

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 234**

51 Int. Cl.:

A01K 67/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015 PCT/IB2015/059942**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16103213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015 E 15823811 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3236746**

54 Título: **Composición**

30 Prioridad:

24.12.2014 GB 201423171

16.11.2015 GB 201520190

16.11.2015 GB 201520196

16.11.2015 GB 201520199

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2025

73 Titular/es:

WORG PHARMACEUTICALS (ZHEJIANG) CO., LTD. (100.00%)

**Room 215, Building 2198 Bandaozhonglu
RoadDipu StreetAnji County
Huzhou, Zhejiang, CN**

72 Inventor/es:

**JANSSON, LOTTA;
MARTIN, KEITH;
WRAITH, DAVID;
JAHRAUS, ANDREA y
VROLIX, KATHLEEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 996 234 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende péptidos derivados del receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR). La composición o los péptidos pueden ser útiles en la prevención y/o supresión de la producción de autoanticuerpos contra TSHR, lo que es útil en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Graves.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Graves es una enfermedad autoinmunitaria que afecta al tiroides. Se caracteriza por una glándula tiroidea hiperactiva, lo que da como resultado la producción de una cantidad excesiva de hormona tiroidea y el agrandamiento de la glándula tiroidea (bocio). El estado resultante de hipertiroidismo puede causar una amplia gama de síntomas neuropsicológicos y físicos. La enfermedad de Graves es la causa más común de hipertiroidismo (60-90 % de todos los casos) y habitualmente se presenta por sí misma durante la mediana edad, pero también aparece en niños, adolescentes y ancianos. Afecta hasta al 2 % de la población femenina y es entre cinco y diez veces más
15 común en mujeres que en hombres. La enfermedad de Graves pediátrica afecta a aproximadamente 6.000 niños en los Estados Unidos (EE. UU.) y 6.000 en la Unión Europea (UE). La enfermedad de Graves también es la causa más común de hipertiroidismo grave, que está acompañado por más signos y síntomas clínicos y anomalías de laboratorio en comparación con formas más leves de hipertiroidismo.

20 Existe un fuerte componente hereditario relacionado con la enfermedad de Graves. No existen estudios de población recientes sobre la enfermedad de Graves, sin embargo, existen unos pocos estudios casi de población sobre el hipertiroidismo y, por lo tanto, todas las estimaciones de la incidencia y prevalencia de la enfermedad de Graves son aproximadas. La incidencia de hipertiroidismo varía de 26:100.000 a 93:100.000 y se estima que la prevalencia global es del 1,3 %, siendo el 40 % de los casos manifiestos y el 60 % subclínicos.

25 Aproximadamente el 30-50 % de las personas con enfermedad de Graves también padecerán oftalmopatía de Graves (también conocida como orbitopatía de Graves o enfermedad ocular tiroidea) (GO), una protrusión de uno o ambos ojos. Muchos casos de GO son leves y autolimitantes, sin embargo, el 20 % de los casos tienen una enfermedad de significativa/moderada a grave, requiriendo al menos la mitad de estos esteroides y el 3-5 % de los pacientes con GO tienen una enfermedad dolorosa y amenazante para la vista con neuropatía óptica distiroidea. La proptosis ocular puede provocar una sequedad grave de la córnea ya que los párpados no pueden cerrarse por la noche. El aumento
30 de presión sobre el nervio óptico puede conducir a defectos del campo visual y pérdida de visión. La GO también puede estar asociada con mixedema pretibial.

35 Los síntomas y signos de la enfermedad de Graves prácticamente resultan todos de los efectos directos e indirectos del hipertiroidismo, siendo las principales excepciones GO, bocio y mixedema pretibial. Los síntomas de hipertiroidismo pueden incluir insomnio, temblor de manos, hiperactividad, pérdida de cabello, sudoración excesiva, intolerancia al calor y pérdida de peso a pesar del aumento del apetito. Más comúnmente, los signos adicionales son tiroides sin dolor a la palpación agrandada de manera difusa (habitualmente simétrica), asinergia oculopalpebral, lagrimación excesiva debida a GO, arritmias del corazón e hipertensión. Los pacientes tirotóxicos pueden experimentar cambios en el comportamiento y en la personalidad, tales como psicosis, agitación y depresión. En hipertiroidismo más leve, los pacientes pueden experimentar manifestaciones menos manifiestas, por ejemplo ansiedad, inquietud,
40 irritabilidad e inestabilidad emocional.

45 Actualmente, no hay cura disponible para la enfermedad de Graves y los tratamientos actuales se dirigen, por lo tanto, a los síntomas que se presentan. Existen tres modalidades de tratamiento para la enfermedad de Graves, fármacos antitiroideos orales (ATD), yodo radiactivo (RAI) y tiroidectomía. Los dos últimos enfoques dan como resultado la suplementación durante toda la vida de hormonas tiroideas. La terapia con RAI es el tratamiento más común en los Estados Unidos, mientras que los ATD son el tratamiento de primera línea en Europa, Japón y la mayor parte del resto del mundo.

La terapia de ATD está asociada con algunos efectos secundarios raros y tiene una tasa de remisión del 50-60 %. Existe un reconocimiento creciente de que el RAI puede precipitar o empeorar la GO activa y el número de pacientes tratados con ATD en los Estados Unidos está aumentando.

