

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 502**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 15197682 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3045468**

54 Título: **Novedosos péptidos 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:

**05.08.2020**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**HOLMDAHL, RIKARD**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 777 502 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

Novedosos péptidos y su uso en diagnóstico y tratamiento

**Campo técnico**

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

**Técnica antecedente**

10 Las enfermedades autoinmunes son afecciones patológicas en las que los tejidos y las sustancias presentes de forma natural en el cuerpo desencadenan una respuesta inmune. Esta reacción inmunitaria no deseada e inapropiada puede ser específica de tejidos, específica de órganos o sistémica. El curso de la enfermedad pasa de síntomas leves a la 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 un papel patogénico importante, pero donde la especificidad de las reacciones autoinmunes y los determinantes genéticos de estas reacciones aún se desconocen. Es una enfermedad crónica e incurable que causa daño irreversible al cartílago articular y al hueso, y que conduce a una discapacidad física progresiva.

20 El tratamiento y/o el alivio de la artritis reumatoide, así como otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, hasta ahora se han basado en la manipulación de eventos inmunes e inflamatorios sin conocer las bases inmunológicas detalladas de la enfermedad. Estas terapias incluyen terapias antirreumáticas modificadoras de la enfermedad tradicionales (DMARD:s), incluida la administración de medicamentos como metotrexato, sulfasalazina, azatioprina, leflunomida, hidroxicloroquina y ciclosporina. El metotrexato a menudo se considera como el medicamento de primera elección. Sin embargo, este medicamento está asociado con efectos secundarios tanto leves como reversibles, como la ulceración de la mucosa gastrointestinal y oral, pero también con efectos secundarios más graves e irreversibles, como la toxicidad hepática.

25 Además de los DMARD:s, existen nuevas terapias basadas en proteínas que afectan la regulación de las citoquinas o aspectos generales de la activación y migración de las células T y B. Como ejemplo, están varios anticuerpos monoclonales y un constructo del receptor que bloquea el TNF alfa, agentes bloqueadores de citoquinas, como los anticuerpos contra el receptor de IL-6 (tocilizumab), así como terapias como CTLA41g (abatacept) y anticuerpos anti-CD20 (rituximab) que influye en clases enteras de linfocitos. Muchas terapias novedosas no se basan en el conocimiento detallado de la especificidad de las reacciones autoinmunes en la artritis reumatoide, sino que afectan las vías generales de señalización. Una de esas terapias es el inhibidor de Jak-2 tofacitinib, actualmente en desarrollo clínico avanzado. Sin embargo, estas nuevas terapias aún no abordan la reacción autoinmune específica, sino que son tratamientos no específicos que afectan grandes partes corrientes abajo del sistema de defensa inmune e inflamatorio, lo que genera riesgos de efectos secundarios causados por una defensa inmune generalmente suprimida. Tales efectos secundarios incluyen sensibilidad a las infecciones y respuesta reducida a la vacunación.

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

40 Estos anticuerpos a menudo, pero no siempre, se dirigen hacia variantes citrulinadas de las proteínas. La citrulina es un aminoácido no convencional que resulta de la desiminación de la arginina. La citrulinación del residuo de arginina es una modificación postraduccion catalizada por enzimas llamadas peptidilarginina desimininasas (PAD).

45 Anteriormente, se ha descrito el uso de péptidos citrulinados como herramienta de diagnóstico para la artritis reumatoide (anti CCP) (documento WO2003/050542). El ensayo con el anticuerpo CCP utiliza una mezcla de péptidos de los cuales no se ha demostrado que se presenten como autoantígenos naturales (dianas de las células B) en pacientes con artritis reumatoide.

50 Otra referencia, el documento WO 2007/017556, describe el uso de ciertos péptidos citrulinados y no citrulinados del colágeno tipo II para el diagnóstico de artritis reumatoide. Además, la detección de un péptido de enolasa citrulinada (cep1) se ha descrito como una herramienta de diagnóstico en la 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 procedimientos de diagnóstico no proporcionan una imagen completa de la enfermedad en el individuo, ya que las moléculas y mecanismos diana adicionales pueden ser importantes para la artritis reumatoide.

Los procedimientos disponibles para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades autoinmunes claramente dejan margen para mejorar. Existe la necesidad de una visión más profunda de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, así como del desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico y terapéuticos. Con especial atención a la artritis reumatoide, existe una gran necesidad médica no satisfecha para mejorar el diagnóstico y el tratamiento.

5 Un problema para definir la artritis reumatoide y sus subconjuntos ha sido la falta de un marcador clínico, de laboratorio o radiológico distinto para la enfermedad y sus subconjuntos. Otro problema reside en encontrar una metodología confiable para la monitorización a corto y largo plazo de la progresión o remisión de la enfermedad. Otro problema reside en encontrar tratamientos más específicos y efectivos, minimizando los efectos secundarios generalmente asociados tanto con DMARD:s como con terapias actualmente disponibles y en desarrollo. Estos problemas, y otros evidentes para una persona experta al estudiar la presente descripción, se abordarán a continuación.

## Definiciones

Según se usa en este documento:

15 "Diagnóstico": se refiere a determinar con respecto a un individuo: si el individuo tiene una enfermedad o no y/o qué tan grave 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, la clasificación de la enfermedad, el seguimiento de la progresión de la enfermedad o los resultados de la intervención.

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

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

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

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

30 "Aminoácido", cuando se usa en el contexto de un péptido o una proteína, se refiere a un residuo de aminoácido.

35 La respuesta inmune está controlada por las células T, donde las células T activadoras, como las células T efectoras, mejoran la respuesta inmune y las células T reguladoras constituyen uno de varios mecanismos que inhiben la respuesta inmune. Por lo tanto, la enfermedad autoinmune se controla mediante un equilibrio de células T efectoras estimulantes y células T reguladoras. Las células T efectoras y las células T reguladoras pertenecen a la clase de células T auxiliares. Las células T efectoras activadas secretan varias citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma, el TNF alfa y la IL-17 que contribuyen a la inflamación.

40 Los loci de antígeno leucocitario humano (HLA) codifican los genes para las proteínas MHC de clase II humanas (denominadas en este documento "MHC" o "proteína MHC"), las cuales desempeñan un papel crucial en la regulación del sistema inmune. La presentación de péptidos inmunogénicos por las moléculas MHC de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígeno sirven como señales para las células T que a su vez controlan la reacción inmune y también la progresión de la enfermedad autoinmune al inducir la proliferación de células B y la producción de anticuerpos patológicos. Un paso crucial de la activación de las células T es la unión del receptor de células T de la célula T a un complejo que consiste en un péptido antigénico unido a la hendidura de una molécula de proteína MHC de clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

45 El sistema de proteínas MHC está adaptado para unirse y exhibir diversos péptidos a las células T. Esto suele ser beneficioso ya que muchos péptidos diferentes, por ejemplo de los patógenos, pueden ser detectados por el sistema inmune.

50 Los genotipos HLA son bien conocidos y se han descrito previamente. La subunidad beta de la proteína 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 hombre. La mayoría de las diferencias se encuentran en la hendidura de unión a péptidos de la proteína MHC.

