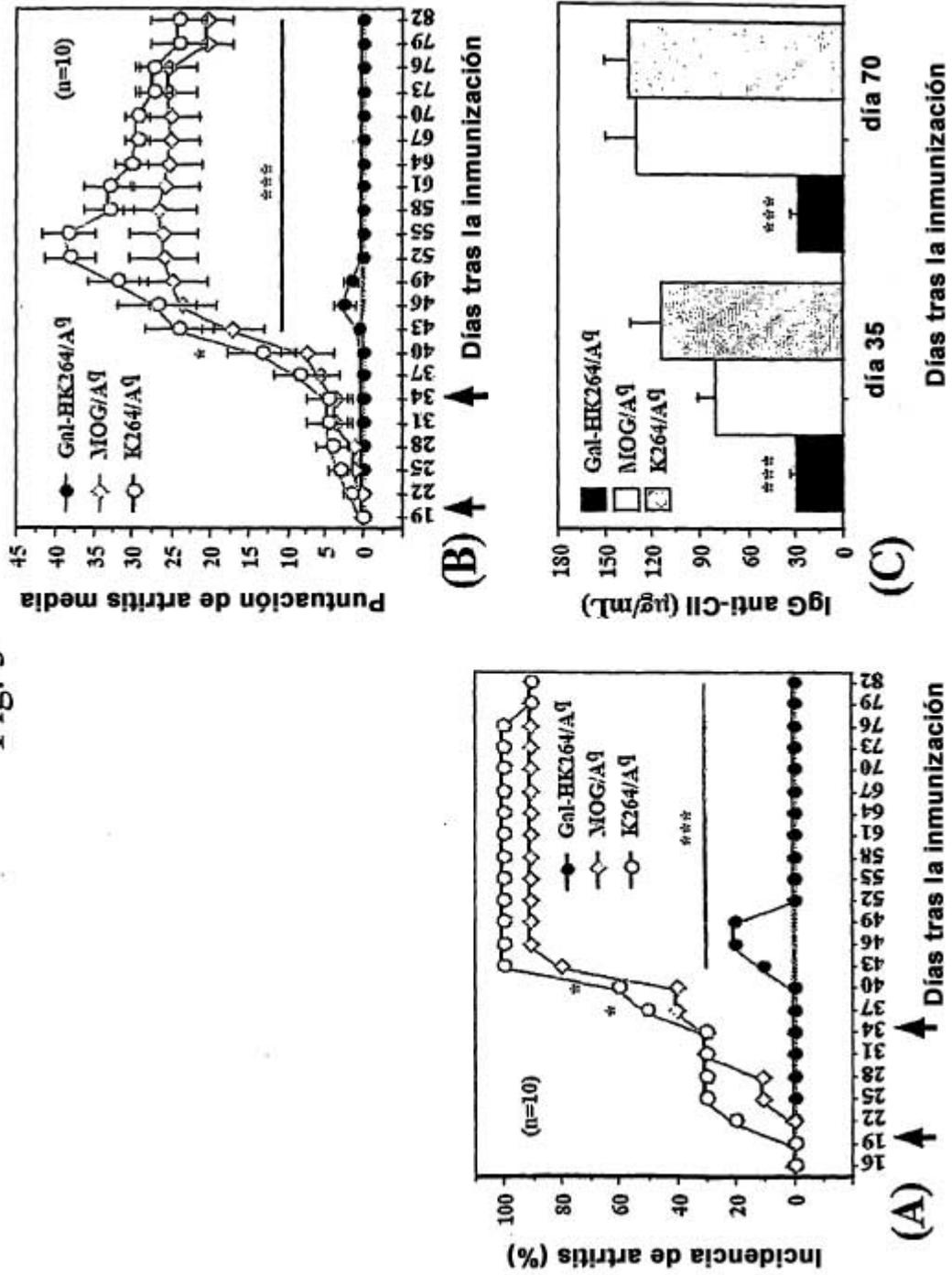


Fig. 2