50 Debido al éxito variable de cada opción de tratamiento, los pacientes a menudo se someten a más de un enfoque si el primer intento de tratamiento no resulta completamente exitoso. El riesgo de recaída o de hipotiroidismo posterior es sustancial y la eficacia general de los tratamientos disponibles para la enfermedad de Graves es menor que la deseada.

55 El desarrollo de terapias alternativas para la enfermedad de Graves se ha visto obstaculizado por una falta de modelos relevantes, en particular modelos animales, para evaluar la eficacia potencial de las terapias candidatas. Los modelos de ratón BALB/c conocidos para la enfermedad de Graves no se han sometido a prueba para determinar su eficacia con fármacos aprobados para la enfermedad de Graves, tales como metimazol y metilprednisolona.

Por lo tanto, existe la necesidad de terapias alternativas para tratar y prevenir enfermedades asociadas con la producción de autoanticuerpos contra TSHR, tales como enfermedad de Graves. Por tanto, se necesitan terapias alternativas que sean eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Graves y en el alivio o la reducción de los síntomas de la enfermedad. También existe la necesidad de modelos alternativos para evaluar la eficacia potencial de las terapias candidatas para la enfermedad de Graves.

El documento WO 2015/019302 A2 describe un péptido al menos parcialmente derivable de TSHR humano, péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC *in vitro* y que se presenta a una célula T sin procesamiento de antígeno adicional.

El documento WO 03/018632 dio a conocer regiones epitópicas de un receptor de tirotropina (TSH), usos de las mismas y anticuerpos contra las mismas.

El documento WO 2007/057778 dio a conocer polipéptidos recombinantes y métodos para detectar y/o cuantificar autoanticuerpos contra el receptor de TSH.

Inaba *et al.* (Inaba *et al.* 2009 Thyroid 19(11), 1271-1280) investigaron la respuesta inmunitaria de ratones transgénicos para el antígeno leucocitario de histocompatibilidad humano-DR al dominio extracelular del receptor de tirotropina humano.

Muehlberg *et al.* (Muehlberg *et al.* 2004 Endocrinology 145(4), 1539-1545) investigaron la dinámica de anticuerpos estimulantes y bloqueantes de la tiroides contra el receptor de tirotropina en un modelo murino de enfermedad de Graves.

Sanders *et al.* (Sanders *et al.* 2011 Journal of Molecular Endocrinology 46, 81-99) resolvieron la estructura cristalina del receptor de TSH (TSHR) unido a un autoanticuerpo contra TSHR de tipo bloqueante.

Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han descubierto que un "cóctel" de dos péptidos de TSHR es particularmente eficaz en la supresión o prevención de la producción de autoanticuerpos contra TSHR *in vivo* y en el tratamiento de la enfermedad de Graves.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende los siguientes péptidos de TSHR:

(i) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KKKKYVSDVTLQQLESHK (SEQ ID NO: 1); y

(ii) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 2); y

(iii) un agente antitiroideo y/o un β -bloqueante.

KKKKYVSDVTLQQLESHK (SEQ ID NO: 1) también se denomina RNB-5D-K1 en el presente documento. GLKMFPDLTKVYST (SEQ ID NO: 2) también se denomina RNB-9B en el presente documento.

La composición según la invención puede usarse en los aspectos terapéuticos de la invención descrita en el presente documento.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona la composición de la invención como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con la producción de autoanticuerpos contra TSHR en un sujeto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona la composición de la invención como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Graves en un sujeto.

En un aspecto, la composición no incluye ni comprende el siguiente péptido:

RNB-4K-GKK: KKGNLPNISRIYVSDVTGKK

Una composición peptídica según la invención puede comprender las secuencias de aminoácidos según la invención como se describe en el presente documento. En un aspecto, la composición peptídica comprende solo las secuencias de aminoácidos según la invención como se describe en el presente documento.

El sujeto puede expresar HLA-DR3. El sujeto puede expresar HLA-DR4.

Los péptidos de la invención como se define en el presente documento, o la composición de la invención, pueden administrarse siguiendo un protocolo de aumento de la dosis.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende los siguientes péptidos de TSHR en recipientes separados:

- (i) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KKKKYVSDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 1); y
- 5 (ii) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID NO: 2); y
- (iii) un agente antitiroideo y/o un β -bloqueante.

El kit puede ser para el tratamiento o la prevención de una afección que implica la producción de autoanticuerpos contra TSHR, tal como la enfermedad de Graves.

- 10 En algunos aspectos, el kit es para su uso en la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Graves.

Los péptidos se combinan con un fármaco antitiroideo, o un β -bloqueante.

Descripción de las figuras

Figura 1-El tratamiento con 5D-K1 reduce la proliferación inducida por TSHR en ratones DR3tg

- 15 Se pretrataron ratones DR3tg con 5D-K1 (GLS) o control (péptido de unión a HLA-DR3; GLS) (n=10/grupo) según el programa de aumento de la dosis con 100 μ g de dosis máxima. Los animales recibieron una inmunización de 50 μ g de 5D (GLS) en CFA y después de 10 días, se recogieron LN y bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los valores del índice de estimulación (SI) para los ratones tratados con control (líneas rojas) y los ratones tratados con péptido (líneas azules). Se usó ANOVA de dos vías
- 20 para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001). El porcentaje promedio de reducción en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptido se muestra en el gráfico. SI, índice de estimulación; LN; ganglios linfáticos.

