

PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES Y FRAGMENTOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

CAMPO DE LA INVENCION

La descripción se refiere al tratamiento, diagnóstico y/o prevención de esclerosis múltiple al
5 utilizar una proteína o péptido inmunodominante. De manera más particular, la invención se
refiere al campo de inmunoterapias específicas de antígeno, tal como la inducción de
tolerancia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad inflamatoria
10 autoinmunitaria devastadora que afecta principalmente adultos jóvenes. La MS es un ejemplo
prototípico de una enfermedad autoinmunitaria específica de órganos (AID), ya que la
respuesta autoinmunitaria solo se dirige al sistema nervioso central (CNS) que consiste en el
cerebro y médula espinal. La AID de órganos específicos significa que el sistema
15 inmunológico del paciente daña un tejido o tipo celular específico mediante células T
autoreactivas y/o anticuerpos.

La MS afecta de manera preferente a los adultos jóvenes entre 20 y 40 años, pero los
niños y las personas mayores también pueden desarrollar MS. La enfermedad es
aproximadamente 2-3 veces más frecuente en mujeres que en hombres. La MS generalmente
se manifiesta clínicamente por problemas temporales con la visión (neuritis óptica aguda),
20 sensibilidad o función motora y autónoma, pero puede conducir a una amplia gama de
síntomas neurológicos.

En el momento de la primera manifestación, cuando se han excluido los diagnósticos
diferenciales, la enfermedad se denomina como síndrome clínicamente aislado (CIS, por sus
siglas en inglés) siempre que los hallazgos del líquido cefalorraquídeo (CSF, por sus siglas en
25 inglés) y la resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) sean compatibles con el
diagnóstico. La MRI describe lesiones en lugares típicos de la MS, es decir, yuxtacortical,
periventricular, en el tronco cerebral o médula espinal. Si se cumplen ciertos criterios que se
pueden resumir en diseminación en el espacio (más de una lesión o síntoma/signo clínico) y
tiempo (más de un evento) entonces se puede llevar a cabo el diagnóstico de esclerosis
30 múltiple remitente-recidivante (RRMS, por sus siglas en inglés). Un escenario especial es el
descubrimiento experimental de lesiones por MRI compatibles con MS sin síntomas clínicos.
Esto es referido como síndrome radiológicamente aislado (RIS, por sus siglas en inglés) y se
puede considerar una pre-etapa de CIS y RRMS. Más de 80% de paciente padecen de uno de
estos, y la mayoría de paciente desarrolla después lo que es llamado MS progresiva
35 secundaria (SPMS, por sus siglas en inglés). En este momento, las recaídas/exacerbaciones
se vuelven menos frecuentes o se detienen por completo y la discapacidad neurológica
aumenta de manera constante entre recaídas o sin o sin ellas.

Una forma especial de MS es la MS primaria progresiva (PPMS, por sus siglas en inglés), que nunca muestra recaídas, sino que comienza con un empeoramiento constante de los síntomas neurológicos, por ejemplo de la capacidad de caminar. La PPMS afecta aproximadamente el 10% de pacientes con MS y a hombres y mujeres con la misma frecuencia su inicio suele ser posterior a CIS o RRMS. Con respecto a las causas y los mecanismos de la enfermedad, PPMS se considera similar a la RIS-CIS-RRMS-SPMS anterior.

Típicamente, la MS es diagnosticada de acuerdo con los criterios de McDonald revisados o recientemente Lublin. Estos criterios también permiten distinguir entre las diferentes formas y actividad de la enfermedad de MS (Thompson y colaboradores, 2018, Lancet Neurol, 17(2):162-173).

La MS es una enfermedad con un trasfondo genético complejo. En la última década se han identificado más de 200 alelos de riesgos de MS o rasgos cuantitativos (variantes comunes de genes detectados como polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs) sin embargo, el más importante es, por mucho el haplotipo de antígeno leucocitario humano (HLA)-DR15. Además, se han encontrado varios factores de riesgo ambientales/de estilo de vida. Estos incluyen la infección por el virus de Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés), el tabaquismo, niveles bajos de vitamina D3 y obesidad como los más importantes.

Todos los factores de riesgo genéticos y ambientales son comunes y compartidos por muchas personas de la población sana. Las razones exactas por las que la enfermedad comienza en individuos con ciertos factores de riesgos genéticos y ambientales no están claras, pero se asume que las infecciones virales y bacterianas, por ejemplo, por cambios en la microbiota intestinal, pueden ser desencadenantes. La tasa de concordancia de gemelos monocigóticos del 10-30% y el riesgo de pariente de primer grado de un paciente con MS de aproximadamente 2-4%, en comparación con un riesgo de 1/1000 en la población general, proporcionan una estimación de la genética frente al riesgo ambiental, aunque la interacción entre ambos también es compleja.

A fin de identificar los componentes del CNS, contra los que se dirige la respuesta autoinmunitaria en MS, los investigadores orientaron sus esfuerzos hacia las células y estructuras que se ven afectadas en la MS, de manera particular la mielina y axones/neuronas y proteínas específicas de estas células/estructuras. Durante los últimos treinta años, varias proteínas de mielina como la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés), la proteína proteolipídica (PLP, por sus siglas en inglés) y la glicoproteína oligodendroglia de mielina (MOG, por sus siglas en inglés) han sido identificadas como encefalitogénicas en modelos animales (encefalomielitis autoinmunitaria experimental; EAE), es decir su inyección en las cepas de roedores susceptibles conducen a una enfermedad similar a la MS, pero también al examinar las células inmunitarias de los pacientes con MS (Sospedra y Martin,

2005, Annu Rev Immunol, 23:683-747). Los autoantígenos anteriores son específicos de CNS y se expresan exclusivamente (PLP y MOG) o casi exclusivamente (MBP) en el cerebro. En la MS, algunos autoantígenos que no son específicos del CNS como el alfa-B cristalina y la transaldolasa-H también se han descrito como posibles objetivos.

5 La evidencia actual sugiere que las células T autoreactivas CD4+ son un factor central para la patogénesis auto inmune de la MS probablemente relevante no solo para la inducción y mantenimiento de la respuesta autoinmunitaria, sino también durante el daño del tejido (Sospedra y Martin, 2005). La frecuencia de células T CD4+ de alta avidez que reaccionan los principales constituyente de la cubierta de mielina, tal como MBP, PLP y MOG aumenta en
10 pacientes con MS (Bielekova y colaboradores, 2004, J Immunol, 172:3893-3904). Debido a su participación en la patogénesis de la enfermedad, las células T CD4+ son un objetivo para las intervenciones terapéuticas.

La investigación detallada de la respuesta inmune contra las proteínas específicas de CNS mostró que ciertos péptidos de las mismas son reconocidos por una gran fracción de
15 pacientes y en el contexto de las moléculas HLA-DR asociadas a la enfermedad. Estos péptidos se denominan inmunodominantes (Bielekova y colaboradores, 2004).

Las siguientes características indican que cierto péptido de una proteína es inmunodominante en el contexto de la MS:

a) reconocimiento frecuente de este péptido por células T, es decir en
20 aproximadamente 10% o más de los pacientes con MS, frecuentemente en el contexto de un alelo o haplotipo HLA asociado a la enfermedad (Sospedra y Martin, 2005), y

b) reconocimiento de este péptido por células T relevantes para la enfermedad, tal como las que corresponden a péptidos en concentraciones bajas (células T de alta avidez) (Bielekova y colaboradores, 2004) y por lo tanto se consideran particularmente peligrosas y/o
25 tienen un fenotipo pro-inflamatorio, y/o se aíslan del órgano o compartimiento objetivo (CNS), en el caso de MS, células T que infiltran el cerebro, médula espinal o CSF.

Sin embargo, el reconocimiento de alta avidez no es un pre-requisito, puesto que las células T específicas de mielina de baja avidez también han mostrado que son patogénicas en los modelos de ratón transgénicos humanizados (Quandt y colaboradores 2012, J Immunol,
30 189(6): 2897-2908).

Se ha mostrado recientemente que las células T de pacientes con MS mostraron proliferación *in vitro* incrementada en la ausencia de un antígeno exógeno (Mohme y colaboradores, 2013, Brain, 136:1783-1798). Estas células T “autoproliferantes” son enriquecidas para células que se alojan al compartimiento CNS de los pacientes con MS y de
35 esta manera se pueden considerar como una fuente de sangre periférica de células T que infiltran el cerebro/CSF (Jelicic y colaboradores, 2018, Cell, 175(1):85-100.e23).

En el caso de que los datos de las células T de prueba *in vitro* no sean disponibles o

además de estas pruebas, el reconocimiento inmunitario de los péptidos también se puede predecir/inferir de aquellos péptidos que se unirán bien a los alelos HLA-clase I o -clase II del individuo y para las células T CD8+ y CD4+ T respectivamente. Las predicciones de unión a péptido son bien conocidas por la persona experta. Se pueden llevar a cabo por algoritmo de producción bien establecidos (NetMHCII - www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/; IEDB - www.iedb.org/) y el análisis de los motivos de unión a HLA (SYFPEITHI - www.syfpeithi.de/).

Se pueden utilizar péptidos inmunodominantes en las inmunoterapias específicas de antígeno tal como inducción de tolerancia. Un ejemplo es EP 2 205 273 B1, que describe péptidos inmunodominantes de MBP, PLP y MOG y su aplicación para tratamiento de MS. En el procedimiento descrito en la presente, los péptidos se acoplan a glóbulos blancos o rojos.

La inducción de tolerancia es específica de antígeno y hace las células T autoreactivas no funcionales o anérgicas o induce células T reguladoras (Treg) que suprimen específicamente la autoinmunidad adversa a estos antígenos objetivo. La inducción de la tolerancia a autoantígenos objetivo es un objetivo terapéutico altamente importante en enfermedades autoinmunitarias. Ofrece la oportunidad de atenuar específicamente la respuesta autoinmunitaria patogénica en una forma efectiva con pocos efectos secundarios. La inducción de tolerancia también se puede lograr al aplicar una proteína entera en lugar de, o además de un péptido inmunodominante que es un fragmento de la proteína (Kennedy MK y colaboradores, 1990, J Immunol, 144(3):909-15).

Algunas característica patológicas de MS se reflejan en el modelo EAE, un modelo animal para paradigmático de enfermedad autoinmunitaria conducida por células Th1/Th17. Estudios en EAE recidivante (R-EAE) en el ratón SJL han mostrado claramente que la desmielinación crónica implica la activación de respuestas de células T a un péptido de mielina inmunodominante, es decir, PLP 139-154, al cual se dirige la primera exacerbación de la enfermedad. Subsecuentemente, la respuesta inmunitaria se amplía otros péptidos de mielina de PLP, MBP y MOG, un proceso, que es referido como propagación de epítomos. La falta de repuesta de las células T, es decir, tolerancia, por ejemplo se puede inducir cuando las células que presentan antígeno (APC) pulsadas con el péptido antigénico se tratan por ejemplo con el ligador cruzado 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI; también abreviado como EDC).

Los experimentos preclínicos han probado que una sola inyección i.v. de esplenocitos de murino sin tratamiento previo pulsados con una mezcla de péptidos de mielina encefalitogénica y fijados con el reticulador cruzado EDC es altamente eficiente en inducir la tolerancia específica de péptido in vivo. En la EAE, este protocolo no solo impide que los animales se enfermen, sino aún reduce de manera eficaz el inicio y gravedad de todas las recaída subsecuentes cuando se da después de la inducción de la enfermedad, indicando que la tolerancia específica puede regular por decremento una repuesta autoinmunitaria en curso

(Miller y colaboradores, 1991, Acad Sci, 636:79-94). Más relevante el tratamiento de MS, los estudios en EAE han mostrado que la tolerancia se puede inducir simultáneamente a múltiples epítomos utilizando un cóctel de péptido de mielina encefalitogénica, proporcionando de esta manera la capacidad de fijar como objetivo las células T autoreactivas con múltiples especificidades.

La inducción de tolerancia inmunitaria de las células T humanas por células acopladas a antígeno autólogas, por ejemplo APCs (Vandenbark y colaboradores, 2000, Int Immunol, 12:57-66) o células no nucleadas, es decir glóbulos rojos (RBCs), tratadas con EDC es eficaz *in vitro* como se muestra por la falla de las células T tolerizadas a proliferar o producir citoquinas Th1 y una expresión disminuida de moléculas coestimuladoras en estas células.

Existe evidencia de que al menos dos mecanismos distintos se implican en la inducción de la tolerancia específica de antígeno por este régimen:

1) Tolerancia dirigida donde los clones Th1 encuentran complejos de antígeno/MHC nominales en las APCs acoplada a antígeno se energizaron como un resultado de la falla al recibir co-estimulación medida por CD28 adecuada, y

2) mecanismos indirectos tal como tolerancia cruzada, donde la tolerancia se induce por reprocesamiento y representación de antígenos por las APCs hospederas inductoras de tolerancia inmunitaria y/o expansión de células Treg.

La última tolerancia cruzada implica del mismo modo la inducción y/o expansión de las células Treg específicas de antígeno que se asume también es respaldada por los datos obtenidos en una fase de ensayo de laboratorio como se describe en la presente. Además, el tratamiento de las células con EDC induce la apoptosis en un porcentaje sustancial de célula tratadas. De esta manera, es probable que exista un mecanismo indirecto que involucre a las APC fijas en la apoptosis, que luego son procesadas y representadas por las APC del hospedero. Esto está respaldado además por la inducción eficaz de tolerancia en ratones alogénicos y deficientes en MHC. Las células dendríticas *in-vitro* derivadas de la médula ósea fagocitan y procesan eficazmente APC fijadas y pulsadas con antígeno.

Las terapias actualmente aprobadas para MS implican varias estrategias inmunomoduladoras o inmunosupresoras no específicas de antígeno, que son solo parcialmente eficaces. Todos los agentes terapéuticos actuales necesitan ser tomados oralmente diario o inyectados/infundidos en varios intervalos de tiempo y por períodos de tiempo prolongados. Además, se asocian con numerosos y algunas veces efector secundarios graves.

Una terapia que trata la patogénesis de MS y sus raíces debe fijar como objetivo específicamente o inhibir funcionalmente las células autoreactivas patogénicas sin alterar el sistema inmunitario "normal". Esto es de importancia debido a que la inmunomodulación e/o inmunosupresión global proviene del costo de inhibir las células reguladoras benéficas y la

células inmunitarias que sirven funciones protectoras contra los patógenos. Idealmente, la tolerancia inmunitaria, específica de péptido, es decir la corrección específica de la respuesta autoinmunitaria dirigida de manera errónea contra el tejido del cerebro/médula espinal, se debe lograr temprano en la fase inflamatoria de la enfermedad, cuando el bloqueo de la respuesta inmunitaria autoreactiva pueda inhibir la diseminación y propagación de la enfermedad y se puede prevenir la discapacidad irreversible. Por lo tanto, el grupo de pacientes orientado preferido son pacientes con MS recidivante-remitente en el curso de la enfermedad o aún en pacientes que se presentan con un primer evento clínico sugerente de MS, es decir CIS, o pacientes, en quien la enfermedad se descubre aún temprano en la etapa de RIS. En este punto de tiempo, los pacientes con MS tienen en general un bajo grado de discapacidad neurológica, lo cual les permite participar en todas las actividades de la vida diaria y trabajos sin compromiso significativo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención identificar antígenos relevantes de MS adecuados para el uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de MS, en particular en un procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria. Un aspecto adicional de la presente invención es la identificación de un sujeto humano quién es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria.

La presente invención se basa en un procedimientos novedoso para identificar antígenos relevantes de MS: células T expandidas clonalmente en el cerebro de en paciente con MS (homocigotos para el haplotipo HLA DR15, que se sabe que es el principal factor de resigo genético en la MS), que murieron de una forma muy agresiva de MS. De esta manera, se analizaron por primera vez células T que se originaban en el órgano objetivo y se expanden clonalmente en él, con el fin de identificar el antígeno. En todos los procedimientos anteriores, es analizaron los linfocitos de sangre periférica para identificar antígeno inmunodominantes.

La expresión clonal de un clon de células T (TCC, por sus siglas en inglés) en lesiones cerebrales de MS sugiere que las células son relevantes para la MS. En la presente, se han descrito previamente antígenos objetivo de un TCC específico en Planas y colaboradores (Planas y colaboradores, 2015, Ann Clin Transl Neurol, 2(9):875-893), se ha identificado TCC21.1. Además, se han identificado los antígenos objetivo de otro TCC (TCC14) del mismo paciente. En el caso de TCC14, se aisló el clon de una población de células T de sangre periférica que se identificó como relevante de enfermedad al mostrar proliferación espontánea incrementada (autoproliferación) y enriquecimiento para las células T autoreactivas que se dirigen al cerebro. Específicamente, el TCC14 también se encontró que se expande clonalmente en las lesiones cerebrales por MS, aunque se ha aislado de la sangre periférica. El aislamiento e identificación de las célula T relevantes de enfermedad como TCC21.1 y TCC14 es representada esquemáticamente en la FIGURA 1.

Los epítomos objetivo que son reconocidos por las célula T biológicamente relevantes (por ejemplo infiltrantes de tejido) entonces se puede identificar (FIGURA 2).

Este procedimiento novedoso reveló las proteínas GDP-L-fucosa sintasa (abreviación génica: TSTA3; también conocida como: GDP-L-fucosa:NADP+ 4-oxidoreductasa (3,5-epimerizante) o GDP-4-ceto-6-desoxi-D-mannosa-3,5-epimerasa-4-reductasa) y las proteínas de la familia RASGRP (proteína liberadora de guanilo RAS), incluidas RASGRP1, RASGRP2, RASGRP3 y RASGRP4 así como variantes de empalme e isoformas de las mismas como particularmente relevantes en la MS. RASGRP2 es específicamente preferida. De esta manera, estas proteínas se han encontrado que son inmunodominantes en la MS y son auto-
10 antígenos.

La relevancia también se ha probado en las células T CD4+ infiltrantes de CSF de pacientes con CIS/MS para la GDP-L-fucosa sintasa y en las células mononucleares derivadas de sangre periférica para RASGRP2. En un análisis adicional, tanto la GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2 se han probado en las células T CD4+ infiltrantes de CSF de los
15 pacientes con CIS/MS.

De esta manera, los antígenos como se describe en la presente en los ejemplos son los primeros antígenos inmunodominantes en MS, que se han descubierto al examinar la especificidad de las células T que se expanden clonalmente en las lesiones cerebrales por MS y por lo tanto se puede asumir que se implican en la reacción autoinmunitaria dañina en el
20 cerebro. La metodología que condujo a su identificación, las genotecas de péptidos de combinación no implica el enfoque mencionado en lo anterior o las proteínas de mielina/cerebro, sino es completamente libre de sesgo. Los antígenos no se han descrito antes como implicados en la MS. Además, la secuenciación de ARN y proteómica han mostrado que ambos autoantígenos, GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2 y las proteínas
25 liberadoras RASGRP1 y -3, se expresan en el tejido cerebral de MS.

Se pueden utilizar los antígenos identificados en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de MS, en particular en un procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria, y para identificar un sujeto humano, quien es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria. Al identificar un humano, quien es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria, el sujeto
30 humano se puede diagnosticar *in vitro* con MS. En otras palabras, se pueden utilizar a los autoantígenos identificados en el diagnóstico *in vitro* de MS. Esta prueba *in vitro* se puede complementar con descubrimientos clínicos y de formación de imágenes, es decir, el diagnóstico de la MS diagnóstico de acuerdo con un estado de la técnica, en particular de acuerdo con los criterios de McDonald revisados. De esta manera, los autoantígenos
35 identificados pueden servir al diagnóstico de MS en un sujeto humano ya sea con o sin pruebas de diagnóstico adicionales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1. Aislamiento de células T relevantes de enfermedad. FIGURA 2.