## Sumario de la invención

Anteriormente, el tratamiento y el diagnóstico de la artritis reumatoide se llevaban a cabo sin tener en cuenta la predisposición genética del paciente o la fina especificidad de las reacciones autoinmunes típicas de la artritis

reumatoide. Ahora, los inventores revelan procedimientos 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 inmune particular del paciente individual puede analizarse, controlarse y tratarse. En particular, el papel de la presentación de antígeno a las células T en pacientes puede determinarse y controlarse usando los reactivos de diagnóstico y los procedimientos descritos en este documento.

Los inventores ponen a disposición nuevos péptidos, en particular un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia presente en la SEQ ID No 46 es citrulina, y sus usos en el diagnóstico, alivio y tratamiento de artritis reumatoide y otras formas de artritis, como osteoartritis, artritis psoriasis, espondiloartropatías o policondritis recurrente.

Las Figuras 1-3 proporcionan datos de experimentos usando los péptidos y se discuten más detalladamente a continuación y en la sección de Ejemplos.

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

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos novedosos para el diagnóstico de artritis reumatoide.

Por lo tanto, se proporciona un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una de las SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia presente en La SEQ ID No 46 es citrulina.

El péptido también puede consistir esencialmente o consistir en una secuencia seleccionada de SEQ ID No 46.

El péptido puede ser un péptido con SEQ ID No 46, en el que dicho péptido comprende al menos un residuo de citrulina.

El péptido puede tener una secuencia seleccionada de las secuencias de colágeno tipo II SEQ ID No 46.

El péptido puede consistir en una secuencia citrulinada seleccionada de las secuencias de colágeno tipo II SEQ ID No 46, comprendiendo dicho péptido al menos un residuo de citrulina.

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

Además, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de artritis reumatoide u otros tipos de artritis. En su forma más general, el procedimiento comprende los pasos de: 1) obtener una muestra de células T de un paciente, 2) poner en contacto la muestra que comprende células T con un péptido o un complejo péptido-MHC de acuerdo con la invención, 3) detectar la capacidad de las células T para ser activadas por el péptido o los complejos péptido-MHC. Este tercer paso puede llevarse a cabo detectando un marcador en la muestra de células T, o detectando la unión del péptido o complejo péptido-MHC a las células T. Ambos pasos pueden llevarse a cabo.

También se proporciona un kit de piezas destinadas a uso en diagnóstico, comprendiendo el kit un complejo peptídico péptido-MHC de acuerdo con la invención. El kit puede comprender al menos un recipiente de cultivo celular. Además, el kit 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, son adecuados CD4, CD154, IL-17A, IL-17F, interferón gamma y TNF alfa. 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).

Además, se proporciona el uso de un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una secuencia seleccionada de SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionado de la secuencia presente en SEQ ID No 46 es citrulina o un complejo de dicho péptido y una proteína 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 una de las SEQ ID No 46. Estos péptidos y variantes de estos péptidos, y los complejos péptido-MHC también son adecuados para usar en el procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente y para su inclusión en el kit como se describe anteriormente. También se proporciona un complejo de un péptido de acuerdo con la invención y una proteína MHC de clase II recombinante humana (complejo péptido-MHC), y dicho complejo para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis. Además, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de la artritis reumatoide que comprende administrar dicho péptido o complejo péptido-MHC de acuerdo con la invención a un paciente. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende estos péptidos o péptido-MHC y el uso de estos péptidos y complejos péptido-MHC para la fabricación de un agente terapéutico.

### Descripción detallada

La invención se refiere a nuevos péptidos y al uso de estos péptidos del colágeno humano tipo II, en particular un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en la SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia presente en SEQ ID No 46 es citrulina, que se une a la proteína humana MHC clase II asociada con artritis reumatoide, en particular MHC clase II de los genotipos HLA-DRB10401, 0404, 0405, 0408, 0101 y 1001.

Los péptidos pueden unirse con una alta afinidad a la proteína MHC de manera que no se desacoplarán fácilmente de la proteína MHC una vez unidos. La afinidad es mayor que la afinidad del péptido CLIP por la proteína MHC (el péptido CLIP es la parte de la cadena invariable de la proteína MHC que se une al surco de unión a péptido de la proteína MHC durante el ensamblaje de la proteína MHC). La tasa de desactivación del péptido es suficiente para que el MHC cargado con péptido pueda estimular las células T *in vitro*, incluso después de varios días de incubación en medios libres de péptidos. La unión del péptido CLIP a la molécula 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 alimentar a las células presentadoras de antígeno con la proteína completa. Se puede determinar una tasa de inactivación aceptable mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, utilizando ensayos de filtración en gel. Los péptidos se unen en la hendidura presentadora de antígeno de la proteína MHC, de modo que el complejo péptido-MHC puede reconocerse y unirse a un receptor de células T u otra proteína específica para el péptido o para el complejo péptido-MHC. Preferiblemente, el péptido así unido al receptor de células T puede proporcionar una señal a la célula T que activa la célula T.

Se proporciona, en un primer aspecto de la invención, un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos, más preferiblemente de entre 9 y 19, incluso más preferiblemente de entre 13 y 18 aminoácidos, y lo más preferiblemente de 14 a 16 aminoácidos, que comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente al menos 10 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente al menos 12 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente al menos 13 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente 14 aminoácidos consecutivos y lo más preferiblemente 15 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una secuencia seleccionada de SEQ ID No 46.

Un péptido de menos de 8 aminoácidos o más de 20 aminoácidos no se une bien a la proteína MHC. Los residuos restantes del péptido, si los hay, pueden ser cualquier aminoácido natural, siempre que el péptido se una a la proteína MHC y es capaz de inducir la unión de un receptor de células T y es capaz de proporcionar una señal a la célula T que activa la célula T como se describe aquí.

El péptido puede consistir en una secuencia seleccionada de SEQ ID No 46.

Los péptidos adecuados son citrulinados, tales como péptidos y variantes de péptidos que comprenden una secuencia como se define en SEQ ID No 46, y donde el péptido comprende al menos un residuo de citrulina. Las SEQ ID No 46, 47 y 48 son péptidos de colágeno citrulinado tipo II. Una ventaja con el uso de péptidos citrulinados es que pueden ser más eficientes y específicos en el tratamiento de la artritis reumatoide ya que los autoanticuerpos que causan artritis reumatoide a menudo se dirigen hacia péptidos que contienen un residuo de citrulina. Además, los péptidos citrulinados a menudo se unen mejor a la proteína MHC que el péptido de arginina correspondiente, como se describe en la presente invención.

Los péptidos de la invención pueden unirse a la proteína MHC de clase II *in vivo* o *in vitro*.

Los péptidos según la invención se pueden obtener puros y en grandes cantidades por medio de síntesis orgánica, tal como síntesis en fase sólida. Los procedimientos para la síntesis de péptidos son bien conocidos por un experto en la materia. 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, US2009/0292108 y 2009/0221792 y sus referencias 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, los péptidos que no comprenden un residuo de citrulina pueden producirse usando tecnología de ADN recombinante.

Los péptidos pueden ser lineales o circulares. Un péptido circular puede ser adecuado para ciertas aplicaciones, 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 MHC o para ensayos de activación de células T.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un complejo, como se describió anteriormente, de un péptido de acuerdo con la invención y proteína MHC de clase II recombinante humana, en particular una de las variantes de MHC clase II HLA-DRB1 0401, 0404, 0405, 0408, 0101 o 1001 que se une a dicho péptido ("complejo péptido-MHC"). La proteína MHC no necesita ser la proteína de longitud completa. También se puede usar un fragmento de una proteína MHC, como se discute a continuación. Aquí, "complejo péptido-MHC" se refiere también a un complejo de un péptido y tal fragmento de una proteína MHC de clase II.