Figura 2 - El tratamiento con 9B-N reduce la proliferación inducida por TSHR en ratones DR3tg.

- 25 Se pretrataron ratones DR3tg con 9B-N (PPL) o PBS (n=10/grupo) según el programa de aumento de la dosis con 33 μ g de dosis máxima. Los animales recibieron una inmunización de 50 μ g de 9B (GLS) en CFA y después de 10 días, se recogieron LN y bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los valores del índice de estimulación (SI) para los ratones tratados con control (líneas rojas) y los ratones tratados con péptido (líneas azules). Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos
- 30 globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001). El porcentaje promedio de reducción en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptido se muestra en el gráfico. SI, índice de estimulación; LN; ganglios linfáticos.

Figura 3-El tratamiento con ATX-GD-59 reduce la proliferación inducida por TSHR en ratones DR3tg

- 35 Se pretrataron ratones DR3tg con ATX-GD-59 (PPL) o péptido de control de HIP-15F-GKK (GLS) (n=10/grupo) según el programa de aumento de la dosis con dosis máxima de 15 nmol para cada péptido. Los animales recibieron una inmunización de 30 nmol de cada péptido parental 5D (Severn) y 9B (PPL) en CFA y después de 10 días, se recogieron LN y bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los valores del índice de estimulación (SI) para los ratones tratados con control (líneas rojas) y los
- 40 ratones tratados con péptido (líneas azules). Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001). El porcentaje promedio de reducción en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptido se muestra en el gráfico. SI, índice de estimulación; LN; ganglios linfáticos. Los datos son representativos para 2
- 45 experimentos independientes.

Figura 4-El tratamiento con ATX-GD-59 reduce la proliferación de esplenocitos específica de TSHR en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR

- 50 A ratones DR3tg (n=11/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 22,5 pmol, 225 pmol y 2250 pmol de ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 22,5 nmol/péptido de ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 1010 Ad-TSHR o Ad-LacZ en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 21). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización y se recogieron los bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los recuentos absolutos por minuto (cpm; gráfico izquierdo) o los valores del índice de

estimulación (SI; gráfico derecho) para los ratones tratados con control (líneas rojas) y los ratones tratados con péptido (líneas azules). Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). El porcentaje promedio global de reducción en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptido se muestra en el gráfico. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Figura 5-El tratamiento profiláctico con ATX-GD-59 reduce el nivel de anticuerpos anti-TSHR

A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 22,5 pmol, 225 pmol y 2250 pmol de ATX-GD-59 (n=11) o tratamiento de control (n=11) los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 22,5 nmol de cada péptido en ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 10¹⁰ Ad-TSHR o Ad-LacZ (n=7) en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 21). Se recogió sangre antes del tratamiento y antes y 2 y 5 semanas después de la primera inmunización para medir los niveles de IgG total anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se indican el promedio del grupo $\pm$ SEM. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Figura 6-El tratamiento profiláctico con ATX-GD-59 reduce diferentes niveles de isotipo de anticuerpos anti-TSHR

A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 22,5 pmol, 225 pmol y 2250 pmol de ATX-GD-59 (n=11) o tratamiento de control (n=11) los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 22,5 nmol de cada péptido en ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, a los ratones se les inyectó por vía intramuscular 10¹⁰ Ad-TSHR o Ad-LacZ (n=7) en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). Se recogió sangre antes del tratamiento y antes y 2 y 5 semanas después de la primera inmunización; se midieron los niveles de IgG de isotipo anti-TSHR en la semana 2 mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se indican el promedio del grupo $\pm$ SEM. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Figura 7-Incidencia de anticuerpos anti-TSHR estimuladores en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR

A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 22,5 pmol, 225 pmol y 2250 pmol de ATX-GD-59 (n=11) o tratamiento de control (n=11) los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 22,5 nmol de cada péptido en ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 10¹⁰ Ad-TSHR o Ad-LacZ (n=7) en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). Se recogió suero 5 semanas después de la primera inmunización y se analizó en el ensayo de células CHO. Cada punto representa los datos de un ratón en la semana 5 y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó la prueba de Mann-Whitney para medir las diferencias en los niveles de anticuerpos contra TSHR estimuladores y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los resultados son representativos para más de 3 experimentos independientes. RLU, unidades de luz relativas (emisión de luz de células estimuladas/emisión de luz de células no estimuladas).

Figura 8-Visión general esquemática del estudio de medicación conjunta de MMI y ATX-GD-459

A los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo o metimazol mediante una bomba osmótica implantada por vía subcutánea. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 10⁹ partículas de Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). Se recogió sangre a las 2 semanas e inmediatamente antes del tratamiento y después 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización. El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre, tiroides y bazo.

Figura 9-Visión general esquemática del estudio de medicación conjunta con propranolol y ATX-GD-459

A los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo o propranolol mediante inyecciones intraperitoneales diarias. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 10¹⁰ partículas de Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). Se recogió sangre 2 semanas e inmediatamente antes del tratamiento y después 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización. El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre, tiroides y bazo.