Descubrimiento del epítipo objetivo

FIGURAS 3A-3F. Mezclas de escaneo posicionales de decapeptido de definición única y doble en combinación con análisis biométrico para identificar la especificidad de TCC21.1

FIGURA 4. Resumen de decapeptidos humanos predichos con el procedimiento biométrico, sintetizado y probados para determinar su capacidad estimuladora.

FIGURA 5. Transcritos de GDP-L-fucosa sintasa y péptidos identificados en el tejido cerebral.

FIGURA 6. GDP-L-fucosa sintasa, mielina y Péptidos CEF (péptidos de control de citomegalovirus, virus de Epstein Barr e virus de influenza).

FIGURA 7. Reconocimiento de péptidos de GDP-L-fucosa sintasa por células T CD4+ infiltrantes de CSF de pacientes con CIS/MS.

FIGURAS 8A-8B. Aislamiento de células T autoproliferantes y células T autoproliferantes encontradas en las lesiones cerebrales por MS.

FIGURA 9. Procedimiento de clasificación para identificación del ligado de péptido de la autoproliferación, TCC14 que se dirige al cerebro aislado de sangre periférica utilizando una genoteca de escaneo posicional.

FIGURA 10. Reactividad de RASGRP2 de células T de memoria derivadas de sangre periférica.

FIGURAS 11A-11B. Expresión de RASGRPs en células B de sangre periférica y cerebro.

FIGURA 12. Identificación del péptido de la proteína RASGRP1, 2 y 3 en el tejido del cerebro.

FIGURA 13. Tinción de las células acopladas a biotina-PLP1.

FIGURAS 14A-14B. Reconocimiento de la GDP-L-fucosa sintasa y péptidos de mielina por célula T CD4+ infiltrantes de CSF de pacientes 105 MS.

FIGURAS 15A-15B. Reconocimiento de RASGRP2 y péptidos de mielina por célula T CD4+ infiltrantes de CSF de 57 pacientes con MS.

FIGURAS 16A-16C. Inducción de tolerancia *in vivo* con glóbulos rojos acoplados a los péptidos de mielina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las células T utilizadas para identificar péptidos inmunodominantes y la proteína correspondiente son idealmente aquellas células T que son patogénicamente relevantes para la enfermedad. Con respecto a la última característica, aquellas células t que se expanden clonalmente en el tejido objetivo de MS, del cerebro, médula espinal y CSF, son de interés más grande para identificación de los antígenos objetivo relevantes de enfermedad. De

acuerdo con un método como se describe por Planas y colaboradores (2015) la secuenciación de próxima generación de las secuencias de ADN complementarias o genómicas beta de receptor de células T (TCR) se ha utilizado para identificar las células T clonalmente expandidas en las lesiones de autopsia cerebral con los pacientes con MS y aislar estas
 5 células T como TCC de CSF autólogo y/o tejido (que comprende células vivas y obtenidas por, por ejemplo biopsia o autopsia temprana) y las caracterizan con respecto al fenotipo funcional y especificidad de antígeno. De esta manera se han aislado TTC relevantes de enfermedad. Específicamente, TCC21.1 se ha identificado y caracterizado: TCC21.1 mostró un fenotipo Th2 que libera principalmente citoquinas Th2 y fue capaz de proporcionar la ayuda de células
 10 B para la producción de anticuerpos. Esta estrategia ha conducido la identificación de la relevancia de la proteína GDP-L-fucosa sintasa.

La estrategia anterior, es decir, secuenciación de TCR profunda de células T infiltrantes de cerebro/médula espinal/CSF, también ha mostrado que aísla célula T relevantes de enfermedad de la sangre periférica y células T identificadas por el clon de las células
 15 mononucleares de sangre periférica autoproliferantes (PBMC). Esta estrategia ha conducido a la identificación de la relevancia de la familia de la proteína RASGRP.

Los presentes estudios con células T infiltrantes de CSF (para GDP-L-fucosa sintasa y en un análisis adicional tanto para GDP-L-fucosa sintasa como RASGRP2) y con las células T de sangre periférica (para RASGRP2) muestran de esta manera que existen dianas
 20 inmunodominantes de la respuesta inmunitaria en MS, y tanto en la GDP-L-fucosa sintasa como RASGRP2 (y otros miembros de la familia RASGRP) son reconocidos por las células T infiltrantes del cerebro en MS, incluida CIS, RRMS y SPMS. La NetMHCII y la IEDB en usar algoritmos de predicción de unión a péptido in silico también se han utilizado para identificar regiones inmunodominantes dentro de la proteína respectiva (como se describe en
 25 “Ejemplos”).

La enzima citosólica GDP-L-fucosa sintasa convierte GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa en GDP-L-fucosa, que luego se utiliza para fucosiltransferasas para fucosilar todos los oligosacáridos. En los mamíferos, los glicanos fucosilados desempeñan funciones importantes en muchos procesos biológicos incluidas reacciones por transfusión de sangre, interacciones
 30 de hospedero-microbio, patogénesis del cáncer y mantenimiento de un entorno no inflamatorio en el cerebro.

Las proteínas RASGR existen en al menos las cuatro variantes RASGRP1, RASGRP2, RASGRP3 y RASGRP4. RASGRP1, RASGRP2, RASGRP3 en particular se han implicado en la presente invención. La familia de proteínas se caracteriza por la presencia de un dominio de
 35 factor de intercambio de nucleótidos de guanina de la superfamilia Ras (GEF) que funciona como un factor de intercambio de nucleótidos regulado por diacilglicerol (DAG) que activa específicamente Ras a través del intercambio de GDP unido para GTP. Las proteínas en la

familia de la proteínas activan una cascada de Erk/MAP cinasa. Se implican en apoptosis reducida y la tumorigénesis de las células B infectadas con EBV, señalización de células B y T, adhesión, motilidad y son cruciales para mantener la homeostasis de las célula B-T. Existen al menos cuatro isoforma, es decir variantes de empalme, de RASGRP2.

5 Los antígenos identificados, GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2 (así como RASGRP1, RASGRP3 y RASGRP4) no se han implicado antes en la etiología de MS o patogénesis por su modelo animal, EAE. El presente descubrimiento de que ambas proteínas o fragmentos, derivados o variantes de empalme de los mismos son un objetivo de inmunodominante de la repuesta autoinmunitaria en MS permite su uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención
10 de MS.

Se pretende que una proteína signifique oligopéptido, polipéptidos así como proteínas como tal. Una secuencia de proteínas se puede definir por una entrada de GenBank. Una secuencia de proteína también se puede definir por una entrada UniProtKB/ Swiss-Prot y/o por una entrada GenPept. Una entrada se puede definir por un número, por ejemplo un número de
15 acceso. Donde es aplicable, las entradas de base de datos incluyen el número de acceso respectivo (es decir un número de entrada) y número de versión. Una proteína también se puede definir por cualquier otra base de datos conocida por la persona experta. Diferentes isoformas, derivados y/o variantes de empalme pueden existir los cuales también son abarcados por la presente invención. De esta manera, la secuencia puede variar de la
20 secuencia conocida de, por ejemplo, la entrada de GenBank o UniProtKB/ Swiss-Prot.

“Una” proteína o “la” proteína de acuerdo con la presente invención se refiere a ya sea una proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, de manera preferente RASGRP2, o se refiere tanto a la proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, de manera preferente RASGRP2, a menos que
25 se mencione explícitamente de otra manera.

Una variante de empalme surge del empalme alternativo durante la expresión génica. La variante de empalme de acuerdo con la invención es de manera preferente inmunodominante.

Un fragmento es de manera preferente cualquier parte de la proteína, que es más
30 corta, es decir, tiene menos aminoácidos, que la proteína precursora. Un fragmento puede ser un péptido. En una modalidad, un fragmento comprende 5 a 50, de manera preferente 5 a 20, de manera más preferente 10 a 15 aminoácidos, de manera aún más preferente 15 aminoácidos. El fragmento de acuerdo con la invención es de manera preferente inmunodominante.

35 También es posible utilizar más de un fragmento de acuerdo con la invención. De manera preferente, se utilizan más de tres, más de cinco, más de 10, más de 15, o aún más de 20 fragmentos diferentes. En una modalidad preferida, se utilizan entre cinco y 20, de

manera preferente entre cinco y 15 fragmentos diferentes. Un fragmento es diferente de otro fragmento si no consiste la misma secuencia de aminoácidos.

En otra modalidad, al menos un fragmento de cada proteína de acuerdo con la presente invención (una proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, de manera preferente RASGRP2) se utilizan en combinación. Es particularmente ventajoso combinar al menos un fragmento de cada proteína de acuerdo con la presente invención con al menos un péptido conocido del estado de la técnica, en particular con al menos un péptido de mielina, en particular con al menos uno o todos los péptidos de mielina como se define por SEQ ID NOs: 261 a 267.

Un derivado de una secuencia se define de manera preferente como una secuencia de aminoácidos que comparte una homología o identidad sobre su longitud completa con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia de al menos 75%, de manera más preferente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. La “parte correspondiente” en el sentido de la presente invención se refiere de manera preferente al mismo estiramiento de aminoácidos de la misma secuencia precursora. Por ejemplo, si un derivado con una longitud de 100 aminoácidos difiere de un estiramiento de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 1 a 100 de SEQ ID NO: 1) por 20 aminoácidos, este derivado particular comparte una identidad de 80% sobre su longitud completa con la parte correspondiente, es decir aminoácidos 1 a 100, de la secuencia de aminoácidos de referencia, es decir SEQ ID NO: 1. El derivado de acuerdo con la invención es de manera preferente inmunodominante.

Una “homología” o “identidad” de una secuencia de aminoácidos se determina de manera preferente de acuerdo con la invención sobre la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia o sobre la longitud completa de la parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia que corresponde a la secuencia cuya homología o identidad se define.

Una “identidad” se define como aminoácidos idénticos, una “homología” comprende aminoácidos idénticos así como sustituciones conservadoras. La persona experta en la técnica está consciente de las sustituciones conservadoras, tal como

- F y W/Y aromáticas y aromáticas
- R y K/H positivamente cargadas y positivamente cargadas
- E y D negativamente cargadas, o
- V y L/M/I, o A y S/T alifáticas.

La secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas de la presente invención o fragmento, derivado o variante de empalme del mismo se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos de codificación, por ejemplo ARN o ADN, en particular ARNm o

ADNc. En una modalidad, la secuencia de nucleótidos es un plásmido o cualquier tipo de vector conocido por la persona experta en la técnica. En una modalidad preferida, las secuencias de nucleótidos no comprenden intrones y las secuencias de genes comprende exones e intrones.

5 En un aspecto de la invención, la proteína para el uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de esclerosis múltiple (MS) es GDP-L-fucosa sintasa o un fragmento, derivado o variante de empalme del mismo. En otro aspecto de la invención, la proteína es un miembro de la familia RASGRP o un fragmento, derivado o variante de empalme de la misma. La invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifican cualquiera de las
10 proteínas o fragmentos, derivado o variante de empalme de las mismas, para el uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de esclerosis múltiple (MS).

En una modalidad preferida, las proteinasa son proteinasa humanas y/o las secuencias de nucleótidos y/o secuencias de genes son secuencias humanas.

En una modalidad, la GDP-L-fucosa sintasa muestra actividad enzimática que
15 convierte la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa en GDP-L-fucosa.

En otra modalidad, el miembro de la familia RASGRP activa Ras a través del intercambio del GDP unido por a GTP. Adicional o alternativamente, la proteína activa la cascada de Erk/MAP cinasa.

En una modalidad preferida, la proteína a GDP-L-fucosa sintasa

20 a) tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o

b) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o

c) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, de manera preferente al
25 menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o

d) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 y la
30 proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o fragmento del mismo o

e) se codifica por un gen TSTA3, en particular por una secuencia de genes de nucleótidos 143612618 a 143618048 de NC_000008.11, se codifica por un gen que es al
35 menos 80%, de manera preferente al menos 90%, de manera aún más preferente al menos 95% idéntico a la secuencia de genes de los nucleótidos 143612618 a 143618048 de NC_000008.11.

En otra modalidad preferida, el miembro de la familia de proteínas RASGRP

f) tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

5 g) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

10 h) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

15 i) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 y la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos que es respectiva como se expone en
20 cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o fragmento de las mismas o

j) se codifica por un gen RASGRP, en particular por una secuencia de genes de nucleótidos

- 38488101 a 38565575 de NC_000015.10,
- 25 – 64726911 a 64745456 de NC_000011.10,
- 33436324 a 33564750 de NC_000002.12, o
- 38409051 a 38426305 de NC_000019.10,

se codifica por un gen que es al menos 80%, de manera preferente al menos 90%, de manera aún más preferente al menos 95% idéntico a la secuencia de genes de los nucleótidos

- 30 – 38488101 a 38565575 de NC_000015.10,
- 64726911 a 64745456 de NC_000011.10,
- 33436324 a 33564750 de NC_000002.12, o
- 38409051 a 38426305 de NC_000019.10.

35 La unión a un alelo autólogo HLA, el reconocimiento por una célula T y/o reconocimiento por un anticuerpo puede indicar inmunodominancia de la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma. La inmunodominancia también se puede probar como se

describe a continuación.

En una modalidad particularmente preferida, una GDP-L-fucosa sintasa o proteína RASGRP2 o variante de empalme de la misma, de manera preferente la GDP-L-fucosa sintasa o proteína RASGRP2, se utiliza en la presente invención. La proteína GDP-L-fucosa sintasa tiene, por ejemplo, la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1, la proteína RASGRP2 tiene, por ejemplo, la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

En una modalidad, el fragmento comprende 5 a 50, de manera preferente 5 a 20, de manera más preferente 10 a 15, de manera aún más preferente 15 aminoácidos.

En otra modalidad, el fragmento es

a) al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o

b) al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o

c) al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva y se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos que es respectiva.

la "secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva" se refiere al fragmento respectivo de la secuencia de aminoácidos correspondiente (es decir SEQ ID NO: 1) con la misma longitud como el fragmento homólogo (ver también la definición de "parte correspondiente" *supra*). Un fragmento con esta identidad y/u homologías puede comprender 5 a 50, de manera preferente 5 a 20, de manera más preferente 10 a 15, de manera aún más preferente 15 aminoácidos. La identidad y/u homología se determinan sobre la longitud completa del fragmento respectivo. En otras palabras, la "secuencia de aminoácidos correspondientes" se refiere a la secuencia no alterada, es decir cuando un fragmento o secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1 es 85% idéntica a un aminoácido correspondiente respectivo, el fragmento es 85% idéntico (sobre la longitud completa del fragmento) al fragmento no alterado como "escindido", es decir directamente tomado o copiado de ID NO: 1.

Por lo tanto, en una modalidad, la proteína (GDP-L-fucosa sintasa o un miembro de la familia de proteínas RASGRP) tiene una secuencia de aminoácidos con una cierta homología (al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90%) a la secuencia representada respectiva como se expone en SEQ ID NOs con el requisito adicional que la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una

célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO respectiva o fragmento del mismo. En otra modalidad, la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo y es reconocido por una célula T que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO respectiva o fragmento del mismo.

Los ensayos para medir y/o predecir la unión a un alelo HLA autólogo, reconocimiento por una célula T o reconocimiento por un anticuerpo son bien conocidos por la persona experta en la técnica. La unión de un péptido a un alelo HLA por ejemplo se puede predecir mediante el uso de los algoritmos de predicción de unión a péptido in silico NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) o IEDB (<http://www.iedb.org/>) acepados. El reconocimiento de células T por ejemplo se puede medir por un ensayo de proliferación de célula T, por ejemplo al medir la radioactividad incorporada. La unión de un péptido y/o una proteína a un anticuerpo se puede medir por ensayos estándares conocidos por la persona experta en la técnica, por ejemplo por ELISA. La unión a un alelo HLA autólogo, reconocimiento por una célula T o reconocimiento por un anticuerpo pueden indicar inmunodominancia de un péptido o proteína. La inmunodominancia también se puede probar como describe a continuación.

En una modalidad, el fragmento representa un estiramiento de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, 20 a 30 aminoácidos) que son al menos 90% idénticos y homólogos entre las proteínas de la familia RASGRP.

En una modalidad preferida los péptidos utilizados para el tratamiento de acuerdo con la invención son fragmentos de GDP-L-fucosa sintasa o de una proteína de la familia de proteínas RASGRP y comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 10 a 98. En modalidades especialmente preferidas, los péptidos consisten de las secuencia de aminoácidos como es representada en una de las SEQ ID NOs: 10 a 98. Las secuencias de SEQ ID NOs: 10 a 35 son preferidas.

Las secuencias de acuerdo con SEQ ID NOs: 10 a 35 se han identificado como péptidos inmunodominantes debido a que son reconocidos por las células T relevantes de enfermedad, y la validación subsecuente del reconocimiento por células T a granel infiltrantes de CSF para la GDP-L-fucosa sintasa y PBMC para RASGRP2, (véase "Ejemplos"). La secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs: 36 y 37 representan un estiramiento de secuencias idénticas entre RASGRP2 y RASGRP3 (alineación de UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 y UniProtKB/ Swiss-Prot Q8IV61). Los aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs 38 a 98 están comprendidos en acumulación de péptido que dan origen a las reacciones de las células T de memoria de los pacientes con MS (referencia 9. de los Ejemplos y la FIGURA 10). Las secuencias con SEQ ID NOs: 12, 21, 23, 28 y 32 (GDP-L-fucosa sintasa) y con SEQ ID NO: 46 (RASGRP2) se han validado con un análisis adicional con células T CD4⁺

infiltrantes de CSF (referencia 13. de “Ejemplos” y las FIGURAS 14A-14B y 15A-15B).

Las secuencias de SEQ ID NOs: 1-98 también se enlistan en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Secuencias de proteína, posición y entrada de base de datos. La secuencia Q7LDG7-1 es la secuencia canónica de la proteína RASGRP2 y también se refiere a la isoforma 1 RASGRP2. Las proteínas y péptidos representados a continuación son modalidades particularmente preferidas de la invención.