Las combinaciones preferidas de proteína y péptidos MHC de clase II son las siguientes:

MHC de clase II con genotipo HLA-DRB1 1001 unido a un péptido con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO 46, o una variante de dicho péptido. En particular, los péptidos citrulinados y las variantes de estos en ese grupo son adecuados, es decir, SEQ ID No 46. En particular, es adecuado un péptido con SEC No 46 o una variante del mismo.

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

10 Como se mencionó, se puede usar el fragmento de una proteína MHC. La proteína MHC debe ser estable y debe poder presentar un péptido a las células T. Para su uso como se describe en el presente documento, la parte esencial de la molécula MHC de clase II son los dominios externos de las cadenas alfa y beta (dominios alfa 1 y beta 1) que forman juntos la hendidura de unión a 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 MHC funcional que se una y presente un péptido, los dominios externos (alfa1 y beta1) pueden estabilizarse por diferentes medios. Tales medios incluyen las siguientes estrategias: a) retener 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  
15 residuos de cisteína que forman puentes disulfuro que unen las cadenas alfa y beta, d) introducir un péptido en el surco de unión peptídico que está unido covalentemente a un alargamiento del dominio beta. Los genes adecuados que codifican la proteína MHC son DRB1 para la cadena beta y DRA para la cadena alfa. Pueden usarse procedimientos de biología molecular conocidos por una persona experta en la técnica para alterar estos genes. Se pueden encontrar protocolos útiles en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* by Joe Sambrook.

20 Las siguientes referencias son relevantes para la producción de proteína 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. & Wucherpfennig, 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 immunedominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 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).  
25  
30

La unión del péptido a la proteína MHC de clase II para que formen un complejo se puede llevar a cabo de diferentes maneras. A menudo es suficiente incubar la proteína MHC durante cierto tiempo para que el péptido se una a la proteína. Por lo general, la incubación se llevará a cabo durante varios días, en particular 3 días es un momento adecuado para la incubación. El péptido puede estar presente en un exceso molar de la proteína MHC. Un exceso molar adecuado de péptido es 20 veces. Una concentración adecuada de péptido es 0.2 mg/ml.  
35

La proteína MHC consiste en una cadena alfa y una cadena beta. El complejo alfa/beta de la proteína 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 MHC con un "péptido simulado" no específico unido a la hendidura de unión del péptido para mejorar la estabilidad. Antes de su uso, el péptido no específico se elimina y se reemplaza con el péptido de interés. También puede ser adecuado reticular el péptido con la proteína MHC de clase II.  
40

Los péptidos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso en el tratamiento y diagnóstico de artritis reumatoide.

45 Como se discutió anteriormente, la respuesta inmune es controlada por las células T, donde las células T reguladoras constituyen uno de varios mecanismos que inhiben la respuesta inmune y donde las células T efectoras activadoras mejoran la respuesta inmune. Por lo tanto, la enfermedad autoinmune, como la artritis reumatoide, se controla mediante un equilibrio de células T efectoras estimulantes y células T reguladoras.

50 Una respuesta inmune patológica puede atenuarse administrando los péptidos o complejos péptido-MHC de modo que las células T reguladoras u otras vías reguladoras se estimulen específicamente. La estimulación con complejos de péptido soluble-MHC se puede llevar a cabo sin la presencia de factores coestimuladores normalmente presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno, tales como 87 moléculas de superficie. El propósito de esto es activar las células T reguladoras, en lugar de las células T efectoras que promueven la enfermedad. La célula T reguladora inhibe la activación de células inflamatorias patológicas, células T o células B y la producción de anticuerpos.

55 El péptido se puede proporcionar o administrar en una forma en la que se une a una proteína MHC, en particular a una proteína MHC humana de clase II recombinante (complejo péptido-MHC). Una ventaja de proporcionar o administrar el péptido junto con una proteína de clase MHC es que puede facilitar la reactividad con las células T y proporcionar una tolerancia más eficiente que el uso del péptido solo. Este complejo también puede proporcionar un

medicamento más adecuado, ya que tiene una semivida más larga en el cuerpo humano. Preferiblemente, se administra al paciente una proteína MHC de clase II con un genotipo que corresponde al genotipo del paciente.

5 Por lo tanto, al administrar uno o más de los péptidos o complejos péptido-MHC de la invención a pacientes con una enfermedad autoinmune como la artritis reumatoide, el sistema inmune puede modularse y la enfermedad puede prevenirse, curarse, controlarse o al menos atenuarse.

10 Los pacientes son tratados adecuadamente de acuerdo con la naturaleza de su respuesta autoinmune y su genotipo. Los genotipos 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 con los péptidos descritos. Sin embargo, es posible que los pacientes con otros genotipos también sean de interés.

Los pacientes que portan el genotipo HLA, HLA-DRB1 1001 se tratan ventajosamente con al menos un péptido con una secuencia seleccionada de SEQ ID No 46, o una variante de dicho péptido. En particular los péptidos citrulinados y las variantes de estos en ese grupo son adecuados, es decir, SEQ ID No 46. Un péptido con SEQ ID No 46 o una variante del mismo es el péptido más preferido.

15 Los pacientes con una respuesta inmune contra el colágeno tipo II se tratan adecuadamente con un péptido de colágeno tipo II de acuerdo con la invención, preferiblemente un péptido que corresponde al epítipo al cual se dirige la autoinmunidad. Sin embargo, también otros pacientes con artritis reumatoide pueden ser adecuados para el tratamiento con estos péptidos.

20 El péptido o los complejos péptido-MHC se pueden administrar al paciente usando diferentes procedimientos. Los protocolos de tolerancia son conocidos y están revisados en Larché and Wraith, Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune disease. Nature Medicine Supplement; 2005; 11;4; S69-S76. Se describen ejemplos de protocolos de tratamiento en Ludvigsson et al, GAD N Engl J Med. 2008 Oct 30;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 lo tanto, el péptido o los complejos péptido-MHC se pueden usar como vacuna. Alternativamente, los péptidos pueden unirse a células dendríticas tolerogénicas.

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

35 El péptido o complejo péptido-MHC se administra al paciente en una cantidad efectiva y no tóxica. Estos parámetros se pueden controlar utilizando procedimientos clínicos e inmunológicos conocidos previamente. En particular, la eficacia de la vacuna se puede controlar en pacientes que utilizan los procedimientos de diagnóstico descritos en este documento (véase más abajo).

40 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 MHC de clase II recombinante humana (complejo péptido-MHC). La composición farmacéutica puede comprender aditivos adecuados tales como potenciadores de biodisponibilidad, conservantes, potenciadores de 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.

