

CIGB-814, UN NUEVO CANDIDATO TERAPÉUTICO PARA LA ARTRITIS REUMATOIDE, BASADO EN LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA PERIFÉRICA

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

AUTORA PRINCIPAL: María del Carmen Domínguez Horta (1)

OTROS AUTORES: Norailys Pérez Lorenzo (1), Ariana Barberá Betancourt (1), Gabriel Padrón Palomares (1), Viviana Falcón (1), Yuliet Mazola(1), Hilda Garay (1), Ever Pérez (1), Matilde López (1), Vladimir Besada (1), Ana María Torres (2), María Victoria Hernández (2), Isabel Hernández (2), Rafael Gil (2), Dinorah Prada (2), Jorge Gómez (2), Yusimy Reyes (2) Julio Ancizar (1) y Luis Javier González (1)

COLABORADORES: 15

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

(1) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

(2) Centro de Referencia Nacional para las Enfermedades Reumáticas. HCQ 10 de Octubre.

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

María del Carmen Domínguez Horta.

Investigaciones Biomédicas.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Ave. 31 e/ 158 y 190. Cubanacán, Playa, Ciudad Habana P.O Box 6162, Habana 10600, Cuba

Teléfono: 53-7-2716008, Fax: 53-7-2736008

Web: www.cigb.edu.cu

Email: mcarmen.dominguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que afecta el 1% de la población mundial, para la cual no se dispone de un tratamiento eficaz. Nuestro proyecto centra su estrategia en la obtención de nuevos candidatos terapéuticos para la AR, basados en la inducción de tolerancia periférica. En el año 2013 obtuvimos un premio de la ACC, que abarcó el diseño a través de herramientas de la bioinformáticas, de dos péptidos modificados (APLs, del inglés Altered peptide ligand) derivados de la HSP60, un autoantígeno involucrado en la patogénesis de la AR; así como la demostración del efecto terapéutico de estos péptidos en modelos experimentales de AR. Este nuevo trabajo se centra en demostrar las potencialidades terapéuticas de uno de dichos péptidos, denominado CIGB-814.

En este trabajo demostramos por primera vez que: el CIGB-814 induce apoptosis en las PBMC aislados de pacientes con AR, cuando estos están en fase de actividad y no en remisión. Se demuestra que el CIGB-814 induce células T con fenotipo regulador en pacientes con AR,

independientemente del estado clínico de estos y no ejerce este efecto en células aisladas de donantes sanos. Se demuestra que el mecanismo de acción del CIGB-814 no es mediado por los toll-like receptors (TLRs) 2 y 4 y que la respuesta de las células CD4+ (efectoras) al CIGB-814 es mediado por las moléculas HLA clase II. Estos resultados indican la especificidad de acción del CIGB-814 sobre las células T patogénicas. Además, demostramos por primera vez que las células Treg que induce el CIGB-814 tienen una marcada actividad supresora sobre las células T potencialmente patogénicas. Estos resultados son muy importantes porque las Treg con actividad supresora pueden controlar la inflamación crónica e irreversible que caracteriza esta enfermedad. Además, demostramos por primera vez que el CIGB-814 disminuye los niveles de IL-17 en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes. Esta citocina es crucial en la patogénesis de la enfermedad. Se confirma por primera vez a través de análisis histopatológicos el potente efecto terapéutico del CIGB-814 en el modelo de artritis inducida por colágeno, solo o combinado con Metotrexate (medicamento de referencia para la AR). Estos resultados convierten al CIGB-814 en un fuerte candidato terapéutico para la AR. Actualmente, finalizamos la fase I de la investigación clínica con resultados promisorios y estamos en la preparación de la SAEC al CECMED.

Los resultados están avalados por 3 publicaciones internacionales, 8 participaciones en eventos internacionales, una Tesis de doctorado, una de Maestría y cuatro de Diplomas, dos logros Institucionales del CIGB.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta al 1% de la población mundial con un índice mujer/hombre de 3:1. Esta enfermedad transita por estadios de actividad y de remisión. Durante las etapas de actividad clínica en los pacientes se produce una marcada inflamación, mediada por componentes del sistema inmunológico que contribuyen progresivamente a la erosión del cartílago y los huesos de las articulaciones periféricas. Esto genera una marcada discapacidad en dichos pacientes (1).