SEQ ID NO:	Secuencia (aminoácidos)	Posición	Base de datos
1	MGEPQGSMRILVTGGSLVGKAIQKVADGAGL PGEDWVVFVSSKDADLTDTAQTRALFEKVQPTHV IHLAAMVGGLFRNIKYNLDFWRKNVHMNDNVLH SAFEVGARKVVSCLSTCIFPDKTTYPIDETMIHNG PPHNSNFGYSYAKRMIDVQNRAYFQQYGCTFTA VIPTNVFGPHDNFNIEDGHVLPGLIHKVHLAKSS GSALTWVGTGNPRRQFIYSLDLAQLFIWVLREYN EVEPIILSVGEEDEVSIKEAAEAVVEAMDFHGEVT FDTTKSDGQFKKTASNSKLRTYLPDFRFTPFKQA VKETCAWFTDNYEQARK	1-321 (proteína completa)	GenBank AAH93061.1 o UniProtKB/ Swiss-Prot: Q13630 (GDP L- fucosa sintasa)
2	AAAAARPAGGSARRWGRPGRCGLLAAGPKRVR SEPGGRLPERSLGAHPAPAAMAGTLDLDKGCT VEELLRGCI EAFDDSGKVRDPQLVRMFLMMHP WYIPSSQLAAKLLHIYQQSRKDNSNSLQVKTCHL VRYWISAFPAEFDLNPELAEQIKELKALLDQEGN RRHSSLIDIDSVPTYKWKRQVTQRNPVGQKKRK MSLLFDHLEPMELAEHLTYLEYRSFCKILFQDYH SFVTHGCTVDNPVLERFISLFSVSVQWVQLMILS KPTAPQRALVITHFVHVAEKLLQLQNFNTLMAVV GGLSHSSISRLKETHSHVSPETIKLWEGLTELVT ATGNYGNYRRRLAACVGFRFPILGVHLKDLVAL QLALPDWLDPARTRLNGAKMKQLFSILEELAMVT SLRPPVQANPDLLSLLTVSLDQYQTEDELYQLSL QREPRSKSSPTSPTSCTPPRPPVLEEWTSAK PKLDQALVVEHIEKMVESVFRNFDVDGDGHISQ EEFQIIRGNFPYLSAFGDLQDQNGCISREEMVS YFLRSSSVLGGRMGFVHNFQESNSLRPVACRH	1-662 (proteína completa)	GenBank AAI10307.1 (RASGRP2)

		CKALILGIYKQGLKCRACGVNCHKQCKDRLSVE CRRRAQSVSLEGSAPSPSPMHSHHHRAFSFSLP RPGRRGSRPPEIREEEVQTVEDGVFDIHL		
5	3	MGTLGKAREAPRKPSHGCRAASKARLEAKPAN SPFP SHPSLAHITQFRMMVSLGHLAKGASLDDLI DSCIQSFADAGNLCRSNQLLQVMLTMHRIVISSA ELLQKVITLYKDALAKNSPGLCLKICYFVRYWITE FWVMFKMDASLTDTEEFQELVKAKGEELHCRL IDTTQINARDWSRKL TQRIKSNTSKKRKVSLLFD HLEPEELSEHLYLEFKSFRRISFSDYQNYLVNS CVKENPTMERSIALCNGISQWVQLMVLSRPTPQ LRAEVFIKFIQVAQKLHQLQNFNTLMAVIGGLCHS SISRLKETSSHVPHEINKVLGEMTELLSSSRNYD NYRRAYGECTDFKIPILGVHLKDLISLYEAMPDYL EDGKVVNHKLLALYNHISELVQLQEVAAPPLEANK DLVHLLTSLDLYYTEDEIYELSYAREPRNHRAPP LTPSKPPVVDWASGVSPKDPKTISKHVQRMV DSVFKNYDHDQDGYISQEEFEKIAASFPSFCVM DKDREGLISRDEITAYFMRASSIYSKLGLGFPHNF QETTYLKPTFCDNCAGFLWGVKQGYRCKDCG MNCHKQCKDLVFECKKRAKNPVAPTENNTSV GPVSNLCSLGAKDLLHAPEEGPFTFPNGEAVEH GEESKDRTIMLMGVSSQKISLRLKRAVAHKATQT ESQPWIGSEGPSGPFVLSSPRKTAQDTLYVLPS PTSPCPSPLVRKRAFKWENKDSLKSKEELRH LRLPTYQELEQEINTLKADNDALKIQLKYAQKKIE SLQLEKSNHVLAQMEQGDCS	1-797 (proteína completa)	GenBank AAC97349.1 o UniProtKB/ Swiss-Prot: O95267 (RASGRP1)
30	4	MGSSGLGKAATLDELLCTCIEMFDDNGELDNSY LPRIVLLMHRWYLSSTELA EKLLCMYRNATGESC NEFRLKICYFMRYWILKFPAEFNLDLGLIRMTEEF REVASQLGYEKHVSLIDISSIPSYDWMRRVTQRK KVSKKGKACLLFDHLEPIELAEHLTFLEHKSFRRRI SFTDYQSYVIHGLENNTPLERSIALFNGISKWV QLMVLSKPTPQQRAEVITKFINVAKLLQLKNFNT LMAVVGGLSHSSISRLKETHSHLSSEVTKNWNE MTELVSSNGNYCNYRKAFADCDGFKIPILGVHLK	1-690 (proteína completa)	GenBank AAY15037.1 o UniProtKB/ Swiss-Prot Q8IV61 (RASGRP3)
35				

5	DLIAVHVIFPDWTEENKVNIVKMHQLSVTLSELVS LQNASHHLEPNMDLINLLTSLDLYHTEDDIYKLS LVLEPRNSKSQPTSPTTPNKPVVPLEWALGVMP KPDPTVINKHIRKLVESVFRNYDHDHDGYISQED FESIAANFPFLDSFCVLDKDQDGLISKDEMMAYF LRAKSQLHCKMGPFGFIHNFQEMTYLKPTFCEHC AGFLWGIIKQGYKCKDCGANCHKQCKDLLVLAC RRFARAPSLSSGHGSLPGSPSLPPAQDEVFEFP GVTAGHRDLDSRAITLVTGSSRKISVRLQRATTS QATQTEPVWSEAGWGDGSGHTFPKMKSKEFHDK AAKDKGFAKWENKPRVHAGVDVDRGTEFEL DQDEGEETRQDGEDG		
15	5 MNRKDSKRKSHQECTGKIGGRGRPRQVRRHKT CPSPREISKVMASMNLLGLLSEGGCSEDELLEKCI QSFDSAGSLCHEDHMLNMVLAMHSWVLPSADL AARLLTSYQKATGDTQELRRLQICHLVRYWLMR HPEVMHQDPQLEEVIGRFWATVAREGNSAQRR LGDSSDLLSPGGPGPPLPMSSPGLGKKRKVSLL FDHLETGELAQHLYLEFRSFQAITPQDLRSYVL QGSVRGCPALEGSGVLSNSVSRWVQVMVLSRP GPLQRAQVLDKFIHVAQRLHQLQNFNLTMAVTG GLCHSAISRLKDSHAHLSPDSTKALLELTELASH NNYARYRRTWAGCAGFRLPVLGVHLKDLVSLHE AQPDRLPDGRHLPLKLNLYLRLQELVALQGQH PPCSANEDLLHLLTSLDLFYTEDEIYELSYAREP RCPKSLPPSPFNAPLVVEWAPGVTPKPDRVTLG RHVEQLVESVFKNYDPEGRGTISQEDFERLSGN FPFACHGLHPPPRQGRGSFSREELTGyllRASAI CSKLGLAFLHTFHEVTFRKPTFCDCSGFLWGV TKQGYRCRECGLCCHKHCRDQVKVECKKRPGA KGDAGPPGAPVPSTPAPHASCGSEENHSYTLSL EPETGCQLRHAWTQTESPHPSWETDTVPCPVM DPPSTASSKLDS	1-673 (proteína completa)	UniProtKB/ Swiss-Prot Q8TDF6 o GenPept NP_733749. 1 (RASGRP4)
35	6 MAGTLDLDKGCTVEELLRGCI EAFDDSGKVRDP QLVRMFLMMHPWYIPSSQLAAKLLHIYQQSRKD NSNSLQVKTCHLVRYWISAFPAEFDLNPELAEQI	1-609 (proteína completa)	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1

5	KELKALLDQEGNRRHSSLIDIDSVPTYKWKRQVT QRNPVGQKKRKMSLLFDHLEPMELAEHLTYLEY RSFCKILFQDYHSFVTHGCTVDNPVLERFISLFN SVSQWVQLMILSKPTAPQRALVITHFVHVAEKLL QLQNFNTLMAVVGGLSHSSISRLKETHSHVSPET IKLWEGLTELVATGNYGNYRRRLAACVGFREFPI LGVHLKDLVALQLALPDWLDPARTRLNGAKMKQ LFSILEELAMVTSLRPPVQANPDLLSLLTVSLDQY QTEDELYQLSLQREPRSKSSPTSPTSCTPPPRP PVLEEWTSAAKPKLDQALVVEHIEKMVESVFRNF DVDGDGHISQEEFQIIRGNFPYLSAFGDLDQNQD GCISREEMVSYFLRSSSVLGGRMGFVHNFQESN SLRPVACRHCKALILGIYKQGLKCRACGVNCHK QCKDRLSVECRRAQSVSLEGSAPSPSPMHS HHRAFSFSLPRPGRRGSRPPEIREEEVQTVEDG VFDIHL		o GenPept NP_722541. 1 (RASGRP 2 Isoforma 1)
7	MGTQRLCGRGTQGWPGSSEQHVQEATSSAGL HSGVDELGVRSEPGGRLPERSLGPAHPAPAA AGTLDLDKGCTVEELLRGCEAFDDSGKVRDPQ LVRMFLMMHPWYIPSSQLAAKLLHIYQQSRKDN SNSLQVKTCHLVRYWISAFPAEFDLNPELAEQIK ELKALLDQEGNRRHSSLIDIDSVPTYKWKRQVTQ RNPVGQKKRKMSLLFDHLEPMELAEHLTYLEYR SFCKILFQDYHSFVTHGCTVDNPVLERFISLFNSV SQWVQLMILSKPTAPQRALVITHFVHVAEKLLQL QNFNTLMAVVGGLSHSSISRLKETHSHVSPETIK LWEGLTELVATGNYGNYRRRLAACVGFREFPI GVHLKDLVALQLALPDWLDPARTRLNGAKMKQL FSILEELAMVTSLRPPVQANPDLLSLLTVSLDQY QTEDELYQLSLQREPRSKSSPTSPTSCTPPPRP PVLEEWTSAAKPKLDQALVVEHIEKMVESVFRNF DVDGDGHISQEEFQIIRGNFPYLSAFGDLDQNQD GCISREEMVSYFLRSSSVLGGRMGFVHNFQESN SLRPVACRHCKALILGIYKQGLKCRACGVNCHK QCKDRLSVECRRAQSVSLEGSAPSPSPMHS HHRAFSFSLPRPGRRGSRPPEIREEEVQTVEDG	1-671 (proteína completa)	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-2 o GenPept AAF07219.1 (RASGRP 2 Isoforma 2)

	VFDIHL		
5	8	MAGTLDLDKGCTVEELLRGCEAFDDSGKVRDP QLVRMFLMMHPWYIPSSQLAAKLLHIYQQSRKD NSNSLQVKTCHLVRYWISAFPAEFDLNPELAEQI KELKALLDQEGNRRHSSLIDIDSVCVGAEHRGLG GHSVSYTICA	1-144 (proteína completa) UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-3 (RASGRRP 2 Isoforma 3)
10	9	MAGTLDLDKGCTVEELLRGCEAFDDSGKVRDP QLVRMFLMMHPWYIPSSQLAAKLLHIYQQSRKD NSNSLQVKTCHLVRYWISAFPAEFDLNPELAEQI KELKALLDQEGNRRHSSLIDIDSVPTYKWKRQVT QRNPVGQKKRKMSLLFDHLEPMELAEHLTYLEY RSFCKILFQDYHSFVTHGCTVDNPVLERFISLFN SVSQWVQLMILSKPTAPQRALVITHFVHVAEKLL QLQNFNTLMAVVGGLSHSSISRLKETHSHVSPET IKLWEGLTELVTATGNYGNYRRRLAACVGFRFPI LGVHLKDLVALQLALPDWLDPARTRLNGAKMKQ LFSILEELAMVTSLRPPVQANPDLLSLLTVSLDQY QTEDELYQLSLQREPRSKSSPTSPTSCTPPPRP PVLEEWTSAAKPKLDQALVVEHIEKMVESVFRNF DVDGDGHISQEEFQIIRGNFPYLSAFGDLDQNQD GCISREEMVSYFLRSSSVLGGRMGFVHNFQESN SLRPVACRHCKALILGIYKQGLKCRACGVNCHK QCKDRLSVECRRRRAQSVSLEGSAPSPSPMHS HHRAFSFSLPRPGRRGSRPPAEIREEEVQTVED GVFDIHL	1-610 (proteína completa) UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-4 o GenPept XP_0115430 22.1 (RASGRRP 2 Isoforma 4)
30	10	MGE PQGSMRILVTGG	1-15 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
35	11	VVADGAGLPGEDWVF	26-40 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)

5

10

15

20

25

30

35

12	TAQTRALFEKVQPTH	51-65	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
13	LFRNIKYNLDFWRKN	76-90	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
14	VHMNDNVLHSAFEVG	91-105	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
15	DNVLHSAFEV	95-104	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
16	NVLHSAFEVG	96-105	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
17	NVLHSAFEVGARKVV	96-110	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
18	VLHSAFEVGA	97-106	GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
19	KTTYPIDETMIHNGP	121-135	GenBank

			AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
5	20	IHNGPPHNSNFGYSY	131-145 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
10	21	PHNSNFGYSYAKRMI	136-150 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
15	22	AYFQQYGCTFTA VIP	156-170 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
20	23	YGCTFTAVIPTNVFG	161-175 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
25	24	LFIWVLREYNEVEPI	226-240 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
30	25	LREYNEVEPIILSVG	231-245 GenBank AAH93061.1 (GDP L- fucosa sintasa)
35	26	EVEPIILSVGEEDEV	236-250 GenBank AAH93061.1

			(GDP L-fucosa sintasa)
5	27	ILSVGEEDEVSIKEA	241-255 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
10	28	EEDEVSIKEAAEAVV	246-260 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
15	29	SIKEAAEAVVEAMDF	251-265 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
20	30	AEAVVEAMDFHGEVT	256-270 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
25	31	FDTTKSDGQFKKTAS	271-285 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
30	32	FRFTPFKQAVKETCA	296-310 GenBank AAH93061.1 (GDP L-fucosa sintasa)
35	33	LVRYWISAFP	131-140 GenBank AAI10307.1 (RASGRP2)

5			o 78-87	o UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 (RASGRP2 Isoforma 1)
	34	FVRYWITEFW	128-137	GenBank AAC97349.1 (RASGRP1)
10	35	FMRYWILKFP	77-86	GenBank BAA74869.3 (RASGRP3)
15	36	LLFDHLEPMELAEHLTYLEYRSF	148-170	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 (RASGRP2 Isoforma 1)
20	37	NFNTLMAVVGGLSHSSISRLKETHSHVS	239-266	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 (RASGRP2 Isoforma 1)
25	38	PAAMAGTLDLDKGCT	1-12 y los aminoácid os adicionales en PAA el extremo N- terminal	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
30				
35	39	DKGCTVEELLRGCI	8-22	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o

5			GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10	40	RGCIEAFDDSGKVRD	18-32 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
15	41	GKVRDPQLVRMFLMM	28-42 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
20	42	MFLMMHPWYIPSSQL	38-52 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
25			
30			
35			

5

10

15

20

25

30

35

43	PSSQLAAKLLHIYQQ	48-62	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
44	HIYQQSRKDNSNSLQ	58-72	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
45	SNSLQVKTCHLVRYW	68-82	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
46	LVRYWISAFPAEFDL	78-92	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541.

				1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
5	47	AEFDLNPELAEQIKE	88-102	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10				
15	48	EQIKELKALLDQEGN	98-112	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
20				
25	49	DQEGNRRHSSLIDID	108-122	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
30				
35	50	LIDIDSVPTYKWKQRQ	118-132	UniProtKB/ Swiss-Prot

5			Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10	51	KWKRQVTQRNPVGQK	128-142 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
15			
20	52	PVGQKKRKMSLLFDH	138-152 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
25			
30	53	LLFDHLEPMELAEHL	148-162 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP
35			

5

10

15

20

25

30

35

			2 Isoforma 1)
54	LAEHLTYLEYRSFCK	158-172	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
55	RSFCKILFQDYHSFV	168-182	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
56	YHSFVTHGCTVDNPV	178-192	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
57	VDNPVLERFISLFNS	188-202	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o

5

10

15

20

25

30

35

			GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
58	SLFNSVSQWVQLMIL	198-212	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
59	QLMILSKPTAPQRAL	208-222	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
60	PQRALVITHFVHVAE	218-232	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)

5

10

15

20

25

30

35

61	VHVAEKLLQLQNFNT	228-242	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
62	QNFNTLMAVVGGLSH	238-252	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
63	GGLSHSSISRLKETH	248-262	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
64	LKETHSHVSPETIKL	258-272	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541.

				1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
5	65	ETIKLWEGLTELVTA	268-282	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10				
15	66	ELVTATGNYGNYRRR	278-292	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
20				
25	67	NYRRRLAACVGFRFP	288-302	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
30				
35	68	GFRFPILGVHLKDLV	298-312	UniProtKB/ Swiss-Prot

5			Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10	69	LKDLVALQLALPDWL	308-322 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
15			
20	70	LPDWLDPARTRLNGA	318-332 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
25			
30	71	RLNGAKMKQLFSILE	328-342 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP
35			

5

10

15

20

25

30

35

			2 Isoforma 1)
72	FSILEELAMVTSLRP	338-352	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
73	TSLRPPVQANPDLLS	348-362	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
74	PDLLSLLTVSLDQYQ	358-372	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
75	LDQYQTEDELYQLSL	368-382	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o

5

10

15

20

25

30

35

			GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
76	YQLSLQREPRSKSSP	378-392	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
77	SKSSPTSPTSCTPPP	388-402	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
78	CTPPRPPVLEEWS	398-412	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)

5

10

15

20

25

30

35

79	EEWTSAAKPKLDQAL	408-422	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
80	LDQALVVEHIEKMVE	418-432	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
81	EKMVESVFRNFDVDG	428-442	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
82	FDVDGDGHISQEEFQ	438-452	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541.

				1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
5	83	QEEFQIIRGNFPYLS	448-462	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10				
15	84	FPYLSAFGDLDQNQD	458-472	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
20				
25	85	DQNQDGCISREEMVS	468-482	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
30				
35	86	EEMVSYFLRSSSVLG	478-492	UniProtKB/ Swiss-Prot

5			Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
10	87	SSVLGGRMGFVHNFQ	488-502 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
15			
20	88	VHNFQESNSLRPVAC	498-512 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
25			
30	89	RPVACRHCKALILGI	508-522 UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP
35			

5

10

15

20

25

30

35

			2 Isoforma 1)
90	LILGIYKQGLKCRAC	518-532	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
91	KCRACGVNCHKQCKD	528-542	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
92	KQCKDRLSVECRRRA	538-552	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
93	CRRRAQSVSLEGSAP	548-562	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o

5

10

15

20

25

30

35

			GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
94	EGSAPSPSPMHSHHH	558-572	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
95	HSHHHRAFSFSLPRP	568-582	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)
96	SLPRPGRRGSRPPEI	578-592	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRRP 2 Isoforma 1)

5	97	RPPEIREEEVQTVED	588-602	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRP 2 Isoforma 1)
10				
15	98	EEVQTVEDGVFDIHL	595-609	UniProtKB/ Swiss-Prot Q7LDG7-1 o GenPept NP_722541. 1 (RASGRP 2 Isoforma 1)
20				

Las siguientes secuencias de genes (Tabla 2) representan las secuencias de genes de la proteínas GDP-L fucosa sintasa (gen: TSTA3), RASGRP1, RASGRP2, RASGRP3 y RASGRP4 (Tabla 2). Las proteínas o derivados o variante de empalme de las mismas se codifican de manera preferente por el gen respectivo.