Figura 10-Proliferación de esplenocitos específica de TSHR en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR

A ratones DR3tg (n = 7-10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de ATXGD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo (símbolos completos) o MMI (símbolos abiertos) por medio de bombas osmóticas implantadas por vía subcutánea. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 109 Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización y se recogieron los bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de recuentos absolutos por minuto (cpm; gráfico izquierdo), valores del índice de estimulación (SI; gráfico del medio) o recuentos corregidos (Δ ppm; gráfico derecho). Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y se usó una prueba post-hoc de Bonferroni. En el texto se describen diferencias significativas.

Figura 11-El tratamiento con-ATX-GD-459 pero no con MMI reduce los niveles de anticuerpos IgG anti-TSHR

A ratones DR3tg (n=7-10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron vehículo o tratamiento con MMI por medio de una bomba osmótica implantada por vía subcutánea. Después, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

Figura 12-El tratamiento con ATX-GD-459 pero no con MMI reduce los niveles de anticuerpos IgG2b e IgG2c anti-TSHR

A ratones DR3tg (n=7-10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron vehículo o tratamiento con MMI por medio de una bomba osmótica implantada por vía subcutánea. Después, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del inicio del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón medidos en la semana 2 y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG1, IgG2b e IgG2c anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

Figura 13-El tratamiento con MMI reduce significativamente los niveles séricos de T4

A ratones DR3tg (n=7-10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron vehículo o tratamiento con MMI por medio de una bomba osmótica implantada por vía subcutánea. Después, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de T4 por ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón medidos en la semana 5 y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de T4. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

Figura 14-Proliferación de esplenocitos específica de TSHR en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR

A ratones DR3tg (n=10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de ATXGD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo (símbolos rellenos) o propanolol (símbolos abiertos) mediante inyecciones intraperitoneales diarias. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 1010 Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización y se recogieron los bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de recuentos absolutos por minuto (cpm; gráfico izquierdo),

valores del índice de estimulación (SI; gráfico del medio) o recuentos corregidos (Δ ppm; gráfico derecho). Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y se usó una prueba post-hoc de Bonferroni. En el texto se describen diferencias significativas.

Figura 15-El tratamiento con ATX-GD-459 pero no con propanolol reduce los niveles de anticuerpos IgG anti-TSHR

- 5 A ratones DR3tg ($n=10$ /grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de ATXGD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo (símbolos rellenos) o propanolol (símbolos abiertos) por medio de inyecciones intraperitoneales diarias. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 1010 Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

Figura 16-El tratamiento con ATX-GD-459 pero no con propanolol reduce los niveles de anticuerpos IgG2b e IgG2c anti-TSHR

- 20 A ratones DR3tg ($n=10$ /grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de ATXGD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo (símbolos rellenos) o propanolol (símbolos abiertos) mediante inyecciones intraperitoneales diarias. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 1010 Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG1, IgG2b e IgG2c anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

Figura 17-Los niveles totales de T4 no se ven afectados por el tratamiento con propanolol o ATX-GD-459

- 30 A ratones DR3tg ($n=10$ /grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de ATXGD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Empezando el día -15, los ratones también recibieron tratamiento con vehículo (símbolos rellenos) o propanolol (símbolos abiertos) mediante inyecciones intraperitoneales diarias. Después, se les inyectó por vía intramuscular a los ratones 1010 Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). El experimento se terminó 5 semanas después de la primera inmunización. Se recogió sangre antes del tratamiento y antes, 2, 4 y 5 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón medidos en la semana 5 y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de T4. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y las diferencias significativas, si las hay, se indican en los gráficos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$).

Figura 18-Los niveles plasmáticos de propanolol confirman la dosis farmacológica

El nivel de propanolol plasmático se sometió a ensayo en ratones y ratones de control a los que se habían administrado péptidos y propanolol. El plasma se sometió a prueba en las semanas 0 y 5 y se muestran los resultados.

Figura 19-Protocolo esquemático de tolerización de células T

- 45 A los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g de péptido los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones en la dosis máxima de péptido (péptido individual ATX-GD-459 o cóctel) los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Las dosis máximas, y correspondientemente las dosis de aumento de la dosis, pueden diferir entre experimentos. El día 0, los ratones se inmunizan por vía subcutánea en la base de la cola con péptido emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). El experimento se termina 10 días después de la inmunización para medir la proliferación de células de ganglios linfáticos (GL) y esplenocitos tras la reestimulación con TSHR o péptidos.

Figura 20-El tratamiento con ATX-GD-459 reduce eficazmente la proliferación inducida por TSHR en ratones HLA-DR3

- 55 (A) Se pretrataron ratones HLA-DR4 con RNB-4K-GKK o PBS ($n=10$ /grupo) según el programa de aumento de la dosis con 100 μ g de dosis máxima; (B) se pretrataron ratones HLA-DR3 con RNB-5D-K1 o HIP-16E (péptido de control de unión a HLA-DR3) ($n=10$ /grupo) según el programa de aumento de la dosis con 100 μ g de dosis máxima; (C) se

pretrataron ratones HLA-DR3 con RNB-9B o PBS (n=10/grupo) según el programa de aumento de la dosis con 33 µg de dosis máxima. Los animales recibieron una inmunización de péptido parental en CFA y después de 10 días, se recogieron LN y bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media ± error estándar de la media (SEM) de los valores del índice de estimulación (SI) para los ratones tratados con control y los ratones tratados con péptido. Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001). La reducción en porcentaje promedio en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptidos se muestra en el gráfico. SI, índice de estimulación; LN; ganglios linfáticos.