Los fármacos anti-citocinas como los anti-TNF α constituyen hasta el momento la alternativa de mayor éxito para el tratamiento de la AR (2). Pero estas terapias tienen un conjunto de limitaciones entre las cuales destaca que cerca del 50% de los pacientes no responden a este tipo de terapia (3) y provocan en muchos pacientes una alta susceptibilidad a contraer infecciones y neoplasias (4,5).

El desarrollo de variantes terapéuticas que puedan eliminar específicamente células T patogénicas, las cuales median las etapas de actividad clínica, sin provocar una inmunosupresión generalizada constituye un reto en la actualidad. Esto ha llevado en los últimos años a diversos grupos de investigadores a retomar el uso de las estrategias antígeno-específicas para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, con el objetivo de regular la respuesta inmune, no de suprimirla (6,7,8). La inducción de tolerancia periférica a través del uso de autoantígenos involucrados en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes constituye una alternativa para este propósito. Este trabajo se enmarca en este contexto.

La selección del autoantígeno en cuestión representa un punto crucial para el desarrollo de este concepto terapéutico. Nosotros seleccionamos la proteína de estrés celular de 60 kDa (HSP60- del inglés "heat shock protein 60"), la cual es considerada un autoantígeno para la AR y otras enfermedades autoinmunes (9). A partir de la HSP60 se han identificado varios epitopos que pueden inducir clones de células T

reguladoras (Treg) en determinadas condiciones como los procesos inflamatorios (10,11).

Además de péptidos que contienen epitopos originales de autoantígenos como inductores de tolerancia periférica, este concepto terapéutico ha sido abordado en modelos experimentales con ligandos peptídicos modificados (APL-del inglés "altered peptide ligand") (12,13,14,15,16). Los APLs son análogos de los péptidos inmunogénicos de los cuales se derivan. Generalmente presentan una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el TcR o con las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad, que interfieren la cascada de eventos intracelulares para la activación de las células T (17). Se ha descrito que los APLs pueden bloquear o atenuar la respuesta de las células T auto-reactivas por diferentes mecanismos como: anergia, el cambio en el patrón de citocinas y la inducción de Treg (18,19,20,21). A partir de estos antecedentes, nos propusimos diseñar y evaluar nuevos APLs derivados de la HSP60 como candidatos terapéuticos para la AR.

En el año 2013 obtuvimos un premio de la ACC, que abarcó el diseño a través de herramientas de la bioinformáticas, de dos péptidos modificados APLs, derivados de la HSP60 y la demostración del efecto terapéutico de estos péptidos en modelos experimentales de AR.

Esta nueva propuesta profundizamos en las potencialidades terapéuticas de uno de dichos péptidos, denominado CIGB-814 (el cual aparece con el código APL-1 en los artículos). En este trabajo demostramos por primera vez elementos relacionados con el mecanismo de acción de este péptido, así como efectos moleculares y celulares que lo convierten en un atractivo candidato terapéutico para la AR.

El CIGB-814 disminuye la viabilidad de los PMBC de pacientes con AR cuando estos están en fase de actividad y no en remisión

Con el objetivo de evaluar los efectos que tiene el CIGB-814 sobre las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de los pacientes con AR, realizamos la extracción de estas células de 24 pacientes, 12 de los cuales estaban en fase de actividad de la enfermedad (moderada o severa) y 12 pacientes estaban en remisión. La evaluación clínica de la enfermedad se realizó de acuerdo al criterio del colegio europeo de reumatología (DAS-28) (22). Las células de los pacientes fueron estimuladas con el CIGB-814 o el péptido original (E-18-3, control) *in vitro* durante 24 horas. Posteriormente se analizó la viabilidad de las mismas a través del ensayo colorimétrico con MTS (23). El péptido CIGB-814 disminuyó significativamente la viabilidad de estas células, cuando las mismas procedían de los pacientes que presentaban actividad clínica de la enfermedad. Sin embargo, no afectó la viabilidad de las células cuando estas procedían de pacientes que estaban en una etapa de remisión. Además, se realizó el análisis con las PBMC de un paciente, cuando estaba en fase de actividad y cuando estaba en remisión. En este caso, el CIGB-814 afectó la viabilidad de las células cuando este paciente estaba en fase de actividad clínica. Por su parte, el péptido original E-18-3 (del cual se deriva el CIGB-814), no modificó la viabilidad de las células en ninguna condición (24).

Estos resultados indican que el CIGB-814 disminuye la viabilidad de los PMBC de pacientes con AR cuando estos están en fase de actividad clínica de la enfermedad y no en remisión.