Tabla 2: Secuencias de genes y entrada de datos

	Nombre de genes	Entrada de la base de datos
30	TSTA3	Secuencia de referencia NCBI: NC_000008.11 REGIÓN: 143612618..143618048
	RASGRP1	Secuencia de referencia NCBI: NC_000015.10 REGIÓN: 38488101..38565575
35	RASGRP2	Secuencia de referencia NCBI: NC_000011.10 REGIÓN: 64726911..64745456

RASGRP3	Secuencia de referencia NCBI: NC_000002.12 REGIÓN: 33436324..33564750
RASGRP4	Secuencia de referencia NCBI: NC_000019.10 REGIÓN: 38409051..38426305

5

Las siguientes secuencias de nucleótidos (Tabla 3) representan secuencias de nucleótidos preferidas que codifican cualquiera de las proteínas o fragmentos, derivados o variantes de empalme de las mismas de la presente invención. La tabla también comprende secuencias de codificación (CDS), es decir proteinasa o péptidos, que también se pueden utilizar en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de esclerosis múltiple (MS).

10

Tabla 3: Secuencias de nucleótidos y secuencias de proteínas y las estradas de base de datos respectivas (Nos. de Acceso de Genbank)

15

Nombre del gen	Entrada de la base de datos
TSTA3	ARN: XM_011517269.1 NM_003313.3 NM_001317783.1 XM_005251051.3 proteína: XP_011515571.1 NP_003304.1 NP_001304712.1 XP_005251108.2
RASGRP1	ARN: NM_001306086.1 NM_001128602.1 NM_005739.3 XM_017021860 XM_005254114.3 XM_011521151.3 XR_001751485.2 XR_001751486.2 proteína: NP_001293015.1

20

25

30

35

5		NP_001122074.1 NP_005730.2 XP_016877349.1 XP_005254171.1 XP_011519453.1
10	RASGRP2	ARN: XM_011544722.2 NM_153819 XM_011544723.3 XM_011544721.1 NM_001098670.1 XM_017017084.2 XM_011544720.2 XM_011544718.2 15 XM_017017082.2 XM_005273707.4 XM_017017083.2 NM_001318398.1 NM_001098671.1 20 XM_011544725.2 XM_017017085.2 XM_017017086.1 XR_001747720.2 XR_001747719.2 25 proteína: XP_011543024.1 NP_722541.1 XP_011543025.1 XP_011543023.1 30 NP_001092140.1 XP_016872573.1 XP_011543022.1 XP_011543020.1 XP_016872571.1 35 XP_005273764.3 XP_016872572.1

5		NP_001305327.1 NP_001092141.1 XP_011543027.1 XP_016872574.1 XP_016872575.1
10	RASGRP3	ARN: NM_001349975.1 NM_170672.2 NM_001349978.1 XM_017003759.2 XM_011532746.3 XM_011532748.3 NM_001349979.1 NM_001349977.1 15 NM_001349980.1 NM_001139488.1 NM_001349981.1 NM_001349976.1 XM_017003761.2 20 NM_015376.2 XR_001738693.2 XR_001738692.2 XR_001738691.2 NR_146505.1 25 proteína: NP_001336904.1 NP_733772.1 NP_001336907.1 XP_016859248.1 30 XP_011531048.1 XP_011531050.2 NP_001336908.1 NP_001336906.1 NP_001336909.1 35 NP_001132960 NP_001336910.1

	NP_001336905.1 XP_016859250.1 NP_056191.1
5	RASGRP4
10	ARN: NM_001146202.1 NM_001146206.1 NM_001146207.1 NM_001146205.1 NM_001146203.1 NM_001146204.1 NM_170604.2 XR_935732.2 proteína: NP_001139674.1 NP_001139678.1 NP_001139679.1 NP_001139677.1 NP_001139675.1 NP_001139676.1 NP_733749.1
20	

Todas las secuencias se recuperaron de las bases de datos en línea respectivas el 22 de Junio de 2018.

En una modalidad, la proteína, fragmento, derivativo o variante de empalme de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para identificar un sujeto humano quien es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígenos en MS, de manera preferente MS temprana. La identificación de un sujeto humano, quien es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígenos en MS, de manera preferente MS temprana, comprende de manera preferente medir la reactividad positiva de las células T y/o anticuerpos a los autoantígenos en el sujeto humano. De esta manera, el sujeto humano también puede ser diagnosticado *in vitro* con MS. En otras palabras, los autoantígenos identificados también se pueden utilizar en el diagnóstico *in vitro* de MS.

El diagnóstico *in vitro* de MS comprende de manera preferente los siguientes pasos: aislar células T, de manera preferente células T CD4+, y/o anticuerpos de la sangre, CSF u otro fluido corporal del sujeto y medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra un proteína o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma de acuerdo con la

presente invención. La persona experta en la técnica está consciente de los métodos para aislar células T y/o anticuerpos de la sangre, CSF u otro fluido corporal del sujeto y medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra la proteína, fragmento, derivado o variante de empalme. Una reactividad de las células T, de manera preferente células T CD4+, y/o anticuerpos a la proteína probada o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma, puede indicar que el sujeto padece de MS. El diagnóstico también se puede combinar con descubrimientos clínicos y de formación de imágenes, es decir el diagnóstico MS de acuerdo con el estado de la técnica, en particular de acuerdo con los criterios McDonald revisados.

En otra modalidad, una proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para distinguir entre los subgrupos MS. En particular, la proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para diagnosticar MS de patrón II en un sujeto humano.

Las siguientes características indican que un cierto péptido de una proteína es inmunodominante en el contexto de MS:

a) reconocimiento frecuente de este péptido por células T, es decir por aproximadamente 10% o más de pacientes con MS, frecuentemente en el contexto de un alelo HLA o haplotipo asociado a enfermedad (Sospedra y Martin, 2005), y

b) reconocimiento de este péptido por células T relevantes de enfermedad tal como aquellas que responden a los péptidos en bajas concentraciones (células T de alta avidéz) (Bielekova y colaboradores, 2004) y por lo tanto se consideran particularmente peligrosas y/o tienen un fenotipo pro-inflamatorio, y/o se aíslan del órgano o compartimiento objetivo (CNS), en el caso de células T infiltrantes de MS, cerebro, médula espinal o CSF.

Sin embargo, el reconocimiento de alta avidéz no es un pre-requisito, puesto que las células T específicas de mielina de baja avidéz también han mostrado que son patogénicas en los modelos de ratón transgénicos humanizados (Quandt y colaboradores 2012).

De esta manera, se puede probar si una proteína o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma es inmunodominante en el contexto de MS. Esta prueba es de manera preferente una prueba *in vitro*. Particularmente adecuada es una prueba *in vitro* que permite la medición de la reactividad de las células T y/o anticuerpos obtenidos de la sangre, CSF y otro fluido corporal de un sujeto humano que ha sido diagnosticado con MS, de manera preferente células T CD4+ infiltrantes de CSF, la proteína o fragmento probado, derivado o variante de empalme. La persona experta en la técnica está consciente de los métodos para probar la reactividad de las células T, de manera preferente célula T CD4+, y/o anticuerpos. Por ejemplo, la proliferación de células T CD4+ y/o su secreción de IFN- γ o reactividad en un ensayo ELISPOT/FLUOROSPOT o reactividad contra tetrámeros de HLA-péptido se pueden probar. Si la proteína de prueba o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma induce reactividad en un sujeto humano quien ha sido diagnosticado con MS, en caso de la

reactividad de células T en particular un índice estimulador (SI) arriba de 2 y/o una secreción de IFN- γ arriba de 20 pg/mL, la proteína de prueba o fragmento, derivado o variante de empalme se puede llamar inmunodominante. También es posible seleccionar 10 pacientes quienes han sido diagnosticados con MS para tal prueba. Si la reactividad se induce en al menos 2 pacientes, la proteína probada o fragmento, derivado o variante de empalme se puede llamar inmunodominante. De manera preferente, los 10 pacientes han sido diagnosticados con RRMS de acuerdo con los criterios McDonald revisados establecidos.

Se ha mostrado recientemente que las células T de los pacientes con MS muestran proliferación *in vitro* incrementada en la ausencia de un antígeno exógeno (Mohme y colaboradores, 2013; Jelcic y colaboradores, 2018). Estas células T “autoproliferantes” se enriquecen para células que se alojan al compartimento CNS de los pacientes con MS y de esta manera se pueden considerar como una fuente de sangre periférica de las células T infiltrantes de cerebro/CSF.

En el caso que los datos de las células T de prueba *in vitro* no sean estén disponibles o además de estas pruebas, el reconocimiento inmunitario de los péptidos también se puede predecir/inferir de esos péptidos que se unirán bien a los alelos HLA-clase I o -clase II de individuo y para las células T CD8+ y CD4+ respectivamente. Son bien conocidas las predicciones de unión a péptido por la persona experta. Se pueden llevar a cabo por algoritmos de predicción bien establecidos (NetMHCII - www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/; IEDB - www.iedb.org/) y el análisis de los motivos de unión a HLA (SYFPEITHI - www.syfpeithi.de/), véase “Ejemplos”, bajo 11.

De acuerdo con la presente invención las proteinasa GDP-L-fucosa sintasa y un miembro de la familia de proteínas RASGRP, en particular RASGRP2, se han identificado como inmunodominantes en MS, de esta manera se han identificado como autoantígenos.

No es necesario que la unión al alelo HLA sea particularmente potente, de hecho, la inmunodominancia también puede presentarse para péptidos que se unen deficientemente al alelo HLA (Muraro y colaboradores, 1997, J Clin Invest; 100(2):339-349).

La inducción de tolerancia es específica de antígeno y vuelve las células T autoreactivas no funcionales o anérgicas o induce células Treg que suprimen específicamente la autoinmunidad indeseada a los antígenos objetivo. La inducción de la tolerancia a los autoantígenos objetivo es un objetivo terapéutico altamente importante en las enfermedades autoinmunitarias. Ofrece la oportunidad de atenuar específicamente la respuesta autoinmunitaria patogénica en una forma eficaz con pocos efectos secundarios. La inducción de tolerancia también se puede lograr al aplicar una proteína entera en lugar de o además de un péptido inmunodominante que es un fragmento de la proteína (Kennedy MK y colaboradores, 1990). Es ha mostrado en la presente que los cambios inmunológicos consistentes con la tolerancia se pueden inducir en los pacientes humanos en inyección i.v. de

péptidos inmunodominantes, acoplados a los glóbulos rojos (14. de los Ejemplos). Por consiguiente, los péptidos inmunodominantes se pueden utilizar par inducción de tolerancia.

La inmunodominancia de las proteínas y/o fragmentos permite de esta manera utilizar la proteína y/o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma para inmunoterapias específicas de antígeno al como inducción de tolerancia.

De acuerdo con la presente invención, la inducción de tolerancia inmunitaria específica de antígeno se puede utilizar en toda las formas de MS: En el momento de la primera manifestación, cuando se han excluido diagnósticos diferenciales, la enfermedad es referida como CIS con la condición de que los descubrimientos CSF y MRI sean consistentes con el diagnóstico. La MRI describe lesiones en sitios típicos para MS, es decir yuxtacorticales, periventriculares, en el tronco cerebral o médula espinal. Si se cumplen ciertos criterios que se pueden resumir como diseminación en el espacio (más de una lesión o síntomas clínicos/signos) y tiempo (más de un evento) entonces se puede hacer el diagnóstico de RRMS. Un escenario especial es el descubrimiento accidental de las lesiones por MRI compatibles con MS sin síntomas clínicos. Esto es referido como RIS y se puede considerar una pre-etapa de CIS y RRMS. Más de 80% de los pacientes padecen de uno de estos, y la mayoría de pacientes desarrollan después lo que es llamado SPMS. En este tiempo, las recaídas/exacerbaciones se vuelven menos frecuentes o se detienen conjuntamente y la discapacidad neurológica se incrementa permanentemente ya sea entre recaídas o sin estas.

Una forma especial de MS es PPMS, que nunca muestra recaídas, sino más bien comienza con un empeoramiento permanente de los síntomas neurológicos, por ejemplo, la capacidad de caminar. PPMS afecta aproximadamente 10% de pacientes con MS y masculinos y femeninos con una frecuencia igual. Su inicio es usualmente más tarde que CIS o RRMS. Con respecto a las causas y mecanismos de la enfermedad la PPMS se considera similar a la RIS-CIS-RRMS-SPMS anterior.

Típicamente, la MS es diagnosticada de acuerdo con los criterios de McDonald revisados. Estos criterios también muestra distinción entre las diferentes formas y actividad de la enfermedad de MS (Thompson y colaboradores, 2018, Lancet Neurol, 17(2):162-173).

De manera preferente, el procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria se aplica en una etapa temprana, es decir, RIS, CIS y RRMS temprana, puesto que se asume que los procesos inmunitarios en esta etapa son mediados principalmente por linfocitos T autoreactivos, mientras que el daño al tejido, los así llamados cambios degenerativos, se vuelven gradualmente más importantes cuando la enfermedad avanza. Sin embargo, la inducción de tolerancia inmunitaria es significativa siempre y cuando exista una respuesta de células T autoreactivas contra los antígenos utilizados para la inducción de tolerancia inmunitaria, que también podría ser durante SPMS y PPMS.

En una modalidad particularmente preferida, la GDP-L-fucosa sintasa o proteína

RASGRP2 o variante de empalme de la misma, de manera preferente la GDP-L-fucosa sintasa o proteína RASGRP2, se utiliza en un procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria en cualquier etapa, es decir, RIS, CIS y RRMS temprana. La proteína GDP-L-fucosa sintasa tiene, por ejemplo, la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1, la proteína RASGRP2 tiene, por ejemplo, la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para inducir tolerancia específica de antígeno a autoantígenos en un sujeto humano que padece de o está en riesgo de desarrollar MS. El método comprende el paso de aplicar a un paciente en necesidad del mismo, es decir, al sujeto humano, al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste de GDP-L-fucosa sintasa y miembros de la familia de proteínas RASGRP, fragmento (péptido), derivado y/o variante de empalme de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas o fragmento, derivado o variante de empalme de las mismas y/o una secuencia de genes como se describe en la presente o aplicar al menos un portador que comprende al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes como se describe en la presente.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos o secuencia de genes se aplica al paciente a través de un portador, por ejemplo, una célula. El antígeno luego se puede expresar por un portador, por ejemplo, una célula. La transferencia de ARN/ADN que codifica autoantígeno en un portador, por ejemplo, una célula, y que codifica de esta manera los autoantígenos anteriores también es concebible similar a los procedimientos de vacunación tumoral que emplean ARNs que codifican antígenos.

Es particularmente preferido utilizar la proteína entera de GDP-L-fucosa sintasa (SEQ ID NO: 1) o la proteína entera de RASGRP2 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6, 7, 8 o 9) para inducir tolerancia específica de antígeno. En otra modalidad preferida, se utiliza un fragmento de cualquiera de estas proteínas. Es particularmente preferido utilizar un fragmento como se expone en cualquiera de SEQ ID NOs: 10 a 98. Aún más preferido es un péptido como se expone en cualquiera de SEQ ID NOs: 10 a 35.

La al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes se puede aplicar por administración nasal, inhalada, oral, subcutánea (s.c.), intracoelómica (i.c.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.), transdérmica (t.d.) o intravenosa (i.v.), de manera preferente por vías de administración que se consideran inductoras de tolerancia inmunitaria, por ejemplo por i.v., s.c., i.d., t.d., oral, inhalada, nasal o acoplada al portador inductor de tolerancia inmunitaria, de manera preferente un RBC.

En particular, el método se puede utilizar para inducir tolerancia específica de antígeno a autoantígenos en MS temprana o aún en etapas preclínicas de la enfermedad.

El protocolo de tolerancia específico de antígeno proporcionado en la presente puede

fijar como objetivo selectivamente tanto células T autoreactivas activadas como sin tratamiento previo específicas para múltiples epítomos encefalitogénicos potenciales que perpetúan la enfermedad.

5 El procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria también se puede utilizar para prevenir la MS. Este procedimiento puede incluir identificar aquellos individuos (por ejemplo, en una familia con un paciente con MS) quienes están en alto riesgo de desarrollar MS. Por ejemplo, es posible tolerar por ejemplo, los niños de una madre con MS o los gemelos idénticos de un paciente con MS, en quien el riesgo de desarrollar MS podría ser particularmente alto.

10 El diagnóstico de MS o una de sus formas se hace al mostrar déficits neurológicos y/o lesiones por MRI compatibles con MS que se diseminan en el espacio y tiempo. La prueba de laboratorio positiva para una respuesta autoinmunitaria contra las proteínas objetivas novedosas GDP-L-fucosa sintasa y la familia RASGRP y/o fragmentos, derivados y/o
15 variantes de empalme de las mismas se pueden utilizar para identificar pacientes de manera particular probablemente para beneficiarse de la inducción de tolerancia específica de antígeno, es decir, permitir personalizar a procedimientos de tolerancia específicos de antígeno. Al identificar pacientes quienes probablemente de manera particular se benefician de la inducción de tolerancia específica de antígeno, un paciente se puede diagnosticar *in vitro* con MS. En otras palabras, los autoantígenos identificados GDP-L-fucosa sintasa y la familia
20 RASGRP (en particular RASGRP2) y/o fragmentos y/o derivados y/o variantes de empalme de las mismas se pueden utilizar en el diagnóstico *in vitro* de MS. De esta manera, esta prueba *in vitro* se puede complementar con descubrimientos de formas clínicas y de formación de imágenes, es decir, el diagnóstico MS de acuerdo con el estado de la técnica, en particular de acuerdo con los criterios McDonald revisados.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un sujeto humano adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígenos en MS, de manera preferente MS temprana. De esta manera, se identifica un paciente individual, quien se beneficiaría de o es elegible para el tratamiento. Este método también se puede utilizar para diagnosticar *in vitro* MS. Los pacientes con CIS, probablemente también RIS, y RRMS
30 están mejor adecuados para la inducción de tolerancia inmunitaria, aunque la inducción de tolerancia inmunitaria parece significativa en cualquier forma de MS, incluidas SPMS y PPMS, siempre y cuando el paciente responda al menos uno de los péptidos antigénicos que se incluyen en el tratamiento de inducción de tolerancia inmunitaria. Los pasos de este método comprenden aislar células T, de manera preferente células T CD4+, y/o anticuerpos de la
35 sangre, CSF u otro fluido corporal del sujeto y medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra la proteína o fragmento, derivado o variante de empalme de la misma de acuerdo con la presente invención. La persona experta en la técnica está consciente de los

métodos para aislar células T y/o anticuerpos de sangre, CSF u otro fluido corporal del sujeto y medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra la proteína, fragmento, derivado o variante de empalme.

Si un individuo tiene una respuesta contra una de las proteínas o fragmentos, podría de esta manera ser diagnosticado *in vitro* con MS y sería elegible y un buen candidato para el tratamiento. Un paso de selección adicional podría ser tipificación de HLA-clase II y presencia de los alelos HLA-DR asociados a MS.

Las proteínas, en particular la proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia RASGRP, en particular RASGRP2, o fragmentos, derivados o variantes de empalme de las mismas derivadas de los antígenos relevantes de enfermedad de esta manera se pueden utilizar para identificar aquellos pacientes o subgrupos de pacientes con una respuesta de células T de anticuerpos pro-inflamatorios existentes y/o particularmente potentes (potencialmente perjudiciales) contra el autoantígeno respectivo. Al identificar esos pacientes o subgrupos de pacientes con una respuesta de células T o anticuerpos pro-inflamatorios existentes y/o particularmente potentes (potencialmente perjudiciales) contra el autoantígeno respectivo, el paciente de esta manera puede ser diagnosticado *in vitro* con MS. En esta situación, la pre-prueba del paciente con una prueba adecuada para evaluar la reactividad contra el autoantígeno también sería para adaptar el tratamiento de inducción de tolerancia inmunitaria (por ejemplo, composición de los péptidos/proteínas utilizados para inducción de tolerancia inmunitaria) al paciente individual o subgrupo de pacientes con el objetivo de volver la inducción de tolerancia inmunitaria tan específica como sea posible y también para evitar efectos adversos potenciales. La inducción de tolerancia inmunitaria específica de antígeno, sin embargo, también se puede llevar a cabo en pacientes en quienes una respuesta de células T al agente de inducción de tolerancia inmunitaria no se ha mostrado. De esta manera, en una modalidad, la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con la invención se puede utilizar en la pre-prueba *in vitro* de un sujeto humano diagnosticado con MS o un sujeto humano en riesgo de desarrollar MS.