(D) Se pretrataron ratones HLA-DR3 con ATX-GD-459 o PBS (n=10/grupo) según el programa de aumento de la dosis con 75 µg de dosis máxima para cada péptido. Los animales recibieron una inmunización con 4K/5D/9B emulsionado en CFA y después de 10 días, se recogieron LN y bazo para evaluar la proliferación específica de TSHR. Los datos representan la media ± SEM de los valores del índice de estimulación (SI) para los ratones tratados con control y los ratones tratados con péptido. Se usó ANOVA de dos vías para medir los efectos globales del tratamiento sobre la proliferación de células T y los valores de p se escriben en los gráficos. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001). La reducción en porcentaje promedio en la proliferación de células T inducida por el tratamiento con péptidos se muestra en el gráfico. SI, índice de estimulación; LN; ganglios linfáticos.

Figura 21-Visión general esquemática del modelo y validación de la enfermedad de Graves adenoviral

(A) Se inmunizaron ratones por medio de inmunización intramuscular con vectores adenovirales que expresan la subunidad de TSHR-A (Ad-TSHR) o β-galactosidasa (Ad-LacZ). Se inyectaron 10¹⁰ partículas adenovirales dos veces a un intervalo de 3 semanas. Las desviaciones de este protocolo se indican por experimento. Se recogió sangre antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización. El experimento se terminó 4 semanas después de la primera inmunización y se recogieron sangre, bazo y tiroides para la investigación de síntomas similares a la enfermedad de Graves. (B) Se inmunizaron ratones con Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). El tratamiento comenzó por medio de la inserción de una bomba subcutánea el día de la primera inmunización y continuó durante 4 semanas hasta el final del experimento. Se recogió sangre antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre y bazo. (C) A los ratones se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 µg, 1 µg y 10 µg de péptido los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 100 µg de péptido los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular Ad-TSHR o Ad-LacZ en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (semanas 0 y 3). Se recogió sangre antes del tratamiento y antes y 2 y 5 semanas después de la primera inmunización. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre y bazo.

Figura 22-Evolución de los niveles de T4 e IgG anti-TSHR a lo largo del tiempo en ratones BALB/c tras la inmunización con Ad-TSHR

Se inmunizaron ratones BALB/c (n=6-7/grupo) por medio de inmunización intramuscular con 10¹⁰ o 10¹¹ vectores adenovirales que expresan la subunidad TSHR-A (Ad-TSHR) o β-galactosidasa (Ad-LacZ). Se inyectaron 10¹⁰ o 10¹¹ partículas adenovirales tres veces a un intervalo de 3 semanas (semanas 0, 3 y 6). Se recogió suero antes y 4 y 10 semanas después de la primera inmunización. (A) Niveles de T4 analizados por ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio ± SEM por grupo. Los números de ratones hipertiroides se indican en los gráficos. En línea con los datos publicados, el límite para el hipertiroidismo se definió como la media ± 2 desviaciones estándar de los niveles de T4 murinos de intervalo normal en ratones de control inmunizados con Ad-LacZ.

(B) Niveles de IgG anti-TSHR analizados por ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio ± SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

Figura 23-Evolución de T4, títulos de anticuerpos contra TSHR estimuladores y anticuerpos anti-TSHR a lo largo del tiempo en ratones DR3tg después de inmunización con Ad-TSHR

(A) Se inmunizaron ratones DR3tg por medio de inmunización intramuscular con 10⁹ vectores adenovirales que expresan la subunidad TSHR-A (Ad-TSHR) (n=10) o β-galactosidasa (Ad-LacZ) (n=12). Las partículas adenovirales se inyectaron dos veces a un intervalo de 3 semanas (semanas 0 y 3). Se recogió suero antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de T4 por ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón en la semana 4 y se muestra el promedio ± SEM por grupo. Se usó la prueba de Mann-Whitney para medir las diferencias en los niveles de T4 y se indican diferencias significativas en los gráficos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Los resultados son representativos para más de 3 experimentos independientes.

(B) Se inmunizaron ratones DR3tg (n=10/grupo) por medio de inmunización intramuscular con 10⁹ vectores adenovirales que expresan la subunidad TSHR-A (Ad-TSHR) o β-galactosidasa (Ad-LacZ). Las partículas adenovirales

se inyectaron dos veces a un intervalo de 3 semanas (semanas 0 y 3). Se recogió suero antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de T4 por medio del ensayo del gen indicador de luciferasa CHO. Cada punto representa los datos de un ratón en la semana 4 y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó la prueba de Mann-Whitney para medir las diferencias en los niveles de anticuerpos contra TSHR estimuladores y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los resultados son representativos para más de 3 experimentos independientes. RLU, unidades de luz relativas (emisión de luz de células estimuladas/emisión de luz de células no estimuladas).