45 Los péptidos y los complejos péptido-MHC se pueden usar en el diagnóstico de la artritis reumatoide. La respuesta inmune que causa la artritis reumatoide se controla mediante un equilibrio de células T reguladoras (caracterizadas por la expresión de CD4, CD25 y Foxp3) y células T efectoras estimulantes (caracterizadas por la expresión y de citoquinas proinflamatorias 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 o menos células T reguladoras activas u otros mecanismos reguladores conduce a una respuesta inmune continua o mejorada y al avance de la enfermedad. Los péptidos y complejos péptido-MHC descritos pueden usarse para controlar la cantidad de células T que son reactivas para epítomos autoinmunes. En particular, se puede determinar la relación entre la cantidad de células T reguladoras y la cantidad de células T efectoras, donde un aumento de la proporción de células T efectoras, en particular células T efectoras activadas, indica el avance de la enfermedad.

50 De esta manera, la enfermedad del paciente y el perfil de las células T que causan las enfermedades pueden ser monitorizados en el paciente. Esto puede llevarse a cabo en diversos puntos en el tiempo para seguir la progresión de la enfermedad en el paciente. Los péptidos y los complejos péptido-MHC también se pueden usar para controlar la respuesta inmune durante diversas intervenciones, como la vacunación u otra terapia.

55 El ensayo puede usarse adecuadamente para el análisis de células T de un paciente. De manera adecuada, se llevan a cabo los siguientes pasos: 1) obtener una muestra de células T de un paciente, 2) poner en contacto la muestra que

comprende células T con un péptido o un complejo péptido-MHC de acuerdo con la invención y 3) detectar la capacidad de las células T a activarse por el péptido o los complejos péptido-MHC. Este tercer paso puede llevarse a cabo detectando un marcador en la muestra de células T o detectando la unión del péptido o complejo péptido-MHC a las células T.

5 La detección de marcadores puede servir para clasificar las células T auxiliares en cuatro grupos: células T reguladoras en reposo, células T reguladoras activadas, células T efectoras en reposo (ingenuas) y células T efectoras activadas. Se detectan adecuadamente marcadores que indican la activación de la naturaleza y el estado de activación (activo/inactivo) de las células T. La cantidad de células y la proporción de estos tipos de células entre sí también se pueden cuantificar.

10 Detectar solo la unión del péptido o el complejo péptido-MHC, sin detectar necesariamente la activación posterior de las células T, sirve para detectar las células T que se unen y, por lo tanto, pueden reaccionar y activarse con el péptido o complejo péptido-MHC en cuestión. Una ventaja de este procedimiento es que no se necesita tiempo de incubación.

El procedimiento puede incluir el análisis de las propias células o una parte de los medios de cultivo celular. Por lo tanto, la "muestra de células T" a la que se hace referencia anteriormente incluye las propias células y cualquier medio de cultivo celular utilizado. Los medios de cultivo celular generalmente son necesarios para que las células sobrevivan en cultivo más de unas pocas horas.

15 Puede ser adecuado poner en contacto la muestra que comprende células T en condiciones que permiten la activación de las células T. La muestra de células T comprende adecuadamente células T auxiliares. Las células T auxiliares se caracterizan por la expresión superficial de CD4.

20 Las células T se ponen en contacto con el péptido o los complejos péptido-MHC en condiciones que permiten la activación de las células T, como, por ejemplo, en condiciones apropiadas de cultivo celular. Adecuadamente, las células T se mantienen en un medio de cultivo celular a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

25 Preferiblemente, el tiempo para contactar las células 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 a las células T, se puede usar un tiempo de contacto más corto como lo conoce una persona experta en la técnica.

El procedimiento de diagnóstico cuantifica la cantidad de células T que reaccionan y se activan por el péptido, por lo tanto, inmunológicamente "ven" el péptido. Las células T así identificadas pueden caracterizarse adicionalmente como células T reguladoras o estimulantes, o caracterizarse de otras maneras, usando diversos marcadores.

30 Adecuadamente, el genotipo HLA del paciente se determina como un primer paso, antes de determinar la reactividad de las células T con péptidos. Esto puede reducir el número de péptidos por analizar, ya que el MHC con un cierto genotipo solo se une y confiere reactividad a un determinado conjunto de péptidos como se describe aquí. La naturaleza de los diversos genotipos HLA es conocida por un experto en la materia.

35 El genotipificado puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante PCR, secuenciación de ADN genómico, inmunotransferencia Southern, inmunotransferencia Northern u otros procedimientos conocidos por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, el genotipificado se puede llevar a cabo como se describe en Olerup 0, 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.

40 El diagnóstico puede llevarse a cabo in vitro, es decir, utilizando células T aisladas del paciente. Las células T pueden aislarse de la sangre. En particular, se puede usar una muestra de PBMC (Células Mononucleares de Sangre Periférica) de un paciente. Por lo tanto, el diagnóstico puede llevarse a cabo poniendo en contacto una muestra de PBMC con el péptido. Las PBMC purificadas de aproximadamente 10 ml de sangre periférica del paciente son suficientes para llevar a cabo el análisis. Las PBMC pueden purificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación en gradiente. En particular, se puede usar centrifugación en gradiente usando Ficoll®. Preferiblemente, el procedimiento elimina plasma, células polinucleares y células no nucleadas, tales como glóbulos rojos.

45 Convenientemente, las células T se caracterizan con la ayuda de marcadores. CD3 puede usarse como marcador general para todas las células T. CD4 puede usarse como un marcador para las células T auxiliares (es decir, las células T efectoras y las células T reguladoras).

Las células T efectoras activadas pueden identificarse mediante la expresión superficial de, por ejemplo, CD 154 o CD69, o la expresión superficial de MHC de clase II, la proliferación y la tinción de Ki67. Las citoquinas adecuadas para la detección de la activación de las células efectoras T son la secreción de TNF alfa, interferón gamma, IL-17A, IL-17F, IL-2, IL-13 o IL-10.

Las células T reguladoras pueden identificarse mediante la Coexpresión de CD4, CD25 y Foxp3. Las células T reguladoras activadas pueden identificarse mediante la regulación ascendente de estos marcadores.

- 5 Los marcadores pueden identificarse convenientemente con el uso de procedimientos 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 o enzimas, como por ejemplo peroxidasa de rábano picante.

Los procedimientos adecuados para detectar marcadores incluyen citometría, luminex, elispot, ELISA o inmunoprecipitación Western. Los procedimientos basados en ARNm como, por ejemplo, RT-PCR o inmunotransferencia Northern también se pueden usar para detectar marcadores.

- 10 Cuando se usa un péptido desnudo (es decir, un péptido no unido a una proteína MHC) para el diagnóstico, se pueden agregar a cultivos celulares con PBMC a una concentración de 2-100 ug/ml, incluso más preferiblemente 5-50 ug/ml. Las PBMC se incuban luego con los péptidos durante un período de tiempo en el intervalo de 6 horas a 6 días, incluso más preferiblemente de 3 a 6 días y lo más preferiblemente de 5 días. Las células y/o los medios de cultivo celular se analizan posteriormente para los marcadores como se describe anteriormente.

- 15 Cuando los complejos péptido-MHC se usan para el diagnóstico, el diagnóstico puede llevarse a cabo utilizando vasos de cultivo celular, 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 500000 a 2 millones de células. Cuando se utilizan complejos péptido-MHC, la superficie del recipiente de cultivo celular puede recubrirse con los complejos péptido-MHC. Una concentración adecuada para su uso en el recubrimiento del recipiente de cultivo celular con complejo péptido-MHC es de aproximadamente 1-10 µg/ml). Convenientemente, una placa de cultivo celular comprende pocillos con un conjunto de complejos péptido-MHC que son de interés para un paciente con un genotipo HLA particular. Las PBMC se agregan al pozo de tal manera que las células T pueden unirse a los complejos péptido-MHC y activarse. Un tiempo adecuado para la incubación está en el rango de 6 horas a 6 días. Las células y/o los medios de cultivo celular se analizan posteriormente para los marcadores como se describe anteriormente.