En un aspecto de la invención, se proporciona un portador, que comprende al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o una secuencia de genes como se describe en la presente. El portador se puede acoplar a al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme y/o el portador puede contener la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes. En una modalidad, el término “contiene” significa que la proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes está dentro del portador y no sobre su superficie. Una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme también se puede acoplar a y está contenida dentro del portador, lo que significa que una parte de la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme se

acopla al portador y a otra parte de la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme está contenido dentro del portador.

La persona experta en la técnica está familiarizada con posibles portadores. Por ejemplo, el portador puede ser cualquier célula, proteína, lípido, glicolípido, gránulo, nanopartícula, partícula similar a virus (VLP), o molécula, tal como una molécula de azúcar, o cualquier combinación de los mismos que sea adecuado para aplicación en humanos y a cuyas proteínas y/o fragmentos se pueden acoplar por un proceso de acoplamiento, por ejemplo, por un proceso de acoplamiento químico, de manera preferente por EDC. El portador se puede derivar de uno existente en la naturaleza o ser sintético. De manera preferente, la célula, molécula, gránulo, nanopartícula, o VLP es biodegradable *in vivo* o es al menos aplicable a personas vivas y se descompone *in vivo* o se elimina del cuerpo al cual se aplica el portador. El término célula también incluye precursores celulares, por ejemplo, precursores RBC. De manera preferente, el portador es una célula sanguínea, aún de manera más preferente un glóbulo rojo o glóbulo blanco. El glóbulo blanco puede ser un esplenocito o un PBMC o generalmente un APC.

En una modalidad, la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme se expresa por la célula, de manera preferente la célula sanguínea. De esta manera, la información genética que codifica la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme se introduce en la célula antes de que la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme se expresen por la célula.

Se puede utilizar cualquier agente de acoplamiento o método para acoplar una proteína y/o un fragmento de la misma a un portador. Por ejemplo, un ligador sintético o natural se puede emplear para acoplamiento. Un ejemplo de este ligador es glicoforina A, presente en la superficie de RBC. En una modalidad, se lleva a cabo la reticulación química. En una modalidad preferida, se utiliza el reticulador químico EDC que cataliza la formación de las uniones de péptido entre los grupos amino y carboxilo libres. Particularmente en presencia de EDC, se pueden acoplar múltiples péptidos a la superficie del portador permitiendo de esta manera la orientación simultánea de múltiples especificidades de células T. De manera preferente, más de tres, más de cinco, más de 10, más de 15, o aún más de 20 péptidos diferentes se acoplan a la superficie del portador. En una modalidad preferida, se utilizan entre cinco y 20, de manera preferente entre cinco y 15 péptidos diferentes. Un péptido es diferente de otro péptido si no consiste de la misma secuencia de aminoácidos. El portador es de manera preferente, pero no necesariamente una célula. El EDC se puede utilizar para acoplarse a cualquier portador siempre y cuando esté presente un grupo amino libre.

En otra modalidad, al menos un péptido de cada proteína de acuerdo con la presente invención (una proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, de manera preferente RASGRP2) se utiliza en combinación y acopla con un

portador. Es particularmente ventajoso combinar al menos un péptido de cada proteína de acuerdo con la presente invención con al menos un péptido conocido del estado de la técnica, en particular con al menos un péptido de mielina, en particular con al menos uno o todos los péptidos de mielina como se define por SEQ ID NOs: 261 a 267.

5 En una modalidad preferida, el portador es una célula sanguínea, y la célula sanguínea se acopla químicamente por un agente de acoplamiento, de manera preferente por EDC, a la al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme. También se proporciona un método para fabricar esta célula sanguínea químicamente acoplada, es decir, acoplada a
10 una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme, es decir, el antígeno, y agregar subsecuentemente el agente de acoplamiento, de manera preferente EDC.

El mecanismo de acción de las células acopladas con el péptido por EDC no se entiende completamente, pero implica la ligación covalente de grupos amino y carboxi de péptidos y moléculas de superficie celular, muerte celular programada subsecuente (apoptosis
15 en el caso de células nucleadas; eriptosis en el caso de RBC) de las células acopladas a péptido, es decir, acopladas a antígeno, y luego la presentación tolerogénica de las células moribundas in vivo.

La dosis de EDC utilizada para la reacción de acoplamiento se puede titular para obtener un máximo de seguridad con mejor eficacia. En altas concentraciones, EDC puede
20 conducir a la lisis de células, en particular de RBC. Para estabilidad óptima de la RBC, se puede utilizar una concentración final de EDC de menor que 15 mg/mL, de manera preferente menor que 10 mg/mL, aún de manera más preferente menor que 5 mg/mL, aún de manera más preferente de aproximadamente 3 mg/mL. La dosis óptima también puede variar. La persona experta en la técnica sabe cómo determinar la estabilidad óptima de la RBC y la dosis
25 óptima de EDC.

La proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme que se acoplar se puede agregar en una cantidad que se determina fácilmente por la persona experta en la técnica. La persona experta está consciente de las medidas para determinar la cantidad óptima en la interacción con una cantidad óptima de EDC.

30 El tiempo de incubación se puede variar y personalizar para cada reacción de acoplamiento específica (por ejemplo, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min). La eficacia de acoplamiento puede ser mejor con un tiempo de incubación más prolongado. En una modalidad, un máximo se alcanza después de 60 min.

La temperatura de incubación también puede variar. Por ejemplo, se puede utilizar 15-
35 25°C o 2-8°C. En una modalidad, la eficiencia de acoplamiento fue más alta cuando se llevó a cabo la reacción de acoplamiento a 15-25°C.

Cualquier excipiente que permita la reacción de acoplamiento se puede utilizar. En una

modalidad, el excipiente es estéril y libre de endotoxinas. En una modalidad preferida, el excipiente es solución salina sin endotoxinas, estéril (NaCl 0,9%). La solución salina es aprobada para el uso en humanos y proporciona un máximo de seguridad.

La persona experta en la técnica sabe cómo determinar un tiempo de incubación óptimo y temperatura y cómo determinar los posibles excipientes.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes como se describe en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento terapéutico, la prevención o diagnóstico de MS en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes como se describe en la presente y/o el portador como se describe en la presente. De esta manera, el portador comprende la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes de acuerdo con la presente invención, en particular el portador acoplado a la al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con la invención, y/o el portador que contiene al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes de acuerdo con la invención se puede utilizar en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de MS.

En un aspecto adicional de la invención, un péptido de acuerdo con la presente invención, de manera preferente un péptido, que comprende 5 a 50, de manera preferente 5 a 20, de manera más preferente 10 a 15, aún de manera más preferente 15 aminoácidos, se utiliza como un medicamento.

Un péptido preferido para el uso como un medicamento es

- a) al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o
- b) al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homólogo a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o
- c) al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, aún de manera más preferente al menos 90% homólogo a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva y se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos respectiva.

Aún más preferido para uso como un medicamento es un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 10 a 98, de manera preferente SEQ ID

NOs: 10 a 35, aún de manera más preferente un péptido que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 10 a 98, de manera preferente SEQ ID NOs: 10 a 35.

Como un aspecto adicional, los motivos de péptido de la FIGURA 3D-3F (II) E (SEQ ID NO: 99), los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa como es representado en la FIGURA 5 (SEQ ID NOs: 199-215), los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa de la tabla en la FIGURA 6 (I y II) (SEQ ID NOs: 10-14, 19-20, 22-23, 25-32 y 216-290) y los péptidos RASGRP1, RASGRP2 y RASGRP3 de la tabla de la FIGURA 12 (SEQ ID NOs: 291-309) todos son el contenido de la presente invención y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLOS

Especificidad de GDP-L-Fucosa Sintasa

1. Caracterización de TCC21.1

El procedimiento de identificación de antígenos objetivo no sesgados utilizando las genotecas de combinación sintéticas de exploración posicional (ps-SCL) se muestra esquemáticamente en la FIGURA 2. El clon TCC21.1 se ha identificado como se describe en Planas y colaboradores (2015). TCC21.1 es una CD4+ TCC aislada de células infiltrantes CSF y opcionalmente expandidas en dos lesiones por MS desmielinizantes de materia blanca activas (LI y LIII) de un paciente con SPMS (1154SA) con desmielinación de patrón II. TCC21.1 libera citoquinas Th2 y ayuda a la proliferación y producción de anticuerpos por las células B autólogas en la activación no específica. A fin de estudiar los péptidos reconocidos por este TCC de especificidad desconocida utilizando una genoteca de exploración posicional deca péptido, en la primera molécula HLA clase II utilizada por TCC21.1 para reconocer la mezcla de péptidos se identificó. Esto es un pre-requisito para utilizar el procedimiento de genoteca de péptidos/análisis biométrico para la identificación no sesgada de antígenos objetivo (Zhao y colaboradores, 2001, J Immunol, 167:2130-2141; Sospedra y colaboradores, 2010, J Immunol Methods, 353(1-2):93-101). Puesto que los pacientes 1154SA fueron homocigotos para el haplotipo DR15, TCC21.1 se probó inicialmente con las mezclas con los aminoácidos (AAs) definidos en la posición 5, presentados por células de línea de células B (BCL) del síndrome de linfocitos desnudos inmortalizados por EBV (BLS) transfectadas con moléculas HLA DR/DQ autólogas individuales diferentes (DRA*01:01/DRB5*01:01 = DR2a, DRA*01:01/DRB1*15:01 = DR2b y DQA1*01:02/DQB1*06:02). Como la lectura de la activación de células T, se utilizó la producción GM-CSF, puesto que TCC21.1 libera la citoquina después de la estimulación no específica con anti-CD3 y PMA (Planas y colaboradores, 2015). Solo las mezclas presentadas por moléculas clase II DRB1*15:01 (DR2b) que expresan BCL fueron estimuladoras (datos no mostrados).

2. Genoteca de Combinación Sintética de Exploración Posicional Como un Método para Identificar Antígenos/Identificación de Gdp-L-Fucosa Sintasa

La TCC21.1 luego se probó con la genoteca de exploración posicional deca péptido completa (200 mezclas; es decir, mezclas que representan las 10 posiciones de 10-mer y en cada una de las posiciones fijas uno de los 20 L-aminoácidos), presentado por las moléculas clase II DRB1*15:01 que expresan BCL. La liberación de GM-CSF en respuesta a la genoteca completa se muestra en la FIGURA 3A. un patrón de respuesta similar se obtuvo con la liberación de IL-10. Después, se generó una matriz de puntuación de análisis biométrico al asignar los valores numéricos al potencial estimulador de cada uno de los 20 AAs definidos en cada una de las diez posiciones de la genoteca deca péptido como se describe previamente (Zhao y colaboradores, 2001). En este punto, los valores se calcularon como la base log 10 de la secreción de GM-CSF media (pg/mL) de tres experimentos independientes en presencia de las mezclas, menos la secreción en la ausencia de las mezclas (FIGURA 3B). Con base en un modelo de contribución independiente de AAs individuales al reconocimiento de antígeno peptídico, la puntuación estimuladora predicha de un péptido dado es la suma de los valores de matriz de cada AA contenido en el péptido en cada posición (Zhao y colaboradores, 2001). Este procedimiento de puntuación se aplicó para clasificar, de acuerdo con su puntuación estimuladora que es predictiva de su potencia estimuladora, todos los péptidos de 10-mers solapantes naturales de las secuencias de proteínas con la base de datos de las proteínas humanas UniProt. Con base en estos valores predichos, los 50 péptidos naturales humanos predichos con puntuaciones más altas se sintetizaron y se probaron en 5 µg/mL (FIGURA 4). Inesperadamente, ninguno de los péptidos fue claramente estimulador (FIGURA 3C). La capacidad predictiva del procedimiento anterior que combina la genoteca de exploración posicional y análisis biométrico fue más baja para este TCC que para los otros en los estudios previos. Las mezclas más estimuladoras como se muestra en la FIGURA 3B tienen AAs definidos idénticos en las posiciones consecutivas, sugiriendo un posible reconocimiento de un motivo AA en múltiples marcos. Para ser capaz de analizar los datos utilizando el procedimiento descrito en la FIGURA 2, se designó un conjunto de 22 mezclas definidas dobles (es decir, mezclas de exploración posicional con dos posiciones definidas) y se probaron (FIGURA 3D); los resultados confirmaron la presencia de un motivo de reconocimiento único (LHSXFEV, SEQ ID NO: 99) con diferentes residuos de flanqueo (FIGURA 3E). A fin de aplicar este motivo de reconocimiento en los dos marcos a la matriz derivada de GM-CSF original y llevar a cabo el análisis biométrico, el modelo medio armónico (HM) se utilizó para integrar las respuestas estimuladoras de algunas de las mezclas definidas dobles (FIGURA 3D, mezclas de Marco 1/2-HM) en la matriz original. Utilizando las nuevas matrices del marco 1 y marco 2 “de refuerzo armónico”, todos los péptidos de 10-mers solapantes naturales derivados de la base de datos de la proteína humana UniProt se registraron y se clasificaron como se muestra esquemáticamente en la FIGURA 2. Los 50 péptidos naturales predichos con puntuaciones más altas para ambas matrices se sintetizaron

y se probaron para la liberación de GM-CSF (FIGURA 4). Estas dos matrices permitieron la identificación de tres péptidos claramente estimuladores (FIGURA 3F). Los dos péptidos más estimuladores, NVLHSAFEVG (SEQ ID NO: 16) predichos con el marco 1 de refuerzo armónico y DNVLHSAFEV (SEQ ID NO: 15) predicho con el marco 2 de refuerzo armónico, que pertenecen a la GDP-L-fucosa sintasa codificada por el gen TSTA3, y solapantes por 9 AAs.

En detalle, las FIGURAS 3A-3F muestran: FIGURA 3A. Producción de GM-CSF por TCC21.1 en respuesta a una genoteca de exploración posicional deca péptidos completos (200 mezclas) presentadas por las células BLS que expresan solo DRB1*15:01. FIGURA 3B. Matriz de puntuación diseñada con la media log₁₀ de la producción de GM-CSF de tres experimentos independientes. Los bordes en negrita muestran mezclas seleccionadas para las mezclas definidas dobles. FIGURA 3C. Producción de GM-CSF por TCC21.1 en respuesta a los 50 péptidos con puntuaciones más altas predichas utilizando la matriz de puntuación basada en GM-CSF. FIGURA 3D. Producción de GM-CSF por TCC21.1 en respuesta a 22 mezclas definidas dobles. En gris, las mezclas con AAs definidas del motivo TCR en el marco 1 y en negro en el marco 2. Respuestas estimuladoras de mezclas en negritas (Marco 1/2-HM) se integraron en la matriz original utilizando el modelo medio armónico. FIGURA 3E. Valores de actividad del motivo TCR y la mezcla definida doble seleccionados con base en el modelo medio armónico e incorporados en la matriz original, Marco 1-HM en gris y Marco 2-HM en negro. FIGURA 3F. Producción de GM-CSF por TCC21.1 en respuesta a los 50 péptidos con puntuaciones más altas predichas utilizando las matrices de puntuación del marco 1 y 2 de refuerzo armónico. La genoteca de deca péptido completa, mezclas definida doble y deca péptidos individuales se presentaron por células BLS que expresan DRB1*15:01. Las mezclas se probaron a 200 µg/mL y los deca péptidos individuales a 5 µg/mL. Los histogramas muestran la media de error media $\pm$ estándar (SEM) y las gráficas de puntos medias de tres experimentos independientes. La citoquina liberada siempre se expresa como pg/mL liberada por TCC21.1 en respuesta a los estímulos menos pg/mL liberados en ausencia de los estímulos (control negativo).

La FIGURA 4 muestra un resumen de los deca péptidos humanos predichos con el procedimiento biométrico, que han sido sintetizados y luego probado para capacidad estimuladora a 5 mg/mL con base en la liberación de GM-CSF. Los péptidos se clasifican de 1 a 50 para el Marco 1 y 2 de Refuerzo HM, respectivamente.

3. ARNSeq/Transcriptoma y Datos de Proteoma que Muestran la Expresión de la Gdp-L-Fucosa-Sintasa en el Tejido Cerebral

El nivel de transcripto, expresado como "lecturas por kilobase de modelo de exón por millón de lecturas mapeadas" (RPKM), de GDP-L-fucosa sintasa en el cerebro autólogo LI y LIII se

muestra en la FIGURA 5. Los valores de transcripto para otros genes específicos de cerebro también se muestran como control de calidad de las muestras y como referencia para los genes expresados en el nivel alto (MBP, PLP1) y medios (glicoproteína asociada a mielina (MAG), proteína básica de oligodendrocitos asociada a mielina (MOBP) y glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMG)).

Se identificaron diecisiete péptidos de GDP-L-fucosa sintasa en tejido cerebral de materia blanca y gris de otros pacientes con MS y controles no de MS por análisis proteómico. Las secuencias de péptido se listan en la FIGURA 5 así como las coincidencias de espectro de péptido (PSM) en las diferentes muestras. El porcentaje de la secuencia de AA GDP-L-fucosa sintasa cubierta por el péptido identificado fue 56%. La posición se refiere a la secuencia de UniProtKB/ Swiss-Prot: Q13630.1. El análisis de otras proteínas específicas de cerebro como referencia también se incluyen (FIGURA 5).

En resumen, la GDP-L-fucosa-sintasa ha mostrado que se expresa en el cerebro (ARN y proteína).

4. Gdp-L-Fucosa Sintasa como el Autoantígeno Principal Para un Tcc Infiltrante de Cerebro

A fin de identificar los autoantígenos reconocidos por TCC21.1 en las dos lesiones cerebrales autólogas, que dentro de la cual TCC21.1 se supo que se expande clonalmente (LI y III (Planas y colaboradores, 2015)), las matrices de marco 1 y marco 2 de refuerzo armónico entonces se utilizaron para clasificación y puntuación, de acuerdo con su puntuación estimuladora, todos los péptidos de 10-mer solapantes naturales en las secuencias de proteínas dentro de una sub-base de datos de proteínas cerebrales creados con los datos de transcriptomas basados en ARNSeq de estas dos lesiones (GSE60943). De los 40 péptidos cerebrales naturales predichos con puntuaciones más altas para la matriz de marco 1, 38 péptidos se predijeron ya de la base de datos humana UniProt sesgada. Para la matriz de marco 2, los 40 péptidos principales se predijeron previamente (FIGURA 4). Los dos péptidos nuevos para el marco 1 se sintetizaron y se probaron. NVLHSAFEVG (GDP-L-fucosa sintasa 96-105, SEQ ID NO: 16) y DNVLHSAFEV (95-104, SEQ ID NO: 15) se encontró que estimulan TCC21.1 (FIGURA 4).