(C) Se inmunizaron ratones BALB/c ($n=10$; panel izquierdo) y ratones DR3tg ($n=7$; panel derecho) por medio de inmunización intramuscular con 10^{10} vectores adenovirales que expresan la subunidad TSHR-A (Ad-TSHR). Las partículas adenovirales se inyectaron tres veces en un intervalo de 3 semanas (semanas 0, 3 y 6). Se recogió suero antes y 4, 7 y 10 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

(D) Se inmunizaron ratones DR3tg por medio de inmunización intramuscular con 10^{10} o 10^{11} vectores adenovirales que expresan la subunidad TSHR-A (Ad-TSHR) o 10^{10} vectores adenovirales que expresan β -galactosidasa (Ad-LacZ). Las partículas adenovirales se inyectaron tres veces en un intervalo de 3 semanas (semanas 0, 3 y 6). Después de 10 semanas, se recogieron los bazo y se midió la proliferación de esplenocitos inducida por TSHR mediante incorporación de timidina tritiada. Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM por grupo. Cpm, recuentos por minuto; SI, índice de estimulación.

Figura 24-Efecto del tratamiento con metimazol sobre los niveles de T4 y anti-TSHR en ratones DR3tg después de inmunización con Ad-TSHR

Se inmunizaron ratones DR3tg ($n=7-8$ /grupo) con Ad-TSHR en la semana 0 y la semana 3. El tratamiento con metimazol (50 o 500 μg /ratón/día) o el tratamiento con vehículo se administró por medio de la inserción de una bomba subcutánea empezando el día de la primera inmunización y continuó durante 4 semanas hasta el final del experimento. Se recogió suero antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización. (A) Los niveles de T4 se analizaron por ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de T4. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). (B) Se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra la media $\pm$ SEM por grupo. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Figura 25-Los niveles de IgG anti-TSHR se reducen mediante tratamiento con metilprednisolona

Se inmunizaron ratones DR3tg ($n=10$ /grupo) con 10^{10} Ad-TSHR en la semana 0 y la semana 3. El tratamiento con metilprednisolona (Mpred) (7 mg/kg/día) o el tratamiento con vehículo se administró por medio de la inserción subcutánea de una bomba empezando 3 días antes de la primera inmunización y continuó durante 4 semanas hasta el final del experimento. Se recogió suero antes y 2 y 4 semanas después de la primera inmunización y se analizaron los niveles de IgG anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se muestra el promedio $\pm$ SEM por grupo. Se usó la prueba de Mann-Whitney para medir las diferencias en los niveles de IgG anti-TSHR y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Figura 26-El tratamiento con ATX-GD-459 reduce los niveles de anticuerpos anti-TSHR

A ratones DR3tg ($n=10$ /grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 μg , 1 μg y 10 μg de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11, seguido de 3 inyecciones de 100 μg de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Después, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular Ad-TSHR o Ad-LacZ en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 3). Se recogió sangre antes del tratamiento y antes y 2 y 5 semanas después de la primera inmunización para medir los niveles de IgG total anti-TSHR mediante ELISA. Cada punto representa los datos de un ratón y se indican el promedio del grupo $\pm$ SEM. Se usó ANOVA de una vía para medir las diferencias globales en los niveles de IgG anti-TSHR. Se usó una prueba post-hoc de Bonferroni y se indican diferencias significativas en los gráficos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Figura 27-Ensayo de APIPS que muestra la respuesta de clones de hibridoma a RNB-5D-K1 y RNB-4K-GKK

Se cultivaron 5×10^4 clones de hibridoma de células T específicos para RNB-5 (clon 50 + 35) o RNB-4 (clon 164 + 455) y TSHR en presencia de TSHR y RNB-5D-K1 o RNB-4K-GKK en combinación con 5×10^4 células B presentadoras de antígeno que expresan DR3 humano (VAVY) (clon 50) o con células B presentadoras de antígeno que expresan DR4 (BM14) (clon 35, 164, 455). Las células presentadoras de antígeno (APC) eran viables o se fijaron previamente con paraformaldehído al 0,5 % antes de la adición a los pocillos de cultivo. Después de 48 h de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA para evaluar los niveles de secreción de IL-2. Se presentan los resultados de clones representativos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una opción terapéutica nueva y alternativa para la prevención o supresión de la producción de autoanticuerpos contra TSHR, que es útil en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Graves. Como se demuestra en el ejemplo 1 de la presente solicitud, una combinación de péptidos de las SEQ ID NO: 1 y 2 da como resultado tolerancia a TSHR en un modelo de enfermedad de Graves.

Como tal, el primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una pluralidad de péptidos de TSHR, concretamente péptidos de la invención como se define en el presente documento, preferiblemente péptidos de SEQ ID NO: 1 y 2.

RECEPTOR DE HORMONA ESTIMULANTE DEL TIROIDES

La enfermedad de Graves es una enfermedad autoinmunitaria causada por linfocitos T y B autorreactivos dirigidos al autoantígeno primario, el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR).

TSHR es un receptor acoplado a proteína G en células foliculares tiroideas en la glándula tiroidea que estimula la producción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) por medio de una cascada de señales de AMPc tras la unión de su ligando, la hormona estimulante del tiroides (TSH). Tras la internalización, degradación y presentación del TSHR por las APC, las células T se activan e interactúan con células B autorreactivas, que a su vez producen autoanticuerpos agonistas estimulantes dirigidos contra TSHR. Las inmunoglobulinas estimulantes del tiroides se unen al mismo bolsillo receptor que la TSH, activando la transducción de señales mediada por TSHR y conduciendo a la producción de hormona tiroidea en exceso a partir de la glándula tiroidea y el crecimiento del tiroides.

TSHR, también conocido como receptor de tiotropina, se expresa principalmente en las células epiteliales del tiroides.