- 25 Adecuadamente, el diagnóstico puede realizarse 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 llevan cada una un péptido en la hendidura de unión a péptido. El tetrámero se puede obtener por biotinylación de la proteína MHC y posteriormente permitiendo que la proteína MHC biotinilada se una a la estreptavidina. Debido a que la estreptavidina tiene cuatro sitios de unión para la biotina, se forma un complejo que comprende una molécula de estreptavidina unida a cuatro complejos péptido-MHC, de ahí el nombre "tetrámero". Snir et al, *Arthritis & Rheumatism*, Vol 63, NO 10 pp 2873-2883 and 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 una etiqueta, como una etiqueta fluorescente. El complejo péptido-MHC se unirá a las células T que participan en la regulación de la artritis reumatoide porque expresan un receptor de células T específico para el péptido. Las células T pueden ser detectadas por la etiqueta del tetrámero. Una ventaja con el uso de tetrámeros es que la señal se amplifica porque los tetrámeros se unen más fuerte a las células T.

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

- 40 Por lo tanto, en otro aspecto más de la invención, se proporciona un complejo que comprende una molécula de avidina o estreptavidina y un complejo péptido biotinilado-MHC.

- Alternativamente, el procedimiento de diagnóstico puede comprender cualquiera de los siguientes pasos: a) obtener una muestra de células T de un individuo b) poner en contacto la muestra con un péptido o un complejo péptido-MHC de acuerdo con la invención, c) determinar la unión del péptido o el complejo péptido-MHC a una población de células T en la muestra. El procedimiento para el diagnóstico también puede comprender un paso para determinar el genotipo HLA del individuo. El procedimiento de diagnóstico se lleva a cabo in vitro, es decir, no es invasivo.

- 50 En otra realización, los péptidos también se pueden usar para detectar la presencia o cantidad de anticuerpos contra los epítomos presentes en los péptidos. La presencia de anticuerpos contra cierto epítomo es otro medio para calificar la naturaleza de la autoinmunidad del paciente. Por lo tanto, el procedimiento de diagnóstico puede comprender los pasos para obtener una muestra del paciente 2), poner en contacto la muestra con un péptido o complejo péptido-MHC y 3) determinar la unión de los anticuerpos en la muestra al péptido. La muestra puede ser una muestra de sangre, suero, plasma, saliva o líquido que contiene anticuerpos sinoviales. Hay varios inmunoensayos que pueden usarse para detectar la unión de anticuerpos, ejemplos de los cuales son ELISA, inmunoprecipitación y radioinmunoensayo, pero también pueden usarse otros procedimientos.

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

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

En una realización, el kit comprende al menos un recipiente de cultivo celular que contiene al menos un péptido o complejo péptido-MHC según la invención. El kit puede comprender varios recipientes de cultivo celular combinados, 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 péptido-MHC. Adecuadamente, cada pocillo de la placa de cultivo celular está recubierto con péptido o complejo 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 apropiadas.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en particular artritis reumatoide, que comprende administrar un péptido o un complejo péptido-MHC de acuerdo con la invención a un paciente. El procedimiento de tratamiento puede comprender los pasos de 1) determinar el genotipo HLA del paciente como se describe en este documento y 2) determinar la naturaleza de la autoinmunidad utilizando el procedimiento de diagnóstico descrito en el presente documento 3) seleccionar el péptido (s) o el complejo péptido-MHC apropiado (s) para el paciente, 4) administrar el péptido o complejo péptido-MHC al paciente, y opcionalmente 5) monitorizar la enfermedad del paciente, preferiblemente usando el procedimiento de diagnóstico proporcionado en este documento. Dicha monitorización puede incluir la proporción de células T reguladoras a células T efectoras activadoras y los cambios son tal proporción. Preferiblemente, un péptido que reacciona con las células T se selecciona para el tratamiento del paciente, ya que dicho péptido activará las células T reguladoras. Cuando se usa un complejo péptido-MHC, el genotipo HLA de la proteína MHC se selecciona de acuerdo con el genotipo del paciente, como se describe en el presente documento.

El procedimiento de tratamiento también puede comprender la etapa para determinar cuál de los antígenos peptídicos de la invención y/o complejos péptido-MHC los cuales adecuados para la administración al paciente. Por lo tanto, el procedimiento puede comprender el paso para determinar la naturaleza de la reactividad autoinmune que es al menos parcialmente responsable de la enfermedad. Este paso puede llevarse a cabo midiendo la activación de células T como se describe en este documento o midiendo la presencia en el paciente de anticuerpos que reaccionan con cierto péptido como se describe en este documento.

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

## Figuras

Figura 1. (A) Respuestas de células T CD4+ a péptidos de alfa-enolasa (ENO) en un paciente HLA-DR\*0401 positivo. (B) Respuestas de células 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). El análisis FACS de la coexpresión de CD154 junto con IFN-gamma e IL-17 en células T CD4+ se llevó a cabo después de la 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. La tinción intracelular para las citoquinas se realizó 6 horas después de la reestimulación y la adición de Brefeldin A. El control positivo (HA) genera principalmente una respuesta IFN gamma. Las versiones de arginina de los péptidos a-enolasa producen una respuesta en este paciente, mientras que los péptidos citrulinados de a-enolasa dan como resultado 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. Un tetrámero HLA-DRB1\*0401 cargado con el péptido enolasa citrulinada 313 (SEQ ID No 23) y marcado con el fluorocromo PE se usa para teñir PBMC de un paciente con artritis reumatoide positiva \*0401. Las células en el cuadrante superior derecho son células T con un receptor de células T que reconoce este complejo péptido-MHC particular. Se demuestran detalles adicionales en los Ejemplos 16 y 17.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

5 Los inventores han identificado péptidos de colágeno humano tipo II, alfa-enolasa y vimentina que se unen específicamente a las variantes de 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 genotipos HLA DRB1 0101, 0401, 0404, 0405, 0408 y 1001 como se indica en las tablas 1, 2 y 3. Curiosamente, ninguno de los péptidos se une a MHC con genotipos HLA-DR 03 y 0402, genotipos que no están asociados con el desarrollo de artritis reumatoide.

10 La unión de los péptidos a la proteína MHC de clase II recombinante de varios alelos se ha confirmado en un ensayo de unión in vitro y los resultados se muestran en las Tablas 1, 2 y 3. En la tabla 1, 2 y 3, el listado del alelo en columna para el alelo indica unión. Por lo tanto, "0401" en la columna "Se une a 0401" indica la unión del péptido a MHC 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 enlace o que el enlace no se ha determinado. En las tablas también se indica si el péptido tiene un residuo de citrulina, donde "sí" indica la presencia de un residuo de citrulina y "no" indica la ausencia de un residuo de citrulina.

15 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 tipo II (SEQ ID No 30) que se unen específicamente a HLA-DRB1 0401, donde el péptido citrulinado no se unió. Así, para estos péptidos no se observó unión al HLA-DR0401 cuando se intercambió citrulina con el aminoácido original arginina (Tabla 4). No se observó unión de los péptidos citrulinados a las variantes HLA-DR 03 o 02.