El CIGB-814 induce apoptosis en las PMBC aisladas de pacientes con AR cuando estos están en fase de actividad y no en remisión

Con el propósito de investigar si la disminución de la viabilidad inducida por el CIGB-814 en PMBC aisladas de pacientes con AR (en fase de actividad) pudiera ser mediada por apoptosis, tres muestras de células estimuladas con el CIGB-814, provenientes de tres pacientes con AR fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión. Se encontraron los rasgos morfológicos característicos de las células en apoptosis como la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la presencia de cuerpos apoptóticos (24).

El conjunto de estos resultados indican que el CIGB-814 induce selectivamente apoptosis en las PMBC de pacientes con AR cuando estos están en fase de actividad y no en remisión.

El CIGB-814 induce células T reguladoras con fenotipo CD4+ CD25^{high}Foxp3+ en pacientes con AR, independientemente del estadio clínico del paciente y no tiene este efecto sobre células aisladas de personas sanas

En un trabajo previo habíamos comprobado que el CIGB-814 induce un incremento significativo de las células T reguladoras con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ (Treg) en ensayos ex vivo con PMBC aisladas de pacientes con artritis reumatoide (25).

Tomando en consideración que el CIGB-814 induce apoptosis solo en las células de los pacientes que están en actividad. En este trabajo nos propusimos analizar si la inducción de las Treg que provoca el CIGB-814 está asociada con el estadio clínico de los pacientes al transitar por fases de actividad clínica/ remisión. Para este experimento, se utilizaron PMBC aisladas de 16 pacientes con AR, 8 pacientes en fase de actividad y 8 en remisión. Además, utilizamos PMBC aislados de 10 donantes sanos como controles. Las células se estimularon durante cinco días con los péptidos CIGB-814 o el péptido original. Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales para la identificación de Treg humanas y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados demostraron que el CIGB-814 induce incrementos significativos en el porcentaje de Treg en los cultivos de las PMBC aislados de pacientes con AR, independientemente del estadio clínico de los mismos. Sin embargo en este trabajo demostramos que el CIGB-814 no induce Treg en estos ensayos, cuando las PMBC provienen de donantes sanos (24). Estos resultados indican que los efectos que induce el CIGB-814 están asociados con la AR.

Por lo tanto, la obtención de un péptido que induzca Treg en pacientes con AR tiene potencialidades terapéuticas excelentes para esta enfermedad.

El CIGB-814 aumenta la actividad supresora de las Treg que induce

En este trabajo demostramos en cocultivos realizados entre células T CD4+ (efectoras) y Treg aisladas de pacientes con AR, que el CIGB-814 aumenta significativa la actividad supresora de las Treg (26). **Estos resultados son muy promisorios por el rol fisiológico que ejercen las Treg en el control de la inflamación y en la restauración de la tolerancia periférica (27)**

El CIGB-814 reduce la secreción de la IL-17 en ensayos ex vivo con PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide

Con el objetivo de estudiar si el CIGB-814 modificaba los niveles de las citocinas pro-inflamatorias y reguladoras en el sobrenadante de cultivos de los ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con AR, aislamos dichas células de 10 pacientes con AR y se estimularon durante 96 horas con el CIGB-814. Posteriormente, se cuantificaron las citocinas TNF- α , IL-17 e IL-10 de forma directa a través de un ensayo tipo ELISA, en el sobrenadante de estos cultivos. El CIGB-814 disminuyó significativamente los niveles de la IL-17 y no modificó los niveles del resto de las citocinas evaluadas (26).

El hecho de que el CIGB-814 inhiba la IL-17 tiene una importancia crucial, ya que actualmente se considera que las TH17 son las principales inductoras de las enfermedades autoinmunes (28). Específicamente en la AR, se ha encontrado que la expresión de la IL-17 esta elevada en las articulaciones periféricas y se asocia marcadamente con el daño radiológico (29)

El efecto del CIGB-814 sobre las células CD4+ no es mediada por los TLRs 2 y 4 y si por el reconocimiento en el contexto HLA-DR