Fig. 3



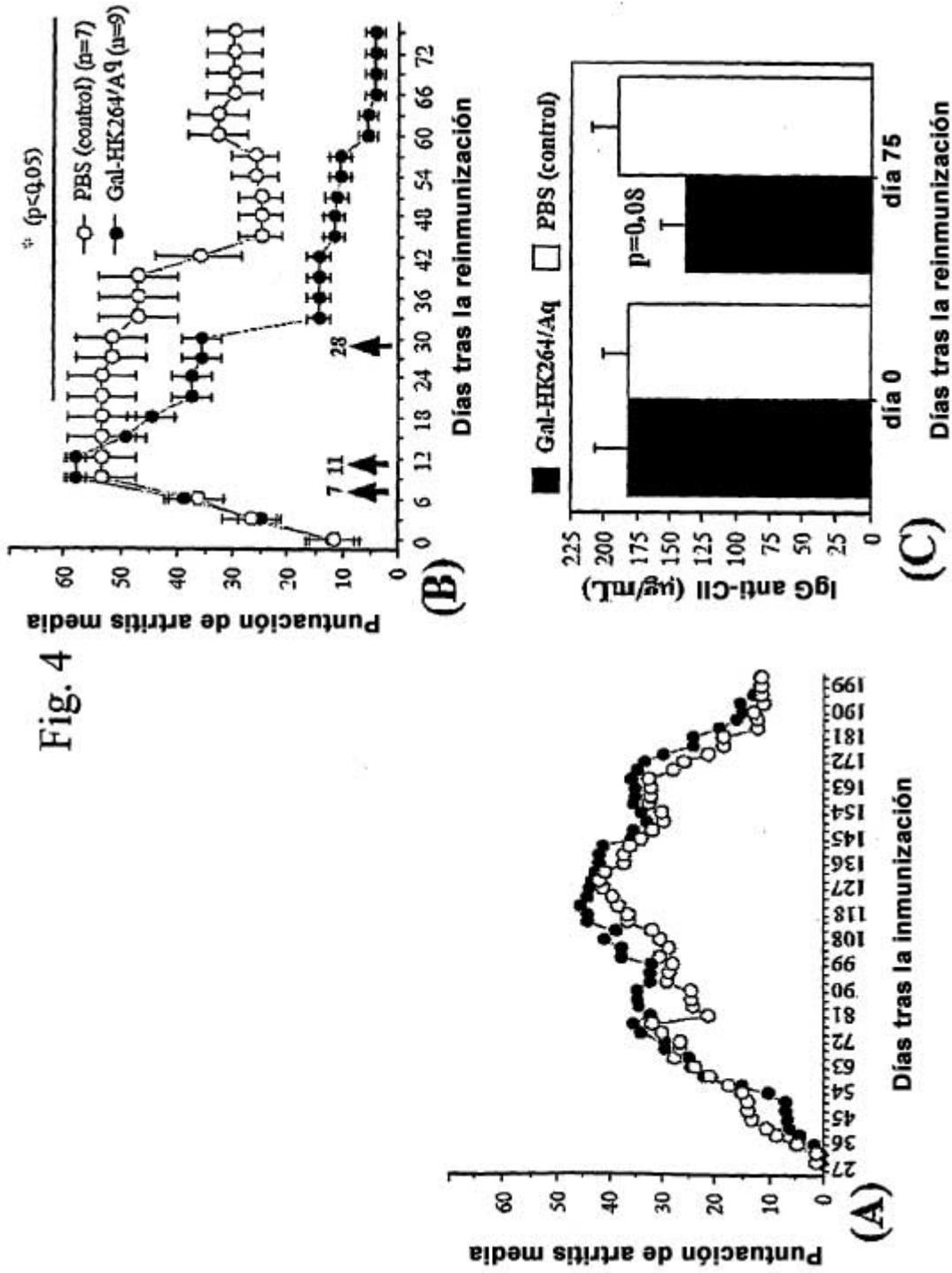


Fig. 5