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

Tabla 1.

Proteína	Péptido ref nº	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	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

ES 2 777 502 T3

Proteína	Péptido ref nº	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	SEQ ID No.
a-enolasa	289	no	*0401	no	*0405	no	no	si	15
a-enolasa	291	*0101	*0401	*0404	*0405	no	*1001	si	16
a-enolasa	292	*0101	*0401	*0404	*0405	no	no	si	17
a-enolasa	297	no	*0401	no	*0405	no	no	si	18
a-enolasa	300	no	*0401	no	*0405	no	no	si	19
a-enolasa	301	no	*0401	*0404	*0405	no	no	si	20
a-enolasa	302	no	*0401	*0404	*0405	no	no	si	21
a-enolasa	305	no	*0401	no	*0405	no	no	si	22
a-enolasa	313	*0101	*0401	*0404	*0405	no	no	si	23
a-enolasa	324	no	*0401	*0404	*0405	no	no	si	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	si	36

Tabla 2

Proteína	Péptido ref no	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	SEQ ID No
colágeno tipo II	195		*0401	*0404				no	25
colágeno tipo II	242	*0101	*0401	*0404	*0405			no	26
colágeno tipo II	257			*0404				no	27
colágeno tipo II	137	*0101	*0401	*0404				no	28

ES 2 777 502 T3

Proteína	Péptido ref no	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	SEQ ID No
colágeno tipo II	138	*0101	*0401					no	29
colágeno tipo II	386		*0401	*0404				si	30
colágeno tipo II	411		*0401	*0404	*0405			si	31
colágeno tipo II	100			*0404				no	37
colágeno tipo II	166			*0404				no	38
colágeno tipo II	178				*0405			no	39
colágeno tipo II	224			*0404				no	40
colágeno tipo II	241		no	*0404	*0405			no	41
colágeno tipo II	263						*1001	no	42
colágeno tipo II	268						*1001	no	43
colágeno tipo II	272				*0405			no	44
colágeno tipo II	332		*0401	*0404	*0405			si	45
colágeno tipo II	357						*1001	si	46
colágeno tipo II	362						*1001	si	47
colágeno tipo II	384					*0408	*1001	si	48

ES 2 777 502 T3

Tabla 3

Proteína	Péptido ref no	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	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	ro				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			*0404				no	70
vimentina	93	no	*0401	*0404				si	71
vimentina	95	*0101	*0401					si	72

ES 2 777 502 T3

Proteína	Péptido ref no	Se une a 0101	Se une a 0401	Se une a 0404	Se une a 0405	Se une a 0408	Se une a 1001	Citrinulación	SEQ ID No
vimentina	98		*0401		*0405			si	73
vimentina	99	*0101	*0401					si	74
vimentina	104	*0101	*0401	*0404	no			si	75
vimentina	105	*0101	*0401	no	no			si	76
vimentina	106	*0101	*0401	*0404	*0405			si	77
vimentina	108	no	*0401	no	no			si	78
vimentina	111	*0101	*0401	No	no			si	79
vimentina	117	*0101		No	no			si	80
vimentina	132	*0101						si	81
vimentina	133	no	*0401	No	no			si	82
vimentina	145		*0401					si	83
vimentina	150		*0401					si	84
vimentina	156	*0101						si	85
vimentina	159		*0401	No				si	86
vimentina	166	no	no	*0404	no			si	87

Tabla 4.

Proteína	Péptido no.	Se une al subtipo HLA	Citrinulación	El péptido no citrulinado correspondiente se une al subtipo HLA:	Citrinulación necesaria para la unión a estos genotipos:	SEQ ID No
a-enolasa	287	*0401	si	0101,0404	0401	14
a-enolasa	289	*0401	si	-	0401	15
a-enolasa	291	*0401, *0404	si	0404	0401	16
a-enolasa	292	*0401	si	-	0401	17
a-enolasa	297	*0401	si	0101	0401	18
a-enolasa	300	*0401	si	-	0401	19

Proteína	Péptido no.	Se une al subtipo HLA	Citrulinación	El péptido no citrulinado correspondiente se une al subtipo HLA:	Citrulinación necesaria para la unión a estos genotipos:	SEQ ID No
a-enolasa	301	*0401	si	0404	0401	20
a-enolasa	302	*0401	si	-	0401	21
a-enolasa	305	*0401	si	-	0401	22
a-enolasa	313	*0401	si	0101,0401	-	23
a-enolasa	324	*0401	si	-	0401	24
colágeno tipo II	195	*0404	no	na	-	25
colágeno tipo II	242	*0401, *0404	no	na	-	26
colágeno tipo II	257	*0404	no	na	-	27
colágeno tipo II	137	*0401	no	na	-	28
colágeno tipo II	138	*0401	no	na	-	29
colágeno tipo II	386	*0401	si	0404	0401	30
colágeno tipo II	411	*0401, *0404	si	0401,0404	-	31

### Ejemplo 2

Se aislaron PBMC de varios pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 14 (número de referencia del péptido 287). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo cual indica que se ha producido la activación de las células T.

### Ejemplo 3

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo 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 influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente

tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo cual indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

#### Ejemplo 4

5 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 16 (número de referencia del péptido 291). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. Los datos de un paciente se muestran en la figura 2, que muestra un fuerte aumento de IL-17 en comparación con los controles. Los datos de un paciente se muestran en la figura 2. El péptido no citrulinado correspondiente (número de referencia del péptido 6, SEQ ID No 2) no produjo una respuesta, lo que podría esperarse porque la SEQ ID No 2 no une MHC con el genotipo 0401 (Tabla 1).

#### Ejemplo 5

20 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 17 (número de referencia del péptido 292). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

#### Ejemplo 6

30 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 18 (número de referencia del péptido 297). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. Los datos de un paciente se muestran en la figura 2, que muestra un fuerte aumento en IFN gamma e IL-17 en comparación con los controles. Los datos de un paciente se muestran en la figura 2.

#### Ejemplo 7

40 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 19 (número de referencia del péptido 300). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

#### 50 Ejemplo 8

Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 20 (número de referencia del péptido 301). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido

citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T.

#### Ejemplo 9

5 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 21 (número de referencia del péptido 302). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

#### Ejemplo 10

15 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo 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 influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestas al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T.

#### Ejemplo 11

25 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 22 (número de referencia del péptido 305). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. Los datos de un paciente se muestran en la figura 2.

#### Ejemplo 12

35 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo 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 influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T.

#### Ejemplo 13

45 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 23 (número de referencia del péptido 313). Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. Los datos de un paciente se muestran en la figura 1A.

#### Ejemplo 14

55 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-0401. Se añadió a las células el péptido de enolasa citrulinada con SEQ ID No 24 (número de referencia del péptido 324). Como control negativo,

5 las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 como para al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

**Ejemplo 15**

10 Se aislaron PBMC de pacientes con artritis reumatoide con genotipo HLA, HLA DRB1-1001. El péptido de colágeno citrulinado tipo II con SEQ ID No 46 (número de referencia del péptido 357) se añadió a las células. Como control negativo, las células se incubaron sin péptido. Se usó un péptido de influenza 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 oscilaban entre 5 y 50 ug/ml y después de una incubación de 5 días en una incubadora de CO<sub>2</sub>, las células se fijaron, se permeabilizaron y se realizó la tinción intracelular de citoquinas. Los anticuerpos para CD3, CD4, células viables, CD154 (un marcador de activación) y las citoquinas IFN gamma, IL-17A y TNF alfa se utilizaron para el análisis en un panel de citometría de flujo multiparamétrico. Las células de todos los pacientes expuestos al péptido citrulinado se tiñeron positivamente tanto para CD154 y al menos una citoquina, lo que indica que se ha producido la activación de las células T. El péptido no citrulinado no dio como resultado la activación.