Los receptores de la superficie celular como receptores tipo Toll (TLRs) podrían aumentar su número en pacientes con actividad en comparación con los pacientes en fase de remisión, debido a los niveles de los mediadores de la inflamación. En particular, se ha informado en la literatura que los TLR2 y TLR4 interactúan con la HSP60 (30). Otros autores sugieren que la activación de estos TLRs podría mejorar la función de las Treg (31). Con el objetivo de evaluar si el CIGB-814 podría desencadenar las vías de señalización mediadas por los TLR2 o TLR4, se estimularon con dicho péptido dos líneas de células HEK 293 *in vitro*, que expresan en su superficie los receptores TLR2 o TLR4. En estas células, cuando se activan estos receptores aumentan los niveles del factor transcripcional NF κ B. El CIGB-814 no fue capaz de estimular los TLR2 o TLR4 en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, parece poco probable que el CIGB-814 tenga algún efecto biológico sobre PBMCs de pacientes con AR a través de las vías de señalización TLR2 o TLR4

Sin embargo, comprobamos a través de un experimento *in vitro* con células T CD4+ aisladas de pacientes con AR, que la respuesta de estas células al CIGB-814 es mediada a través de su reconocimiento en el contexto de las moléculas HLA-DR (24). Estos resultados representan la primera evidencia experimental que el CIGB-814 es presentado por las APC a las células T CD4+, a través del su TcR.

El CIGB-814 disminuye significativamente la inflamación y los daños histopatológicos en el modelo de artritis inducida por adyuvante

Previamente habíamos comprobado el efecto terapéutico de CIGB-814 en un modelo para AR, en ratas Lewis (25).

En este trabajo confirmamos el potente efecto terapéutico del CIGB-814 en otro modelo animal, en este caso el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC). Este modelo reúne una serie de características que lo convierten en el modelo de referencia para los estudios de AR (32).

El efecto terapéutico del APL1 en este modelo se comparó con el Metotrexato (MTX), que es el medicamento de primera línea para el tratamiento de la AR (33).

Confirmamos que el CIGB-814 solo o combinado con el MTX provocó una reducción significativa de los signos clínicos de la artritis. Además, comprobamos mediante un exhaustivo análisis histopatológico, que los ratones tratados con el CIGB-814 y/o el MTX presentaron daños histopatológicos articulares muy leves.

El TNF α está también involucrado en la patogénesis de este modelo. En este ensayo se cuantificaron los niveles de esta citocina en el suero de cuatro animales. El tratamiento con el CIGB-814 disminuyó significativamente los niveles de TNF α con relación al grupo placebo (34).

El conjunto de resultados alcanzados en este trabajo han contribuido a sustentar el posible uso en la práctica médica del CIGB-814 para la AR. Este año, finalizamos la fase I de la investigación clínica con resultados promisorios y demostramos la seguridad del CIGB-814. En estos momentos estamos preparando la SAEC al CECMED para ejecutar un ensayo clínico fase II.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

¹ **Sokka T y col.** (2009). Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res.Ther.*11: R7.

² **Van Vollenhoven RF** (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5: 531–541.

³ **Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R y col.** (2006) The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 54: 26-37.

⁴ **Kooloos WM, de Jong DJ, Huizinga TWJ and Guchelaar HJ** (2007). Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Drug Discovery Today* 12: 125-31.

⁵ **Welsing PM, Severens JL, Hartman M, van Riel PL y Laan RF** (2004). Modeling the 5-years cost effectiveness of treatment strategies including tumor necrosis factor-blocking agents and leflunomide for treating rheumatoid arthritis in the Netherlands. *Arthritis Rheum* 51:964-973.

⁶ **Kobayashi M y col** (2007). Altered B:9-23 insulin, when administered intradermally with cholera toxin adjuvant, suppresses the expression of insulin autoantibodies and prevents diabetes. *J.Immunol* 179:2082-88.

⁷ **Satpute S R, Durai M, y Moudgil K D** (2008). Antigen-specific tolerogenic and immunomodulatory strategies for the treatment of autoimmune arthritis. *Semin.Arthritis Rheum.* 38:195-207.

⁸ **Koffeman EC y col.** (2009). Epitopo-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum.* 60: 3207-16.