5. Caracterización de Reconocimiento/Caracterización de la Respuesta de Gdp-L-Fucosa Sintasa

Como se mencionó anteriormente, los dos péptidos de GDP-L-fucosa sintasa reconocidos por TCC21.1 se superponen por 9 AAs. En las células BCL que expresan DRB1*15:01 se sintetizaron y se probaron nueve péptidos de 10-mer adicionales superpuestos por 9 AAs y se identificó un péptido adicional, VLHSAFEVGA (97-106, SEQ ID NO: 18), que indujo la liberación de GM-CSF. El péptido NVLHSAFEVG (96-105, SEQ ID NO: 16) dio la respuesta óptima con una CE50 de 0,2 µg/mL y representado por las moléculas DRB1*15:01 y

DQB1*06:02. Los AAs comunes de los tres péptidos estimuladores son VLHSAFEV (97-104) (datos no mostrados).

A continuación, se caracteriza la respuesta de TCC21.1 a los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa presentados por PBMC irradiadas autólogas y BCL. Los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa presentados por los dos tipos de APC fueron capaces de inducir la proliferación. También se analizó el fenotipo funcional de esta respuesta. TCC21.1 mostró un fenotipo Th2, liberando principalmente citocinas Th2 y niveles más bajos de IL-22 e IL-10. Inesperadamente, cuando los péptidos fueron presentados por BCL de autólogo, indujeron niveles más altos de IFN γ . Además, TCC21.1 también liberó GM-CSF e IL-3 en respuesta a los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa. La liberación de estas dos citoquinas parece ser una característica específica de este TCC en comparación con otros Th1, Th1* o Th1/2 TCCs que se generaron a partir de pacientes con diferentes afecciones. La tinción de citoquinas intracelulares confirmó el fenotipo funcional Th2 de TCC21.1 en respuesta a la GDP-L-fucosa sintasa (96-105, SEQ ID NO: 16). Más del 60% de las células TCC21.1 fueron IL-4+ después de la estimulación con GDP-L-fucosa sintasa (96-105, SEQ ID NO: 16), mientras que solo alrededor del 12% fueron IFN γ +. Aproximadamente el 60% de las células fueron GM-CSF+ y el 47,7% de estas también IL-4+. La caracterización adicional de TCC21.1 mostró la expresión de CD28 y el receptor de quimiocinas CRTh2 (datos no mostrados).

6. Reconocimiento de Gdp-L-Fucosa Sintasa por Células T Cd4+ Infiltrantes de Csf del Paciente 1154sa

Se sintetizaron sesenta y dos péptidos de 15-mer superpuestos por 10 AAs y que cubrieron toda la proteína GDP-L-fucosa sintasa (FIGURA 6) y se sometió a ensayo su capacidad para inducir la proliferación de TCC21.1 cuando se presentaban por PBMC autólogas. Se probaron en paralelo siete péptidos de mielina inmunodominante/encefalitogénica (Bielekova y colaboradores, 2004), combinación de péptidos CEF (citomegalovirus, EBV, virus de influenza y toxoide tetánico) y gránulos de control en paralelo (FIGURA 6). TCC21.1 reconoció dos péptidos de GDP-L-fucosa sintasa superpuestos, 91-105 (SEQ ID NO: 14) y 96-110 (SEQ ID NO: 17), que contiene los tres decapeptidos estimuladores (95-104 (SEQ ID NO: 15), 96-105 (SEQ ID NO: 16) y 97-106 (SEQ ID NO: 18)) que se identificaron previamente.

7. Reconocimiento de la GDP-L-Fucosa Sintasa por Células T CD4+ Infiltrantes de CSF de Pacientes CIS/MS

A fin de averiguar si el reconocimiento específico de GDP-L-fucosa sintasa se presenta en las células T CD4+ que se infiltran en el CSF en pacientes con diferentes formas de MS (la mayoría CIS y RRMS), se desarrolló un nuevo protocolo para expandir células T CD4+ infiltrantes de CSF recientes a altos números en una sola ronda para minimizar las variaciones en el repertorio de células T originales. Las células T CD4+ infiltrantes de CSF expandidas con PHA en reposo que también se derivan de del compartimento CNS, de 31 pacientes CIS/MS

se probaron en cuadruplicado con los 62 péptidos de GDP-L-fucosa sintasa solapantes presentados por las PBMCs irradiadas autólogas, como así como con los siete péptidos de mielina, acumulación de péptidos CEF y gránulos de control. Todos los índices estimuladores (SIs; excepto gránulos de control) se agruparon y los valores SI menores de uno se trataron por tener un valor unitario. El análisis de medios K agrupados se llevó a cabo para determinar el corte óptimo para diferenciar los valores SI responsivos de los que no responden en esta población de pacientes. El agrupamiento de K-medias dio como resultado un valor de corte de 1,455 para diferenciar las respuestas positivas de las negativas. Posteriormente, para cada paciente, todos los péptidos que tienen una mediana de SI (de los pocillos cuadruplicados) superior a 1,455 se identificaron como respuestas positivas.

A continuación, se construyeron las puntuaciones de los pacientes calculando la suma de la media del SI de cada péptido sensible, ponderada por el número total de pacientes que respondieron a ese péptido. De esta manera, tanto los propios valores de SI para cada péptido, así como la inmunogenicidad relativa de cada péptido, se tomaron en cuenta para evaluar la frecuencia y fuerza de la respuesta inmune contra los antígenos específicos. Se llevó a cabo un análisis de k-medias de tres grupos sobre la base de 10 puntuaciones de los pacientes y los pacientes se agruparon claramente en tres categorías: “no respondedores”, “respondedores moderados” y “respondedores altos”. Por lo tanto, diecinueve pacientes (61,3%) se caracterizaron como no respondedores a la GDP-L-fucosa sintasa, seis (19,35%) como moderados y seis (19,35%) como respondedores altos (datos no mostrados). No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos para las respuestas de CEF o para los controles positivos o negativos. Los péptidos inmunodominantes se definieron como péptidos capaces de inducir respuestas positivas en al menos el 10% de pacientes. Los 14 péptidos de GDP-L-fucosa que logran este criterio se muestran en la FIGURA 7. El análisis funcional de las respuestas más fuertes a algunos péptidos inmunodominantes reveló un fenotipo Th1 con producción principalmente de IFN- γ (datos no mostrados).

En detalle, la FIGURA 7 muestra: Número de pacientes CIS/MS con células T CD4+ infiltrantes de CSF que respondieron a los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa. Los péptidos inmunodominantes que fueron positivos en al menos tres pacientes se muestran en negro. Los cuadrados negros son respondedores altos y los cuadrados blancos pacientes respondedores moderados.

En conclusión, aproximadamente 20-25% de los pacientes con MS (CIS, RRMS, SPMS) muestran una respuesta inmune a péptidos de GDP-L-fucosa sintasa inmunodominantes diferentes; la mayoría de estas células T específicas de GDP-L-fucosa sintasa tienen un fenotipo Th1 (el fenotipo mucho más frecuente en los pacientes con MS). Una comparación con la reacción a 7 péptidos de mielina (péptidos ETIMS) muestra que significativamente pocos pacientes reaccionan a estos péptidos como es comparado con la

GDP-L-fucosa sintasa.

Especificidad de RASGRP2

8. Identificación de TCC14 y Prueba de Ps-SCL con TCC14 para Identificar RASGRP2

TCC14 se identificó en un procedimiento análogo del paciente 1 con MS (homocigoto para HLA-DR15), sin embargo, en este caso a partir de la fracción de células T de sangre periférica autoprolikerantes (proliferación sin estimulación), que está enriquecida para células T que se dirigen al cerebro. La secuenciación profunda de TCR de las células que infiltran las lesiones cerebrales del paciente también mostró que TCC14 está expandido clonalmente en el cerebro. Se generó TCC14 como se muestra esquemáticamente en la FIGURA 1 (parte derecha). El aislamiento de células T autoprolikerantes se muestra con más detalle en la FIGURA 8A. En detalle, las células mononucleares de sangre periférica se sembraron en pocillos replicados después del etiquetado con el tinte éster N-succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) sin estímulo. Después de 7 días de cultivo, las células proliferantes (CFSE^{dim}) y no proliferativas (CFSE^{hi}) se identificaron por citometría de flujo y las células T autoprolikerantes (CFSE^{dim}) se aislaron por clasificación celular. Las secuencias TCRβV se comparan entre lesiones cerebrales MS y la población CFSE^{dim} (autoprolikerante). Más de 20% de las secuencias de TCRβV de la población CFSE^{dim} también se encontró en las lesiones cerebrales de MS (FIGURA 8B).

Después se expandió y probó TCC14 como se muestra en la FIGURA 2, utilizando un procedimiento no sesgado para identificar el antígeno/s objetivo de TCC14 utilizando genotecas de péptidos de combinación de exploración posicional y análisis biométrico como se describe en lo anterior. TCC14 expandido suficiente mente bien para ser probado con el conjunto completo de 200 mezclas de genotecas de exploración posicional. La restricción TCC14 se probó con células BLS transfectadas con haplotipo HLA-DR15 que expresa alelos HLA clase II (DR2a, DR2b o DQw6), puesto que los TCCs se derivan de un paciente con MS homocigoto HLA-DR15. Después de determinar su restricción de HLA-clase II (DRB1*15:01), la reactividad contra las 200 muestras se probó utilizando células BLS transfectadas con DRB1*15:01 y mostraron respuestas positivas contra uno o múltiples aminoácidos (aa) en cada una de las 10 posiciones. La proliferación (índice estimulador = SI; línea punteada SI = 2) basado en el ensayo de incorporación de timidina se utilizó después de 72 h como lectura para la respuesta TCC (FIGURA 9 panel I). Utilizando las matrices de puntuación para resumir la reactividad de TCC14 contra los 20 L-aa en cada una de las 10 posiciones de la genoteca de decapeptidos después de probar múltiples dosis, los péptidos que son reconocidos por TCC14 (FIGURA 9 panel II) se predijeron utilizando el proceso de análisis biométrico (Zhao y colaboradores, 2001). Las respuestas medias de los tres experimentos repetitivos se utilizaron para generar una matriz para combinaciones de aminoácidos óptimas de un ligando de péptido potencial. Los datos del transcriptoma de cerebro y las proteínas respectivas del

paciente 1, de quien TCC se había aislado, se utilizaron como base de datos de búsqueda. Se sintetizaron y se probaron 92 secuencias para reconocimiento por TCC14 basado en su aparición en los 50 péptidos predichos superiores durante al menos una de las matrices utilizadas (respuesta estimuladora con SI > 3) (FIGURA 9 panel III). Como se muestra previamente para los otros TCCs, existe una buena relación entre la clasificación alta predicha y la respuesta de células T (Sospedra y colaboradores, 2010; Zhao y colaboradores, 2001) puesto que TCC14 reconoció muchos de los péptidos de puntuación alta. Para evaluar la avidéz funcional para estos, se llevaron a cabo experimentos de titulación de dosis con los 33 péptidos que dieron respuestas positivas. Entre estas fueron los péptidos con SEQ ID NOs: 33 a 35. Los péptidos estimuladores se probaron en concentraciones decrecientes para la respuesta proliferativa de TCC14 utilizando BLS DR2b después de 72 h. (FIGURA 9 panel IV). Un péptido de RASGRP2 se reconoció con avidéz de antígeno alta ($EC_{50} = 0,012 \mu M$) (SEQ ID NO: 33), pero los péptidos de varias otras isoformas RASGRP (RASGRP1, -3, 4) y otros péptidos dieron respuestas positivas también (FIGURA 9 panel IV). El reconocimiento del péptido RASGRP2 por TCC14 dio por resultado la secreción de citoquinas Th2 y también de IFN- γ (datos no mostrados).

En conclusión, múltiples versiones de RASGRP son reconocidas por el clon TCC14 con RASGRP2 con la avidéz más alta (es decir, en concentraciones de antígeno más bajas), lo que subraya su relevancia biológica.

20 **9. Reactividad de RASGRP2 de Células de Sangre Periférica**

A fin de probar la reactividad para RASGRP2 en células T de memoria derivadas de sangre periférica, las PBMCs criopreservadas (1×10^8 células) de pacientes con MS tratados con natalizumab (NAT; n = 8) se descongelaron y después se agotaron para células que expresan CD45RA utilizando clasificación de células magnéticas (Miltenyi). 2×10^5 PBMC agotadas de CD45RA se sembraron por pocillo (10-15 pocillos replicados por condición) en medio X-Vivo y se trataron con vehículo (DMSO), con gránulos de CD2/CD3/CD28 o se pulsaron con grupos de péptidos RASGRP2 (concentración final de la combinación $10 \mu M$) o proteína RASGRP2 purificada completa (Origene; $0,3 \mu g/mL$). Los péptidos superpuestos de 15-mer que cubren la proteína RASGRP2 completa (SEQ ID NOs: 38-98) se organizaron en 9 grupos de péptidos con 7 péptidos por grupo que cubren la secuencia de RASGRP2 desde N- (grupo 1) hasta C-terminal (grupo 9). Se utilizó el ensayo de incorporación de timidina para medir las respuestas de proliferación a RASGRP2. El día 7 se pulsaron las células con $1 \mu Ci$ de metil- 3H -timidina por pocillo (Hartmann Analytic) y se recogieron después de 15 h en una membrana (Tomtec). La incorporación se midió mediante conteo de centelleo β (Wallac 1450, PerkinElmer). Los resultados se muestran como puntos (media $\pm$ SEM). El índice de estimulación (SI) se calculó como la relación de estimulación de péptido o proteína de ese control de vehículo. Los valores SI > 2 se consideraron como positivos (FIGURA 10).

En resumen, la FIGURA 10 muestra que las células T de memoria de pacientes con MS con alta autoproliferación reaccionan a RASGRP2. Los 8 donadores respondieron a ya sea las acumulaciones de péptidos individuales o varias de los péptidos RASGRP2 (incluyendo el agrupamiento 2, que contiene el péptido con SEQ ID NO: 46 que se traslapa con un péptido objetivo de TCC 14 (SEQ ID NO: 33)) y/o proteína completa que el RASGRP2 es un autoantígeno que es reconocido ampliamente por los pacientes con MS con un alto grado de autoproliferación.

10. Datos de ARNSeq/Transcriptoma y Proteoma que Muestran la Expresión de RASGRP2 en Células B Y en el Cerebro

La expresión de RASGRP1-4 se probó en el nivel de ARN y proteína en células B periféricas y cerebro (FIGURAS 11A-11B). RASGRP1-3 se expresan tanto en el cerebro del paciente 1 como en el transcriptoma de las células B de memoria autoproliferantes (FIGURAS 11A-11B).

En detalle, las FIGURAS 11A-11B muestran: (FIGURA 11A) El nivel de expresión de transcritos que se originan de péptido estimulador en la lesión III cerebral activa del paciente 1 con MS (RPKM) y células B de sangre periférica de autoproliferación (CFSE^{dim}), (RPKM) de 6 pacientes con RRMS (REM). Los niveles de expresión por debajo de 0,1 o la expresión del transcritos ausente se establecieron como 0,1. También se muestra la expresión de las transcripciones de control para el cerebro (MOBP) y las células B (CD19). (FIGURA 11B) Análisis de espectrometría de masas de células B de sangre periférica de RRMS (REM, nihil; n = 4) y tejido cerebral (materia gris, agrupada, n = 6) de pacientes con MS. La cobertura de proteínas (columnas) y los conteos espectrales (números) de RASGRP1-4 son representados como medida de la abundancia de proteínas.

El tejido cerebral (materia blanca y gris) de los controles y de los pacientes con MS también se probó con proteómico utilizando espectrometría de masas. Se identificaron péptidos de proteínas RASGRP1, 2 y 3 en el tejido cerebral, en particular con una gran abundancia de RASGRP2 (FIGURA 12). La posición se refiere a la secuencia de: GenBank AAC97349.1 (RASGRP1), GenBank AAI10307.1 (RASGRP2) y GenBank AAY15037.1 (RASGRP3).

Además, se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica (IHC) que mostraron la expresión de la proteína RASGRP2 en la materia gris del cerebro, específicamente en las neuronas corticales y del bazo (datos no mostrados).

11. Identificación de Péptidos Inmunodominantes Adicionales Dentro de las Secuencias de GDP-L-Fucosa Sintasa y RASGRP2

Adicionalmente, los péptidos se han identificado basados en algoritmos de búsqueda comúnmente utilizados y las suposiciones que son potencialmente inmunogénicas. El procedimiento se ha adoptado del contexto de la vacunación tumoral, donde la búsqueda de péptidos inmunogénicos en las proteínas propias (de un tumor) es un procedimiento estándar.

En este escenario, una secuencia de proteínas se clasifica para péptidos que se predice se unen a alelos HLA relevantes de enfermedad (o los alelos HLA de un paciente con tumor determinado). Por lo tanto, se tomaron las secuencias de GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2 y se predijeron péptidos de unión fuertes (SB) o débiles (WB) utilizando el NetMHCII bien aceptado (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) e IEDB (<http://www.iedb.org/>) en los algoritmos de predicción de unión de péptido in silico. Los detalles sobre cómo llevar a cabo las búsquedas están disponibles en los sitios de la red de los dos algoritmos de búsqueda. En resumen, la búsqueda implica copiar la secuencia de la proteína de interés en la herramienta de la red y elegir un alelo de interés HLA-clase II (o clase I, si es de interés). A continuación, el algoritmo producirá las secuencias de péptido y su respectiva unión prevista al alelo HLA-clase II. Para los alelos, para los que no fue posible llevar a cabo búsquedas NetMHCII, se utilizó IEDB. Se han utilizado alelos HLA que se sabe que están asociados con MS. Si ahora se consideran todas las regiones de las dos proteínas que se predice que serán WB (estas son de mayor interés en el contexto de autoantígenos) o SB (búsquedas de NetMHCII) o tienen un rango de unión previsto de 25% o menos (IEDB), estos tramos de aminoácidos cubrirán casi la totalidad de las proteínas GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2.

Para la proteína GDP-L-fucosa sintasa, se predijo que se unirían péptidos que abarcaban el área de los aminoácidos 1 a 315.

Para la proteína RASGRP2, se predijo que se unirían los péptidos que abarcaban las áreas de los aminoácidos 9 a 449 y 457 a 659.

Se utilizaron los siguientes alelos:

- HLA-DRB1*15:01 (NetMHCII)
- HLA-DRB5*01:01 (NetMHCII)
- HLA-DRB1*03:01 (NetMHCII)
- HLA-DRB1*13:03 (IEDB)
- HLA-DRB1*08:01 (IEDB)
- HLA-DRB3*02:02 (IEDB)
- HLA-DRB1*04:01 (NetMHCII)
- HLA-DRB1*04:04 (NetMHCII)
- HLA-DQw6 (DQA1*01:01; DQB1*06:02) (IEDB)

Se utilizaron las siguientes secuencias de proteínas:

GDP-L-fucosa sintasa: GenBank: AAH93061.1

RASGRP2: GenBank: AAI10307.1

En conclusión, las proteínas enteras y los péptidos inmunodominantes son adecuados para el uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de MS.

12. Fabricación de un Glóbulo Rojo Químicamente Acoplado

EDC como un reticulador químico

Un péptido que se había sintetizado con un residuo de biotina (biotina-PLP1; PLP1 = PLP 139-154) se ha utilizado para permitir la detección altamente específica del péptido utilizando estreptavidina conjugada con fluoróforo. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica se pulsaron con ya sea biotina-PLP1 (concentración final 0,05 mg/mL), EDC (concentración final 10 mg/mL), ambas en PBS durante 1 h a 4°C. Después de dos pasos de lavado, las células se tiñeron con estreptavidina conjugada con fluoróforo y se analizaron por citometría de flujo (estreptavidina-APC).