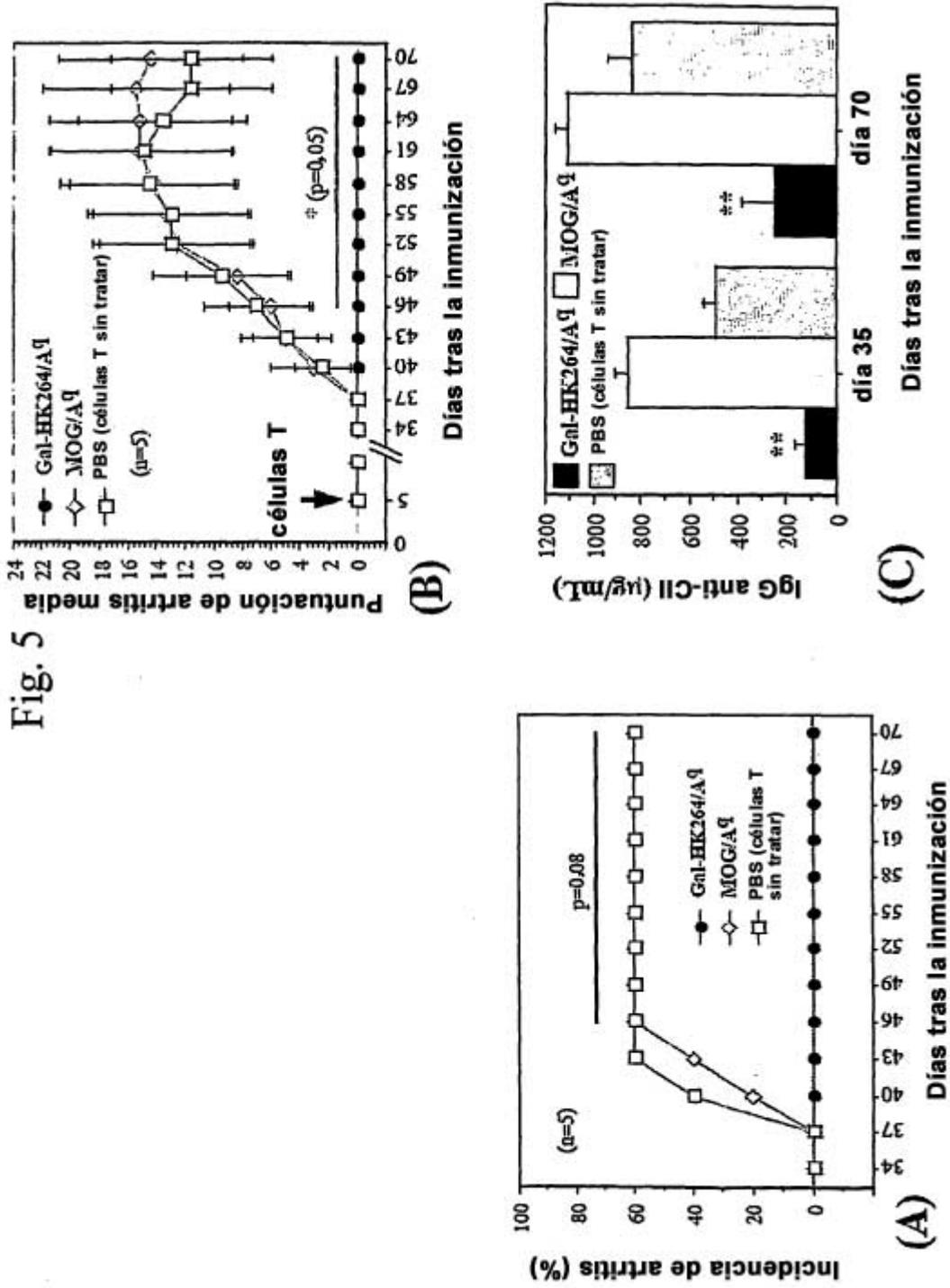


Fig. 6