El holorreceptor de TSHR tiene 764 residuos y comprende un dominio extracelular N-terminal, al que se une TSH, un serpentin (o dominio transmembrana) y un dominio intracelular C-terminal.

TSHR comprende un dominio extracelular grande (418 aminoácidos) con residuos Cys altamente conservados, que facilitan la formación de una estructura terciaria de dominio extracelular que puede ser importante tanto en la unión al ligando como en la conformación inactiva del receptor. El dominio extracelular comprende más de la mitad de la longitud total de la proteína y es suficiente para la unión del ligando de alta afinidad. Después de transportarse a la superficie celular, la molécula receptora se somete a escisión intramolecular, lo que conduce a la eliminación de una secuencia de 50 aminoácidos entre los residuos 316 y 366. Como resultado, el receptor comprende dos subunidades, comprendiendo la subunidad α el dominio de unión a ligando extracelular y comprendiendo la subunidad β el dominio transmembrana y la secuencia C-terminal corta, unidas entre sí con enlaces disulfuro. En etapas posteriores, la subunidad α se desprende, conduciendo a un exceso de subunidades β privadas del dominio de unión a ligando en la membrana celular.

Después de la unión de la TSH circulante a TSHR, una cascada de señalización de proteína G activa la adenilil ciclasa y los niveles intercelulares de AMPc se elevan. El AMPc activa todos los aspectos funcionales de la célula tiroidea, incluyendo el bombeo de yodo, la síntesis de tiroglobulina, la yodación, la endocitosis y la proteólisis, la actividad de peroxidasa tiroidea y la liberación de hormonas.

La secuencia de aminoácidos de TSHR maduro se da a continuación (SEQ ID NO: 3).

```

1 mrapd11qlv 11ldlprdlg qmgcssppe chqeedfrvt ckdiqripsl ppstqtlkli
61 ethlrltipsh afsnlpnisr iyvsidvtlq qlshsfynl skvthieirn trnltyidpd
121 alkelp1lkf lgifntglkm fpdltkvyst diffileitd npymtsipvn afqglcnetl
181 tlklynngft svqgyafngt kldavylkn kytlvidkda fggvysgpsl ldvsqtsvta
241 lpskgleh1k eliarntwtl kklplslsfl hltradlsyp shccafknqk kirgiles1m
301 cnessmqslr qrksvna1ns plhgeyeenl gdsivgykek skfgdthnna hyyvffeeqe
361 deiigfggel knpgeetlqa fdshydytic gdsedmvctp ksdefnpced imgykflriv
421 vwfvsl1all gnvfvll1ll tshyklnvpr flmcn1afad fcmgmyllli asvdlythse
481 yynhaidwqt gpgcentagff tvfaselsvy tltvitlerw yaitfamrld rkirlrhaca
541 imvggwvecf 1lallplvgi ssyakvsiol pmdtetplal ayivfvltln ivafvivccc
601 yvkiyitvrn pqynpgdkt klakrmavli ftdf1cmapi sfyalsailn kplitvsnsk
661 illvlfypln scanpflyai ftkafqrdvf illskfgick rgaqayrgqr vppknstdiq
721 vqkvthdmrq glhnmedvye lienshtlpk kggqiseeym qtv1

```

TOLERANCIA

Los epítomos de células T desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria adaptativa a cualquier antígeno, ya sea propio o extraño. El papel central desempeñado por los epítomos de células T en enfermedades de hipersensibilidad (que incluyen alergia, enfermedades autoinmunitarias y rechazo de trasplante) se ha demostrado mediante el uso de modelos experimentales. Es posible inducir enfermedades inflamatorias o alérgicas mediante inyección de péptidos sintéticos (basados en la estructura de epítomos de células T) en combinación con adyuvante.

Por el contrario, se ha demostrado que es posible inducir tolerancia inmunogénica hacia antígenos particulares mediante la administración de epítomos peptídicos en forma soluble. La administración de péptido soluble se ha demostrado como un medio eficaz de inhibición de la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE - un modelo para la esclerosis múltiple (EM)) (Metzler y Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5: 1159-1165; Liu y Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7: 1255-1263; Anderton y Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); y modelos experimentales de artritis, diabetes y uveorretinitis (revisado en Anderton y Wraith (1998) como anteriormente). Esto también se ha demostrado como un medio para tratar una enfermedad en curso en EAE (Anderton y Wraith (1998) como anteriormente).

La tolerancia es el fallo del sistema inmunitario para responder a un antígeno. La tolerancia a autoantígenos es una característica esencial del sistema inmunitario; cuando se pierde esto, puede producirse una enfermedad autoinmunitaria. El sistema inmunitario adaptativo debe mantener la capacidad de responder a una enorme variedad de agentes infecciosos evitando al mismo tiempo el ataque autoinmunitario de los autoantígenos contenidos dentro de sus propios tejidos. Esto se controla en gran medida por la sensibilidad de los linfocitos T inmaduros a la muerte celular apoptótica en el timo (tolerancia central). Sin embargo, no todos los autoantígenos se detectan en el timo, por lo que la muerte de los timocitos autorreactivos sigue siendo incompleta. Por tanto, también existen mecanismos mediante los cuales puede adquirirse tolerancia por linfocitos T autorreactivos maduros en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). Se proporciona una revisión de los mecanismos de tolerancia central y periférica en Anderton *et al* (1999) (*Immunological Reviews* 169: 123-137).