- ⁹ **Rajaiah R y Moudgil KD.** (2008). Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmun Rev* 8: 388-93.
- ¹⁰ **Cohen IR, Quintana FJ y Mimran A** (2004). T regs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114:1227-1232.
- ¹¹ **Van Eden W, van der Zee R y Prakken B.** (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318-330.
- ¹² **Ohnishi Y y col.** (2006). Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from rheumatoid arthritis patients. *Mod.Rheumatol* 16: 226-28.
- ¹³ **Mantzourani E. D y col.** (2006). A putative bioactive conformation for the altered peptide ligand of myelin basic protein and inhibitor of experimental autoimmune encephalomyelitis [Arg91, Ala96] MBP87-99. *J.Mol.Graph.Model.* 25: 17-29.
- ¹⁴ **Ben David H y col.** (2007). A dual altered peptide ligand inhibits myasthenia gravis associated responses by inducing phosphorylated extracellular-regulated kinase 1,2 that upregulates CD4+CD25+Foxp3+ cells. *Scand.J.Immunol.* 65: 567-76.
- ¹⁵ **Li R., Li X y Li Z** (2009). Altered collagen II 263-272 peptide immunization induces inhibition of collagen-induced arthritis through a shift toward Th2-type response. *Tissue Antigens* 73: 341-47.
- ¹⁶ **Wakamatsu E y col.** (2009). Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod.Rheumatol* 19: 366-71.
- ¹⁷ **Bielekova B y Martin R.** (2001). Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med.* 79: 552-565.
- ¹⁸ **Brogdon J, Leintenberg D y Bottomly K** (2002). The potency of TCR signaling differentially regulates NFATc/p activity and early IL-4 transcription in naïve CD4+ T cells. *The Journal of Immunol* 168: 3825-3832.
- ¹⁹ **Paas-Rozner M, Sela M y Mozes E.** (2003). A dual altered peptide ligand down-regulates myasthenogenic T cell responses by up-regulating CD25- and CTLA-4-expressing CD4 + T cells. *PANS* 100: 6676 -81
- ²⁰ **Ben-David H, Sela M, Mozes E** (2005). Down-regulation of myasthenogenic T cell response by a dual altered peptide ligand via CD4+CD25+-regulated events leading to apoptosis. *PNAS* 102: 2028:2033.
- ²¹ **Zhao J, Li R, He J, Shi J, Long L y Li Z** (2008). Mucosal administration of an altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulatory T cells. *International Rheumatol* 29:9-16.
- ²² **Prevo MLL, van't Hof MA, Kupper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LBA, van Riel PLCM.** Modified disease activity scores that include twenty eight joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38 (1): 44-8.

23 **Denizot F., Lang R.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277

24 **Barberá A, Lorenzo N, Garrido G, Mazola Y, Falcón V, Torres AM and MC Domínguez .** APL-1, an altered peptide ligand derived from human heat-shock protein 60, selectively induces apoptosis in activated CD4+CD25+ T cells from peripheral blood of rheumatoid arthritis patients.. *International Immunopharmacology* 2013;17 (4): 1075-1083

25 **Domínguez MC, Lorenzo N, Barberá A, Darrasse-Jeze G, López N, Hernández MV, et al.** An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant induced arthritis. *Autoimmunity* 2011; 44 (6): 471-82

26 **Ariana Barberá, Noraylis Lorenzo, Peter van Kooten, Joel van Roon, Wilco de Jager, Dinorah Prada, Jorge Gómez, Gabriel Padrón, Willem van Eden, Femke Broere and María del Carmen Domínguez.** APL-1, an altered peptide ligand derived from human heat-shock protein 60, induces selective activation of nTreg which suppress CD4+ effector T cells from rheumatoid arthritis patients.. *Cell Stress and Chaperones* DOI 10.1007/s12192-016-0698-0 (May, 2016)

27 **Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T y Ono M** (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133: 775-787

28 **Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK y O'Brien RL.** (2008). gammadelta T cells: An important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 20:353–7.

29 **Korn T, Oukka M, Kuchroo V y Bettelli E.** (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19:362–71.

[30] **Dai J, Liu B and Li Z.** Regulatory T cells and Toll-like receptors: What is the missing link? *Int Immunopharmacol.* 2009 May; 9(5): 528–33.

[31] **Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR.** Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2022-32.

32 **Asquito DL y col** (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol* 39: 2040-44.

33 **Kinder A. J, Hassell A B, Brand J, Brownfield A, Grove M y Shadforth M F.** (2005) The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology* 44:61–66

34 **Norailys Lorenzo, Fiorella Altruda, Lorenzo Silengo and María del Carmen Domínguez.** APL-1, an altered peptide ligand derived from heat shock protein, alone or combined with methotrexate attenuates murine collagen induced arthritis . Norailys Lorenzo, Fiorella Altruda, Lorenzo Silengo and María del Carmen Domínguez. *Clin Exp Med* (First Online: 09 May 2016, DOI: 10.1007/s10238-016-0412-7) *Clin Exp Med* (First Online: 09 May 2016, DOI: 10.1007/s10238-016-0412-7)