15

20 Los datos de un paciente se muestran en la figura 1B.

**Ejemplos 2 - 15**

Los datos de los ejemplos 2-15 se resumen en la tabla 5. La activación de las células T significa que todos los pacientes son positivos para al menos una citoquina. Esto no se indica necesariamente en las figuras 1A y B, que muestran datos seleccionados de pacientes individuales para citoquinas seleccionadas.

25

Tabla 5.

Proteína	Péptido ref nº	HLA probado	Citrinulación	Se une a MHC in vitro	Activación de células 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

Proteína	Péptido ref nº	HLA probado	Citrinulación	Se une a MHC in vitro	Activación de células T	SEQ ID No
a-enolasa	49	*0401	sí	sí	sí	34
colágeno tipo II	357	*1001	sí	sí	sí	46

**Ejemplo 16**

5 Producción de complejo péptido-MHC: se produjo HLA-DRB1 \*0401 recombinante como se describe en Novak et al, J Clin Invest 1999; 104: R63-7. El DR0401 brevemente soluble se purificó 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 SEQ ID No 23 (número de referencia del péptido 313) por incubación a 37°C durante 72 horas en presencia de 2.5 mg/ml de n-octil-beta-D-glucopiranosido y 1 mM Prefabloc SC (Sigma-Aldrich).

**Ejemplo 17**

10 Producción y uso de tetrámeros. Los complejos péptido-MHC en el Ejemplo 16 se conjugaron con tetrámeros usando R-ficoeritrina-estreptavidina (Invitrogen) en una relación molar de 8:1. Las PBMC de un paciente con artritis reumatoide, HLA tipo \*0401, se tiñeron usando los tetrámeros y se analizaron inmediatamente por FACS. Se identificaron varias células T CD auxiliares positivas. Se podría estimar que aproximadamente 1 de 350000 células CD4 positivas reaccionaron con el péptido, lo que indica una respuesta inmune significativa. Los datos se presentan en la Figura 3, donde las células en la esquina superior derecha se unen al complejo péptido-MHC.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Omsab

Klareskog, Lars et al

20 <120> Nuevos péptidos

<130> 63500EP2

<160> 87

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

30 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> 3



ES 2 777 502 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

<210> 9

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

**Ala Glu Val Tyr His Asn Leu Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr**  
**1 5 10 15**

10 <210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

**Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro Val Val Ser Ile Glu Asp Pro**  
**1 5 10 15**

15 <210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 11

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

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 12

**Gly Ala Pro Cys Arg Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu**  
**1 5 10 15**

<210> 13

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

**Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu**  
**1 5 10 15**

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221>CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 14

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

10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 15

**Ile Phe Asp Ser Xaa Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe**  
**1 5 10 15**

20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 16

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

<210> 17

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 17

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

5 <210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<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

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

20 <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

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

30 <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

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

5 <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**

<210> 22

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

15 <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

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 23

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

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 24

ES 2 777 502 T3

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

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Pro  
1 5 10 15

20 <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

25 <210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <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>

5 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<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

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

15 <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

20 <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

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

**Lys Glu Gly Leu Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly**  
**1 5 10 15**

30 <210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu Ser Leu Gln  
 1 5 10 15

<210> 36

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

15 <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

<210> 37

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly  
 1 5 10 15

<210> 38

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Asn Gly Glu Pro Gly  
 1 5 10 15

30 <210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

<210> 40

5 <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

10 <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

15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<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

25

<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

30

<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

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 45

**Xaa Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Xaa Gly Phe Pro Gly Thr**  
**10 1 5 10 15**

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 46

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

20 <210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 47

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

<210> 48

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 48

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

5 <210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <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

20 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

<210> 52

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

30 <210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 777 502 T3

<400> 53

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

<210> 54

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

<210> 55

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

15 <210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

20 <210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 57

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

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 58

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

ES 2 777 502 T3

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <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

10 <213> Homo sapiens

<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

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

**Phe Arg Gln Asp Val Asp Asn Ala Ser Leu Ala Arg Leu Asp Leu**  
**1 5 10 15**

<210> 62

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

**Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Val Glu Ser Leu Gln Glu Glu**  
**1 5 10 15**

25 <210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

**Asp Val Arg Gln Gln Tyr Glu Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln**  
**30 1 5 10 15**

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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

<400> 65

**Ser Thr Glu Tyr Arg Arg Gln Val Gln Ser Leu Thr Cys Glu Val**  
**1 5 10 15**

10

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 66

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

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68

<211> 15

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

**Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu Glu**  
**1 5 10 15**

<210> 69

30

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

**Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Leu Pro Leu**  
**1 5 10 15**

<210> 70

<211> 15

5 <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

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

15 <223> Xaa es citrulina

<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

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

25 <400> 72

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

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 73

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

<210> 74

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

10 <400> 74

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

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 75

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

20 <210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<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**

30 <210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 81

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

<210> 82

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

15 <223> Xaa es citrulina

<400> 82

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

<210> 83

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

25 <400> 83

**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

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 84

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

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 85

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

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 86

**Xaa Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Xaa Ile Ser Leu Pro Leu**  
**20 1 5 10 15**

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISCELÁNEAS

<223> Xaa es citrulina

<400> 87

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en la SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia presente en la SEQ ID No 46 es citrulina.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID No 46.
3. Un complejo de un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y una proteína MHC de clase II recombinante humana.
- 10 4. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de artritis, preferiblemente artritis reumatoide.
5. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 o un complejo de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el diagnóstico de artritis, preferiblemente artritis reumatoide.
6. Un kit de partes que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 o un complejo de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 7. El kit de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende 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.
- 20 8. Un péptido de entre 8 y 20 aminoácidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos consecutivos con una secuencia presente en una secuencia seleccionada de la SEQ ID No 46, en el que al menos uno de los 8 residuos de aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia presente en la SEQ ID No 46 es citrulina, o un complejo de dicho péptido y una proteína MHC de clase II recombinante humana, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide u otros tipos de artritis.
- 25 9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el péptido consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID No 46 o un complejo de dicho péptido y una proteína MHC de clase II recombinante humana, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide u otros tipos de artritis.