Como se muestra en la FIGURA 13, solo se observó unión de péptido eficiente en la presencia de ambos (péptido de biotina-PLP y EDC).

10 **13. Análisis Adicional con 105 Pacientes con MS (para GDP-L-fucosa sintasa) y 57 Pacientes con MS (para RASGRP2)**

Se llevó a cabo un análisis adicional con 105 pacientes con MS (para GDP-L-fucosa sintasa) y 57 pacientes con MS (para RASGRP2) para validar la inmunodominancia de los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa 51-65, 136-150, 161-175, 246-260 y 296-310 (SEQ ID NO: 12, 21, 23, 28 y 32) y péptido RASGRP2 78-92 (SEQ ID NO: 46). La reactividad de las células T CD4+ que se infiltran en el CSF, que son muy relevantes para la patogenicidad de la MS, a los péptidos probados se comparó con la reactividad a los péptidos de referencia inmunodominantes conocidos MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, MOG 1-20, MOG 35-55 y PLP 139-154.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 14A-14B y 15A-15B. Los datos muestran que los péptidos probados, que son fragmentos de las proteínas identificadas en la presente GDP-L-fucosa sintasa y RASGRP2, son tan reactivos o incluso más reactivos que los péptidos de referencia inmunodominantes conocidos. De esta manera, los péptidos probados han confirmado nuevamente como inmunodominantes. El estudio de las células T que se infiltran en el CSF y su respuesta a un autoantígeno putativo es particularmente significativo porque las células T autoreactivas que se han infiltrado en el órgano objetivo, es decir, el cerebro, la médula espinal o CSF, se consideran probablemente biológicamente relevantes.

Las respuestas proliferativas y la secreción de IFN- γ se sometieron a ensayo como se describe anteriormente bajo los Materiales y Métodos de 7 y debajo de 15, a menos que se especifique de otra manera.

En detalle, las FIGURAS 14A-14B muestran: FIGURA 14A. Respuestas proliferativas expresadas como índices estimulantes (SI) y secreción de IFN- γ (pg/mL) de células T CD4+ que se infiltran en el CSF (ronda única de expansión de PHA) a cinco péptidos de GDP-L-fucosa sintasa (51-65, 136-150, 161-175, 246-260 y 296-310), cuatro péptidos MBP (13-32, 83-99, 111-129 y 146-170), dos péptidos MOG (1-20 y 35-55), un péptido PLP (139-154) y péptidos CEF, presentados por PBMC autólogas. Todos los péptidos se han probado en cuatro pocillos por paciente. Cada punto representa un pocillo y cada péptido se ha probado

en 420 pocillos (4 pocillos x 105 pacientes). Los pocillos positivos son pocillos con IS por encima de 2 (línea de puntos) o con IFN- γ por encima de 20 pg/mL (línea de puntos). También se muestra el porcentaje de pocillos positivos, así como la relación entre el porcentaje de pocillos positivos para IFN- γ y SI. FIGURA 14B. Porcentaje de pacientes positivos con células T CD4⁺ infiltrantes de CSF específicas para diferentes péptidos o sin especificidad identificada. Se definen pacientes positivos como pacientes con más de 2 de los 4 pocillos positivos para SI (histograma izquierdo), IFN- γ (histograma intermedio) y SI o IFN- γ (histograma derecho).

En detalle, las FIGURAS 15A-15B muestran: FIGURA 15A. Respuestas proliferativas expresadas como índices estimuladores (SI) y secreción de IFN- γ (pg/mL) de células T CD4⁺ infiltrantes de CSF (ronda única de expansión de PHA) a un péptido RASGRP2 (78-92), cuatro péptidos MBP (13-32, 83-99, 111-129 y 146-170), dos péptidos MOG (1-20 y 35-55), un péptido PLP (139-154) y péptidos CEF, presentados por las PBMC autólogas. Todos los péptidos se han probado en cuatro pocillos por paciente. Cada punto representa un pocillo y cada péptido se ha probado en 228 pocillos (4 pocillos x 57 pacientes). Los pocillos positivos son pocillos con IS arriba de 2 (línea punteada) o con IFN- γ arriba de 20 pg/mL (línea punteada). El porcentaje de los pocillos positivos también se muestra, así como la relación entre el porcentaje de pocillos positivos para IFN- γ y SI. FIGURA 15B. Porcentaje de pacientes positivos con células T CD4⁺ infiltrantes de CSF específicas para los diferentes péptidos o sin especificidad identificada. Los pacientes positivos se definen como pacientes con más de 2 de los 4 pocillos positivos para SI (histograma izquierdo), IFN- γ (histograma intermedio) y SI o IFN- γ (histograma derecho).

14. Inducción de Tolerancia *in vivo* con Péptidos Mielina en un Ensayo de Fase Ib

Se probaron 10 pacientes quienes fueron diagnosticados con EM para inducción de tolerancia. En particular, se probaron para determinar seguridad y tolerabilidad de glóbulos rojos fijados en EDC acoplados al péptido y para indicadores de inducción de tolerancia *in vivo* por inyección i.v. de glóbulos rojos autólogos químicamente (por EDC) acoplados a un conjunto de péptidos de mielina (MBP 13-32, MBP 83-99, MBP 111-129, MBP 146-170, MOG 1-20, MOG 35-55, y PLP 139-154) (SEQ ID Nos: 261-267) en el contexto de un ensayo Fase Ib. En resumen, la sangre se tomó de cada paciente y se separaron los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos luego se acoplaron químicamente a los péptidos de mielina *ex vivo* bajo condiciones estériles y se inyectaron i.v. en el paciente. 2 pacientes recibieron 1×10^{10} células, 3 pacientes recibieron 1×10^{11} células y 5 pacientes recibieron 3×10^{11} células. El día de la inyección se definió como el día 0.

La sangre también se tomó 6 semanas antes de la inyección (= Pre Inducción de tolerancia inmunitaria) y 12 semanas después de la inyección (= Pos Inducción de tolerancia inmunitaria). En estas datos, los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron y se examinaron

por citometría de flujo con anticuerpos fluorescentemente etiquetados para la presencia de una amplio intervalo de diferentes tipos de células incluidas varias subpoblaciones de células T, células B, monocitos, y células dendríticas, células exterminadoras naturales incluidas aquellas que expresan marcadores de células reguladoras T inducidas (Tr1) o células reguladoras T naturales (nTregs). Los dos últimos tipos de células se pueden caracterizar por los siguientes marcadores:

- Células reguladoras 1 T (Tr1) (CD3+ CD4+ CD45RA- CD49b+ LAG3+)
- Células reguladoras T naturales (nTreg) FoxP3+ (CD4+ CD25hi FOXP3+)

Además, la reactividad de las células T para los siete péptidos se midió individualmente para células T de sangre periférica y para las células T infiltrantes de CSF como se describe a continuación bajo “Prueba de células T a granel derivadas de CSF de pacientes con CIS y RRMS contra GDP-L-fucosa sintasa y péptidos de mielina” y “Estimulación de células T” en los mismos datos, es decir 6 semanas antes de la inyección y 12 semanas después de la inyección.

Las FIGURAS 16A-16C muestran que los signos de inducción de tolerancia específica de antígeno en la inyección de los glóbulos rojos acoplados fueron detectables como es medido por un incremento en las células Tr1 y FoxP3+ nTreg y una disminución de la reactividad de células T específicas de péptido. Estos datos indican que al administrar los péptidos inmunodominantes, se puede inducir la tolerancia a los péptidos inmunodominantes respectivos.

En detalle, las FIGURAS 16A-16C muestran:

FIGURA 16A. Porcentaje de células Tr1 de células de memoria CD4+ 6 antes de la inyección (= Pre Inducción de tolerancia inmunitaria) y 12 semanas después de la inyección (= Post Inducción de tolerancia inmunitaria). FIGURA 16B. Porcentaje de célula FoxP3+ nTreg de células de memoria CD4+ 6 semanas antes de la inyección (= Pre Inducción de tolerancia inmunitaria) y 12 semanas después de la inyección (= Post Inducción de tolerancia inmunitaria). FIGURA 16C. Reactividad de células T en cinco pacientes que recibieron 3×10^{11} células 6 semanas antes de la inyección y 12 semanas después de la inyección (puntos grises: antes de la inyección; puntos negros: después de la inyección). La gráfica superior muestra los porcentajes de las células que responden a todos los péptidos. La gráfica inferior muestra la proliferación de cada micropocillos individual (60 en total).

15. Material y Métodos

Material del Paciente

GDP-L-fucosa sintasa

Paciente 1154SA: células mononucleares derivadas de CSF en PBMCs se obtuvieron de un paciente con SPMS con lesiones desmielinizantes de patrón II como se describe previamente (Planas y colaboradores, 2015). Los tipos HLA-clase I y II de este paciente fueron: A*32:01,

A*33:01, B*14:02, B*51:01, DRB1*15:01, DRB5* 01:01, DQB1*06:02 y DQA1*01:02.

Se recolectaron CSF de punción lumbar de diagnóstico y sangre periférica emparejada de 31 pacientes con MS no tratados: 8 pacientes con CIS, 20 pacientes con RRMS y 3 pacientes con SPMS. Los pacientes se reclutaron de la clínica ambulatoria inims y del hospital de día de University Medical Center Hamburg-Eppendorf y de la sección nims, Neurology Clinic, University Hospital Zurich. El diagnóstico de MS se basó en los criterios revisados de McDonald. Todos los pacientes con CIS tenían bandas oligoclonales específicas de CSF detectadas por enfoque isoeléctrico (IEF). Los pacientes que no habían recibido esteroides al menos 4 semanas antes de la inscripción o cualquier agente inmunomodulador o inmunosupresor durante los últimos 3 meses, se consideraron no tratados e incluidos en el estudio. Se expandieron *in vitro* células recientes de CSF de estos pacientes (ver a continuación). Las PBMCs se aislaron recientemente de tubos de sangre que contenían EDTA mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (PAA, Pasching, Austria) y se crioconservaron. El Ethik Kommission der Ärztekammer Hamburg, protocolo No. 2758 y el Comité de Ética Cantonal de Zúrich, EC-No. del proyecto de investigación 2013-0001, aprobó los procedimientos del estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes o familiares.

Se obtuvo tejido de autopsia cerebral de 13 paciente con MS (7 con SPMS, 5 con PPMS y 1 con (PR) MS) recidivante primaria y 7 controles sin MS se obtuvieron del banco de tejido de Esclerosis múltiple de UK (UK Multicentre Research Ethics Committee, MREC/02/2/39).

Para el análisis adicional de GDP-L-fucosa sintasa (13. De los “Ejemplos”), se recogió CSF de 105 pacientes. Entre los 105 pacientes, la relación de hombres a mujeres fue 1,9, la edad promedio fue 35,68 (intervalo 17-58), 4 pacientes fueron diagnosticados con RIS, 10 pacientes fueron diagnosticados con CIS, 82 pacientes fueron diagnosticados con RRMS, 4 pacientes fueron diagnosticados con SPMS y 5 pacientes fueron diagnosticados con PPMS.

RASGRP2

Las PBMC se aislaron del paciente 1154SA por centrifugación de densidad Ficoll.

Para el análisis adicional de RASGRP2 (13. de “Ejemplos”), se recolectó CSF de 57 pacientes. Los 57 pacientes fueron entre los 105 pacientes probados para GDP-L-fucosa sintasa. Entre los 57 pacientes, la relación de hombres a mujeres fue 2,5, la edad promedio fue 35,33 (intervalo 17-55), 2 pacientes fueron diagnosticados con RIS, 8 pacientes fueron diagnosticados con CIS, 43 pacientes fueron diagnosticados con RRMS, 1 paciente con SPMS y 3 pacientes fueron diagnosticados con PPMS.

35 Ensayos de Autoproliferación

Las PBMCs se descongelaron con medio IMDM completo (GE Healthcare) que contiene 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Corning), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich),

2 mmol/L L-glutamina (PAA) y suero humano descomplementado con calor al 5% (HS, PAA) y después se lavó una vez con un medio de AIM-V sin suero (GIBCO, Thermo Fisher Scientific), que contiene albúmina humana. Las células se incubaron durante 15 min en un medio AIM-V que contienen 50 U/mL de ADNsa (Roche) a 37°C para evitar la formación de grumos de células. después de dos pasos de lavado con PBS que contiene HS al 0,1%, las células se re-suspendieron en una concentración de 10×10^6 células/mL en PBS/0,1% de HS y luego se etiquetaron en una concentración final de 0,5 μ M CFSE(Sigma-Aldrich) durante 3 min a temperatura ambiente. El etiquetado se detuvo al inactivarse con un volumen de exceso de 5x de un medio RPMI completo frío (PAN Biotech) que contiene HS al 10%. Después de un paso de lavado adicional con AIM-V, las células etiquetadas con CFSE se sembraron a 2×10^5 PBMCs/200 μ L por pocillo en AIM-V (10-12 pocillos de replicado por donador y condición) en placas de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos (Greiner Bio-One) a 37°C, CO₂ al 5%, en ausencia de estímulos de oxígeno (= autoproliferación). Para las reacciones de células T convencionales, para algunos donadores PHA (0,5 μ g/mL) como los estímulos independientes de TCR toxoide de tétanos (TTx, 5 μ g/mL, Novartis Behring) como el estímulo de antígeno extraño y se utiliza la ración de linfocitos mezclada (MLR) como el estímulo de antígeno alogénico. Después de 7 días las células etiquetadas con CFSE se recolectaron y se acumularon de los pocillos de replicado, se lavaron con PBS, se bloquearon con Fc con IgG humana (Sigma-Aldrich) y se etiquetaron con agua Live/Dead^{MR} Aqua (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a 4°C. Después del lavado con PBS frío que contiene EDTA 2mM y FCS al 2%, la células se tiñen directamente a los marcadores de superficie utilizando los anticuerpos conjugados con fluorocromo (Key Resource Table). Las mediciones se llevaron a cabo en un Citómetro de Flujo LSR Fortessa (BD Biosciences), y los datos se analizaron con FlowJo (Tree Star). Este ensayo se utilizó adicionalmente para probar la competición de la autoproliferación al incubar PBMCs etiquetadas con CFSE en presencia de anticuerpos anti-HLA-DR, anti-CD4, anti-IFN- γ y anti-GM-CSF (10 μ g/mL) o controles de isotipo apropiados durante 7 días. Para el ensayo de incorporación de timidina, 2×10^5 PBMCs/pocillo (10-12 de pocillos por replicado por donador y condición) se cultivaron con el medio AIM-V sin suero en placas de microtitulación de fondo U de 96 pocillos a 37°C, CO₂ al 5% y en el día 7 pulsado con 1 μ Ci de metil-³H-timidina por pocillo (Hartmann Analytic) y las célula recolectadas después de 15 h (Tomtec). La incorporación se midió por conteo de β -centelleo (Wallac 1450, PerkinElmer).

Clonación de Células T

A fin de generar TCCs del compartimiento autoproliferador, 500 células CFSE^{dim} de la acumulación de células clasificadas de células CFSE^{dim} (20.000 células) del paciente 1 con MS (para la secuenciación TCRV β , descrito en lo anterior) se dividieron y la dilución limitante se llevó a cabo como se describe previamente (Aly y colaboradores, 2011). Los TCCs se enriquecieron utilizando un protocolo de expansión con PHA (Sigma) e IL-2 humano (Aly y

colaboradores, 2011). La secuenciación de las redistribuciones de TCR de los TCCs generador se analizó, como se describe previamente (Yousef y colaboradores, 2012). Para evaluar la respuesta de citoquinas de los TCCs, se utilizaron partículas de anti-CD2/CD3/CD28 cargadas con anticuerpo MACSibead (Miltenyi) para estimular cada TCC en 7 pocillos de replicado con cada 200.000 células en el medio X-Vivo (Lonza). Después de 48 h los sobrenadantes se recolectaron y las respuestas de citoquinas se midieron, como se describe en lo anterior. Para la expresión del receptor de quimiocina, los TCCs se tiñeron con Acqua Viva/muerta y los anticuerpos contra CXCR3 y CCR6 después de la descongelación y las células en reposo durante la noche.

10 **Análisis Transcriptómico**

El análisis transcriptómico de las lesiones cerebrales se llevó a cabo como se describe previamente (Planas y colaboradores, 2015). Los datos planteados se depositaron en NCBI's Gene Expression Omnibus y son accesibles a través del número de acceso de la serie GEO GSE60943.

15 **Análisis Proteómico**

Para el análisis proteómico, la extracción y digestión de proteínas asistida por presión se llevó a cabo con un barociclador (2320EXT, BioSciences, Inc, South Easton, MA). Se aplicó reducción y alquilación sobre el homogeneizado antes de que las muestras fueran digeridas con Lys-C y tripsina. Los péptidos se desalaron en columnas de extracción en fase sólida (C18 Finissterre, Wicom Alemania), se secaron al vacío, se volvieron a disolver y se midieron (espectrofotómetro Nanodrop 1000, (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Los péptidos resultantes se purificaron y se separaron mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, Agilent LC1200 equipado con una columna de Poliamina II 250 x 3,0 mm 120 Å, 5µm) antes de inyectarlos con un sistema de nanocromatografía líquida Easy-nLC vinculado a un instrumento Orbitrap Fusion (Thermo Fisher). El análisis de datos se llevó a cabo con el software MASCOT que utiliza una base de datos de proteínas humanas UniProtKB/ Swiss-Prot (22 de Marzo de 2016 con 40912 entradas). Los parámetros de búsqueda fueron 0,05 Da de tolerancia a la masa de fragmentos y 10ppm de la masa de precursor, número mínimo de péptidos 2, y FDR (tasa de descubrimiento falso) de 0,1%, lo que permite 2 escisiones erróneas en los fragmentos de tripsina. La carbamidometilación en la cisteína se estableció como una modificación fija, y la oxidación de la metionina, la acetilación n-terminal como modificaciones variables.

Genotecas de Péptido de Exploración posicional y Péptidos Individuales

GDP-L-fucosa sintasa

35 Se preparó una genoteca de combinación de decapeptido de C-amida L-aminoácido (AA), N-acetilado sintético en un formato de exploración posicional (200 mezclas) y se prepararon veintidós mezclas definidas dobles. Los péptidos individuales (FIGURA 4 y

FIGURA 6) se sintetizaron por los Péptidos y Elephants GmbH (Potsdam, Alemania).

RASGRP2

Se preparó una genoteca de exploración posicional de decapeptido L-aa (N-acetilada y C-amida TPI 2040) mediante métodos estándares. Cada una de las 200 mezclas de la genoteca se sometió a ensayo para determinar su actividad proliferativa mediante TCC14a a 40, 120, y 200 µg/mL utilizando un ensayo de incorporación de timidina. La restricción de TCC14 con las células BLS transfectadas con el haplotipo HLA-DR15 que expresan alelos HLA clase II (DR2a (= DRB5*01:01), DR2b (= DRB1*15:01) o DQw6 (= DQB1*0602)), ya que el TCC se deriva de un paciente con MS homocigoto HLA-DR15. La expresión de HLA clase II de las primeras líneas celulares BLS se verificó anticuerpos específicos contra DR2a, DR2b y DQ y las células fueron negativas para micoplasma. Los resultados se organizaron en cuatro matrices (datos no mostrados): tres matrices, cada una de las cuales representa la actividad en una de las dosis anteriores, y una matriz que utiliza la concentración para lograr una proliferación de 3 veces para combinar las tres dosis en una actividad. Utilizando el proceso de análisis biométrico (Zhao y colaboradores, 2001) contra la base de datos de proteinasa del transcriptoma del cerebro del paciente con MS, se generaron lista de péptidos predichos para cada una de las cuatro matrices. Debido a una gran cantidad de concordancia entre las listas predichas, se produjo un total de 92 péptidos de decámero distintos dentro de los 50 péptidos predichos superiores en al menos una lista de predicción de matriz. Estos péptidos se eligieron para ser sintetizados (por Péptidos y Elephants GmbH, Potsdam, Alemania) y se probaron.

Células y Condiciones de Cultivo

Se expandieron células mononucleares derivadas de CSF a granel del paciente 1154SA, como se informa previamente (Planas y colaboradores, 2015). Brevemente, 2000 células por pocillo se sembraron en placas de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos junto con 2×10^5 PBMC irradiadas alogénicas (45 Gy), 1 µg/mL de PHA-L (Sigma, St Louis, MO) y sobrenadante de IL-2 (500 U/mL). El medio consistió de IMDM (PAA) que contiene 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (PAA), 50 µg/mL de gentamicina (BioWhittaker, Cambrex), L-glutamina 2 mM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) y suero humano descomplementado con calor al 5% (PAA). La IL-2 adicional se agregó cada 3-4 días. Las células T CD4+ infiltrantes de CSF se seleccionaron positivamente utilizando gránulos magnéticos anti-CD4 (Micro Gránulos CD4, MACS humana, Miltenyi Biotec Inc, CA, EUA) y se re-estimularon una vez más con PHA-L, IL-2 y PBMC irradiadas alogénicas.

Se estableció TCC21.1 de células infiltrantes de CSF y TCC14 de célula T auto proliferantes derivadas de PBMC como se describe previamente (Planas y colaboradores, 2015).

Prueba de célula T a granel derivadas de CSF de pacientes con CIS- y RRMS contra

GDP-L-fucosa sintasa y péptidos de mielina

Se mezclaron células mononucleares derivadas de CSF a granel de 31 pacientes con CIS/MS con 5×10^6 de PBMCs irradiadas alogénicas y se seleccionaron positivamente células T CD4+ con gránulos magnéticos anti-CD4. A continuación se sembraron fracciones de CD4+ a 1500
 5 células por pocillo en placas de microtitulación de fondo en U de 96 pocillos junto con $1,5 \times 10^5$ PBMC irradiadas alogénicas, 1 $\mu\text{g/mL}$ de sobrenadante de PHA-L e IL-2. El medio consistió en RPMI 1640 sin Hepes (Pan-Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con glutamina 2 mM (Pan-Biotech), 1% (vol/vol) de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% (vol/vol) de piruvato de sodio (Gibco), 50 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina-estreptomicina (Corning, NY, USA), 0,00001% de β -
 10 mercaptoetanol (Gibco) y 5% de suero humano (Blood Bank Basel). Se agregó IL-2 adicional cada 4 días. Los pocillo en crecimiento se transfirieron a placas de 48 pocillos y finalmente a un matraz de 75 cm³ hasta que las células reposaron completamente (20-25 días). Las células se expandieron mucho en una sola ronda de estimulación.

Para el análisis adicional del péptido de GDP-L-fucosa sintasa péptidos y un péptido
 15 RASGRP2 (13. de "Ejemplos"), se llevó a cabo el mismo método.

Se generó un BCL autólogo del paciente 1154SA mediante transformación de EBV. Se transfectaron células BLS con moléculas HLA clase II individuales, DR2a (DRA1*01:01, DRB5*01:01), DR2b (DRA1*01:01, DRB1*15:01) y DQw6 (DQA1*01:02, DQB1*06:02).

Estimulación de célula T

20 Las respuestas de TCC a mezclas de péptidos definidos simples/dobles o decapeptidos individuales se probaron sembrando por duplicado 2×10^4 células T y 5×10^4 líneas de células BLS irradiadas o BCL autólogas o 1×10^5 PBMC irradiadas (como se indica) con o sin mezclas de péptidos de combinación o de decapeptidos individuales. 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de PHA y 10^{-7} de M PMA (Sigma), 1 $\mu\text{g/mL}$ de anti-CD3 recubierto en la superficie (OKT3, Ortho Biotech
 25 Products, Raritan, NJ) y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de anti-CD28 soluble (Biolegend, San Diego, CA), y un Kit de Activación de Células T (gránulos anti-CD3, anti-CD28, anti-CD2) (Miltenyi Biotec) sirvieron como controles positivos como se indica.

La respuesta de células T CD4+ infiltrantes de CSF expandidas con PHA a GDP-L-fucosa sintasa, mielina y péptidos CEF (FIGURA 6) se probó al sembrar en cuadruplicado 6 x
 30 10^4 células T y 2×10^5 PBMCs autólogas irradiadas o sin péptidos. Para los experimentos EdU se utilizaron BLS DRB1*15:01 como APCs. El Kit de Activación de Células T se utilizó como un control positivo.

Para el análisis adicional de los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa y un péptido RASGRP2 (13. de "Ejemplos"), se llevó a cabo el mismo método en cuanto a la respuesta de
 35 las células T CD4+ infiltrantes de CSF expandidas con PHA a la GDP-L-fucosa sintasa.

Medición de la citoquinas

GDP-L-fucosa sintasa

Las citoquinas en el sobrenadante de TCC21.1 estimulado, y células CSF expandidas se midieron 48 horas después de la estimulación utilizando el inmunoensayo basado en gránulos de LEGENDplex Panel de Citoquinas Auxiliares T humanas (Biolegend), GM-CSF ELISA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) e IL-3 ELISA (Biolegend) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la tinción de citoquinas intracelulares, TCC21.1 se analizó 48 horas después de la estimulación. Después de 5 horas en presencia del inhibidor del transporte de proteínas GolgiStop (BD Biosciences), las células T se etiquetaron con Live/Dead^{MR} Aqua (Invitrogen). Después de la fijación y permeabilización con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), las células se tiñeron con anticuerpos contra CD4 (APC-Cy7, Biolegend), IFN-γ (FITC, Biolegend), IL-4 (PE, BD Bioscience), GM-CSF (APC, Biolegend) e IL-3 (PE, Biolegend) en PBS que contiene saponina y BSA, y se analizó por citometría de flujo.

Para el análisis adicional de los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa y un péptido RASGRP2 (13. de "Ejemplos"), la secreción de IFN-γ en el sobrenadante de las células T infiltrantes de CSF expandidas estimuladas y no estimuladas se midieron después de 48 horas de cultivo utilizando IFN-γ ELISA (Biolegend) por duplicado en todos los pocillos individuales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Respuestas Proliferativas

GDP-L-fucosa sintasa

La proliferación se midió 72 horas después de la estimulación por incorporación de 3H-timidina (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemania) en un contador de centello (Wallac 1450, PerkinElmer, Rodgau-Jürgesheim, Alemania). El índice estimulador (SI) se calculó como sigue: $SI = \text{Media (replicados de péptido cpm)} / \text{Mediana (replicados cpm sin péptido)}$. La proliferación también se midió utilizando un Kit de Ensayo de Citometría de Flujo Click-iTTM EdU (APC, Molecular Probes, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos anti-CD3 (PE-Cy-7, e-Bioscience, San Diego, CA) y anti-TRBV-21 (FITC, Beckman Coulter, Brea, CA) y se analizaron por citometría de flujo.

RASGRP2

Las respuestas proliferativas se probaron como se describe bajo 9.

Para el análisis adicional de los péptidos de GDP-L-fucosa sintasa y un péptido RASGRP2 (13. de "Ejemplos"), se midieron las respuestas proliferativas como se describe para la GDP-L-fucosa sintasa anterior

Expresión del receptor de superficie

El TCC21.1 en reposo se tiñó con anticuerpos contra CD4 (PE-Texas Red, Thermo Fischer, Waltham, MA), TRBV21 (FITC, Beckman Coulter), CD28 (PE-Cy7, BioLegend), CCR4 (APC, BioLegend), CCR6 (BV785, BioLegend) y CRTh2 (PE, BioLegend) y se analizó por citometría de flujo.

Análisis citométrico de flujo

Se condujo la adquisición de la muestra utilizando un Citómetro de Flujo LSR Fortessa (BD Biosciences) con el software Diva, y los datos se analizaron con FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

5 RT-PCR y Secuenciación de las Redistribuciones de TCR

La extracción de ARN, transcripción inversa y secuenciación de cadena TCR α/β (TRA/BV) de TCC21.1 se evaluó como se informa previamente (Planas y colaboradores, 2015). Las designaciones del gen TCR son de acuerdo con la nomenclatura IMGT (ImMunoGeneTics, www.IMGT.org).

10 HLA

Los individuos se tipificaron para moléculas HLA-clase I y II en Histogenetics LLC, NY, EUA. El aislamiento de ADN de sangre entera con una concentración final de 15 ng/ μ L se llevó a cabo con un protocolo de aislamiento de ADN estándar utilizando un tratamiento con solución amortiguadora de lisis Triton y proteinasa K. Las muestras se tipificaron para HLA clase I (A* y B*) y HLA clase II (DRB1*, DRB3*, DRB4*, DRB5*, DQA1* y DQB1*) utilizando la tipificación basada en secuencia HLA de alta resolución (SBT). Las predicciones de la unión a HLA clase II se hicieron utilizando la herramienta consenso de recursos de análisis IEDB.

Análisis Estadístico

Se llevó a cabo el análisis de k-medias de tres grupos en las puntuaciones de pacientes para agrupar los pacientes en tres categorías. Las asociaciones entre los niveles de respuesta de los péptidos, pacientes, y el estado de HLA se llevaron a cabo utilizando la Prueba Exacta de Fisher con corrección Bonferroni-Holm aplicada como apropiada, con 5% de significancia

MODALIDADES

1. Una proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, o un fragmento, derivado o variante de empalme de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas o fragmento, derivado o variante de empalme de las mismas, para el uso en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de esclerosis múltiple (MS). Se prefiere específicamente una proteína GDP-L-fucosa sintasa o una proteína de la familia de proteínas RASGRP, en particular RASGRP2, o fragmento de la misma.

2. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con la modalidad 1,

en donde la proteína GDP-L-fucosa sintasa

a) tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o
b) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o

c) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o

5 d) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 y la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o fragmento del mismo o

10 e) se codifica por un gen TSTA3, en particular por una secuencia de genes de nucleótidos 143612618 a 143618048 de NC_000008.11, se codifica por un gen que es al menos 80%, de manera preferente al menos 90%, de manera aún más preferente al menos 95% idéntico a la secuencia de genes de los nucleótidos 143612618 a 143618048 de NC_000008.11

15 y/o

en donde el miembro de la familia de proteínas RASGRP

f) tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

20 g) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

25 h) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o

30 i) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 y la proteína o fragmento o variante de empalme de la misma se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos que es respectiva como se expone en
35 cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o fragmento del mismo o

j) se codifica por un gen RASGRP, in particular por una secuencia de genes de

nucleótidos

- 38488101 a 38565575 de NC_000015.10,
- 64726911 a 64745456 de NC_000011.10,
- 33436324 a 33564750 de NC_000002.12, o
- 5 – 38409051 a 38426305 de NC_000019.10,

se codifica por un gen que es al menos 80%, de manera preferente al menos 90%, de manera aún más preferente al menos 95% idéntico a la secuencia de genes de los nucleótidos

- 38488101 a 38565575 de NC_000015.10,
- 64726911 a 64745456 de NC_000011.10,
- 10 – 33436324 a 33564750 de NC_000002.12, o
- 38409051 a 38426305 de NC_000019.10.

La proteína GDP-L-fucosa sintasa con la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o una proteína con al menos 90% de identidad o fragmento del mismo es especialmente preferida. Una proteína RASGRP2 con la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o una proteína con al menos 90% de identidad o fragmento del mismo también se prefiere especialmente.

3. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con la modalidad 1 o 2, en donde el fragmento comprende 5 a 50, de manera preferente 5 a 20, de manera más preferente 10 a 15 aminoácidos, de manera aún más preferente 15 aminoácidos.

Un fragmento de una longitud de 10 a 15 aminoácidos es particularmente preferido.

4. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con la modalidad 2 o 3, en donde el fragmento es

a) al menos 85%, de manera preferente al menos 90%, de manera más preferente al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o

b) al menos 70%, de manera preferente al menos 80%, de manera más preferente al menos 90% homólogo a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva o

c) al menos 60%, de manera preferente al menos 70%, de manera más preferente al menos 80%, de manera aún más preferente al menos 90% homólogo a una secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva y se une a un alelo HLA autólogo, es reconocido por una célula T y/o es reconocido por un anticuerpo que se une a o reconoce la secuencia de aminoácidos que es respectiva.

Se prefiere especialmente que el fragmento sea al menos 90% idéntico a la secuencia de aminoácidos correspondiente respectiva.

5. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el fragmento comprende una secuencia

seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 10 a 98, de manera preferente SEQ ID NOs: 10 a 35, consiste de manera preferente una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 10 a 98, de manera preferente SEQ ID NOs: 10 a 35.

5 El fragmento de manera preferente comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 10 a 35.

6. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores para identificar un sujeto humano quien es adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígenos en MS, de manera preferente MS temprana. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento de la misma.

10 7. La proteína, fragmento, derivado o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 para diagnosticar MS de patrón II en un sujeto humano. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento de la misma.

8. Un portador que comprende al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5. Se prefiere particularmente que el portador comprenda al menos una proteína, fragmento o secuencia de nucleótidos.

9. El portador de acuerdo con la modalidad 8, en donde el portador se acopla a la al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme, y/o el portador contiene la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes.

Se prefiere particularmente que el portador se acopla a la al menos una proteína o fragmento y/o que el portador contenga a la secuencia de nucleótidos.

10. El portador de acuerdo con la modalidad 8 o 9, en donde el portador se selecciona del grupo que comprende una célula, de manera preferente una célula sanguínea, una proteína, un lípido, un glicolípido, un gránulo, una nanopartícula, una partícula similar a virus (VLP) y una molécula, tal como una molécula de azúcar, y cualquier combinación de las mismas.

El portador es de manera preferente una célula sanguínea.

11. El portador de acuerdo con la modalidad 10, en donde la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme se expresa por la célula, de manera preferente la célula sanguínea.

Se prefiere especialmente que la proteína se exprese por una célula sanguínea.

12. El portador de acuerdo con la modalidad 10 o 11, en donde la célula sanguínea es una glóbulo rojo o glóbulo blanco.

35 13. El portador de acuerdo con cualquiera de las modalidades 10 a 12, en donde el portador es una célula sanguínea y la célula sanguínea se acopla químicamente por un agente de acoplamiento, de manera preferente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

(ECDI/EDC), a la al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme. De manera preferente, la al menos una proteína o fragmento se acopla por EDC a una célula sanguínea.

14. Un método para fabricar la célula sanguínea químicamente acoplada de la modalidad 13, que comprende aislar al célula sanguínea de un sujeto humano, agregar la al menos una proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme y agregar subsecuentemente el agente de acoplamiento, de manera preferente EDC. De manera preferente, al menos se agrega al menos una proteína o fragmento.

15. Una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótidos y/o secuencia de genes de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica comprende de manera preferente al menos una proteína o fragmento de la misma o una secuencia de nucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable.

16. Un método para inducir la tolerancia específica de antígeno a los autoantígenos en un sujeto humano que padece de o está en riesgo de desarrollar MS que comprende el paso de aplicar al sujeto humano

a) al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5, y/o

b) al menos un portador de acuerdo con cualquiera de las modalidades 8 a 13.

Se prefiere un método para inducir la tolerancia específica de antígeno, en donde se aplica al menos una proteína o fragmento de la misma o un portador que se acopla a la al menos una proteína o fragmento y/o un portador que contiene la secuencia de nucleótido.

17. El método de acuerdo con la modalidad 16, en donde la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes se aplica por administración nasal, inhalada, oral, subcutánea (s.c.), intracoelómica (i.c), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.), transdérmica (t.d.) o intravenosa (i.v.), de manera preferente por i.v., s.c., i.d., t.d., oral, inalada, nasal o acoplada a un portador, de manera preferente un glóbulo rojo.

18. El método de acuerdo con la modalidad 16 o 17 para inducir tolerancia específica de antígeno a autoantígeno en MS temprana.

19. Un método para identificar un sujeto humano adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígeno en MS, de manera preferente MS temprana, que comprende aislar células T y/o anticuerpos de sangre, CSF u otro fluido corporal del sujeto y medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5. Se prefiere particularmente medir la reactividad de las células T y/o anticuerpos contra un fragmento.

20. El fragmento de acuerdo con cualquiera de las modalidades 3 a 5, de manera preferente el fragmento de acuerdo con la modalidad 5, para el uso como un medicamento. El fragmento comprende particularmente una secuencia seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NOs: 10 a 35.

5 21. Uso de la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 en el diagnóstico *in vitro* de MS. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento de la misma.

22. Un método para diagnosticar *in vitro* MS utilizando la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5. Se
10 prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento de la misma.

23. Uso de la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 en la pre-prueba *in vitro* de un sujeto humano diagnosticado con MS o un sujeto humano en riesgo de desarrollar MS. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo.

15 24. Uso de la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de MS. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo.

26. La proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con
20 cualquiera de las modalidades 1 a 5, en donde el derivado es una secuencia de aminoácidos que comparte una homología o identidad sobre su longitud completa con una parte correspondiente de la secuencia de aminoácidos de referencia de al menos 75%, de manera más preferente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

25 26. Un método *in vitro* para identificar un sujeto humano adecuado para inducción de tolerancia inmunitaria a autoantígeno en MS, de manera preferente MS temprana, que comprende medir la reactividad de células T y/o anticuerpos contra la proteína, fragmento, derivado y/o variante de empalme de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5 con las células T previamente obtenidas y/o anticuerpos de sangre, CSF u otro fluido corporal del
30 sujeto. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo.

27. La al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5, y/o la al menos un portador de acuerdo con cualquiera de las modalidades 8 a 13 para el uso en un método para inducir la tolerancia específica de antígeno a los
35 autoantígenos en un sujeto humano que padece de o está en riesgo de desarrollar MS que comprende el paso de aplicar al sujeto humano la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes de acuerdo con

cualquiera de las modalidades 1 a 5, y/o el al menos un portador de acuerdo con cualquiera de las modalidades 8 a 13. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo y/o el al menos un portador acoplado a la proteína o el fragmento de la misma.

28. La al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes de acuerdo con la modalidad 27 y/o el al menos un portador de acuerdo con la modalidad 27, en donde la al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes se aplica por administración nasal, inhalada, oral, subcutánea (s.c.), intracoelómica (i.c), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.), transdérmica (t.d.) o intravenosa (i.v.), de manera preferente por i.v., s.c., i.d., t.d., oral, inalada, nasal o acoplada a un portador, de manera preferente un glóbulo rojo. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo y/o el al menos un portador acoplado a la proteína o el fragmento de la misma.

29. La al menos una proteína, fragmento, derivado, variante de empalme, secuencia de nucleótido y/o secuencia de genes de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 5, y/o el al menos un portador de acuerdo con cualquiera de las modalidades 8 a 13 para inducir tolerancia específica de antígeno a autoantígeno en MS temprana. Se prefiere particularmente utilizar la proteína o fragmento del mismo y/o el al menos un portador acoplado a la proteína o el fragmento de la misma.

20

25

30

35