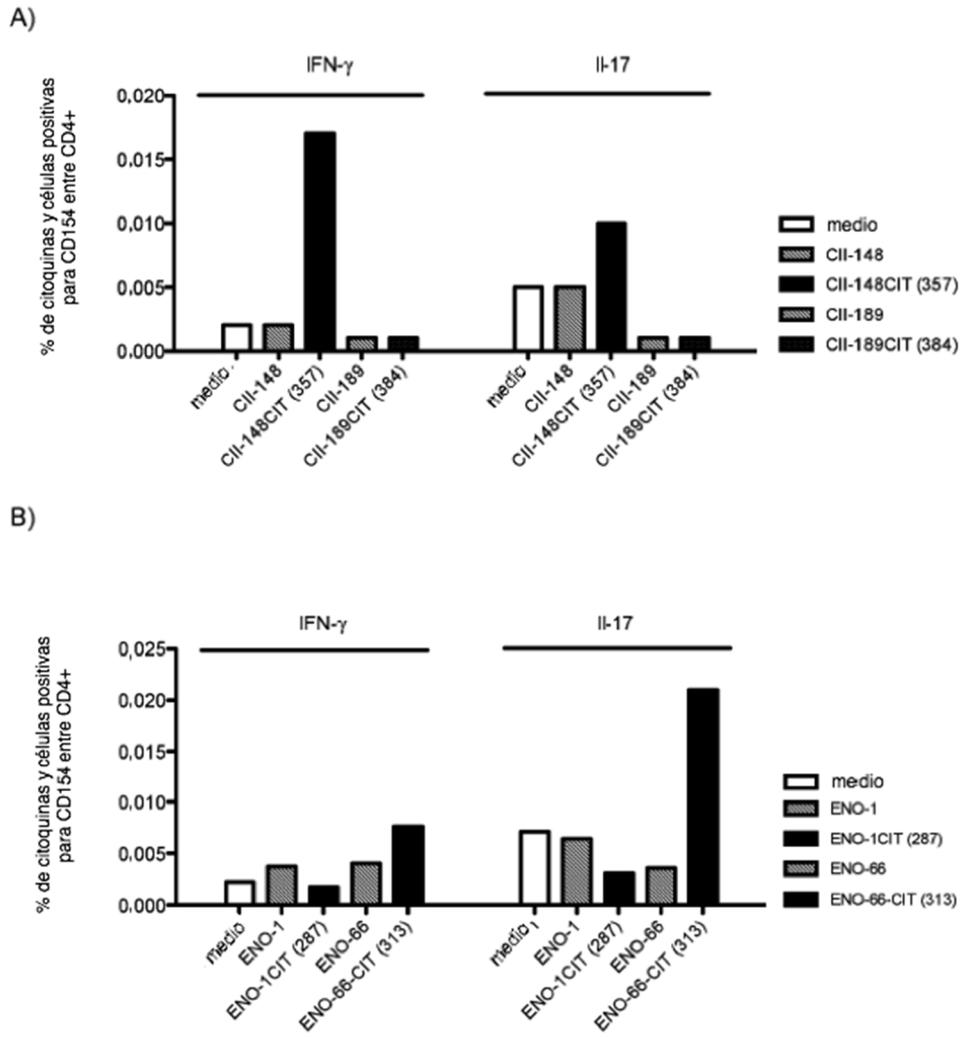


Fig. 1

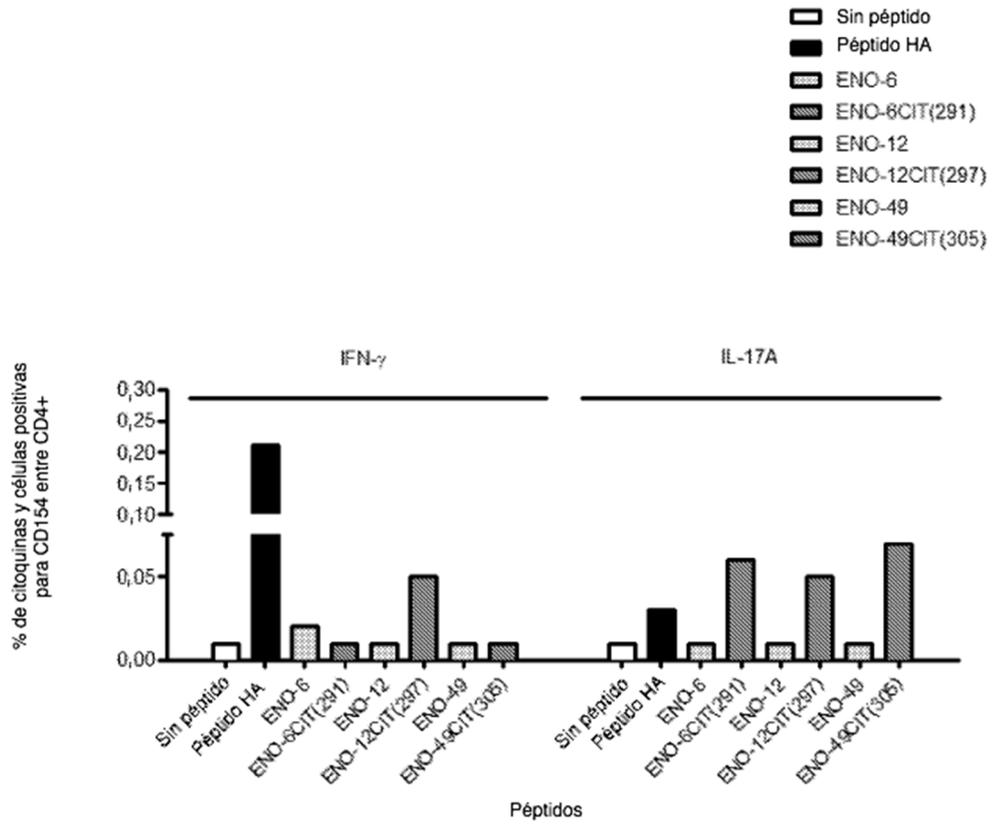


Fig. 2

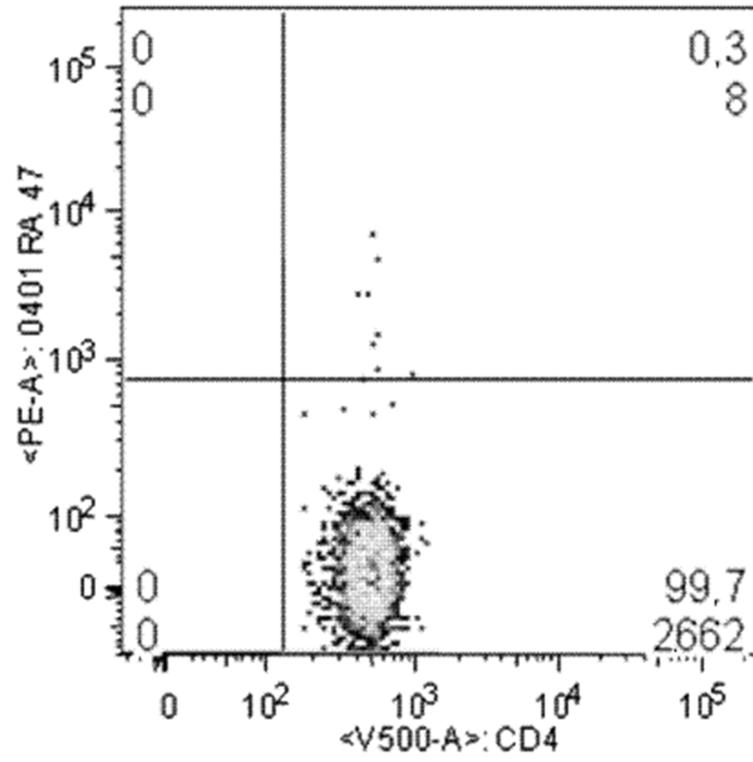


Fig 3.