Actualmente, se cree que la enfermedad de Graves está causada por autoanticuerpos estimulantes contra TSHR que se unen a y activan el TSHR, estimulando de ese modo la síntesis y secreción de la hormona tiroidea y el crecimiento del tiroides. La composición de la presente invención es capaz de inducir tolerancia a TSHR, de manera que, cuando se administra a un sujeto, puede restablecer la tolerancia a la autoproteína de TSHR y limitar la respuesta inmunitaria patógena.

APÍTOPOS

En una respuesta inmunitaria adaptativa, los linfocitos T son capaces de reconocer epítomos internos de un antígeno proteico. Las APC captan antígenos proteicos y los degradan en fragmentos peptídicos cortos. Un péptido puede unirse a una molécula mayor de histocompatibilidad dentro de la célula y transportarse a la superficie celular. Cuando se presenta en la superficie celular junto con una molécula de MHC, el péptido puede reconocerse por una célula T (por medio del receptor de células T (TCR), en cuyo caso el péptido es un epítomo de células T.

Un epítomo es, por tanto, un péptido derivable de un antígeno que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC y que reconoce una célula T.

El epítomo mínimo es el fragmento más corto derivable de un epítomo, que es capaz de unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC y que reconoce una célula T. Para una región inmunogénica dada, es normalmente posible generar un "conjunto anidado" de péptidos solapantes que actúan como epítomos, todos los cuales contienen el epítomo mínimo pero difieren en sus regiones flanqueantes.

Del mismo modo, es posible identificar el epítomo mínimo para una combinación particular de molécula de MHC:célula T midiendo la respuesta a péptidos truncados. Por ejemplo, si se obtiene una respuesta al péptido que comprende los residuos 1-15 en la biblioteca solapante, pueden usarse conjuntos que están truncados en ambos extremos (es decir, 1-14, 1-13, 1-12 etc. y 2-15, 3-15, 4-15 etc.) para identificar el epítomo mínimo.

Los presentes inventores han determinado previamente que existe un vínculo entre la capacidad de un péptido para unirse a una molécula de MHC y presentarse a una célula T sin procesamiento adicional, y la capacidad del péptido para inducir tolerancia *in vivo* (documento WO 02/16410). Si un péptido es demasiado largo para unirse al surco de unión a péptidos de una molécula de MHC sin procesamiento adicional (por ejemplo recorte), o se une en una conformación inapropiada, entonces no será tolerogénico *in vivo*. Si, por otra parte, el péptido es de un tamaño y conformación apropiados para unirse directamente al surco de unión a péptidos de MHC y presentarse a una célula T, entonces puede predecirse que este péptido es útil para la inducción de tolerancia.

Por tanto, es posible investigar la capacidad tolerogénica de un péptido investigando si puede unirse a una molécula de MHC y presentarse a una célula T sin procesamiento adicional de antígenos *in vitro*.

Los apítomos de TSHR (epítomos independientes del procesamiento de antígenos) son capaces de unirse a una molécula de MHC y estimular una respuesta de células T específica de TSHR sin procesamiento de antígenos adicional. Puede predecirse que dichos apítomos causan tolerancia a TSHR, siguiendo el método basado en reglas descrito en el documento WO 02/16410.

Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase I tienen normalmente de 7 a 13, más habitualmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y sitios invariantes en el surco de unión a péptidos de todas las moléculas de MHC de clase I. Existen sitios invariantes en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino y carboxi del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan por un retorcimiento en la cadena principal del péptido, a menudo en residuos de prolina o glicina que permiten flexibilidad.

Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase II tienen normalmente entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más habitualmente entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, y pueden ser más largos (por ejemplo hasta 40 aminoácidos). Estos péptidos se encuentran en una conformación extendida a lo largo del surco de unión a péptidos de MHC II que (a diferencia del surco de unión a péptidos de MHC de clase I) está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su sitio principalmente por contactos de átomos de la cadena principal con residuos conservados que recubren el surco de unión a péptidos.

Los péptidos de la invención son capaces de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional.

PÉPTIDO

El término "péptido" se usa en el sentido normal para significar una serie de residuos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí, normalmente por enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos de péptidos sintéticos.

Los péptidos pueden prepararse usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante técnicas en fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), escindirse de la resina y purificarse por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman y Co, Nueva York, NY). La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido puede prepararse alternativamente por medios recombinantes, o por escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido puede obtenerse por escisión de la proteína receptora de tirotrina, que puede ir seguida de modificación de uno o ambos extremos. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

Los péptidos usados en la presente invención son los siguientes:

(i) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KKKKYVSIDVTLLQQLSHKKK (SEQ ID NO: 1);

y

(ii) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID NO: 2).

Los péptidos comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2. En un aspecto preferido, los péptidos consisten en las SEQ ID NO: 1 y 2.

La identidad de secuencia puede evaluarse mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre secuencias, son útiles programas informáticos que realizan múltiples alineamientos de secuencias, por ejemplo Clustal W (Thompson *et al.*, (1994) Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680). Programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers *et al.*, (1988) CABIOS, 4: 1-17), FASTA (Pearson *et al.*, (1988) PNAS, 85:2444-2448; Pearson (1990), Methods Enzymol., 183: 63-98) y BLAST con huecos (Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402) también son útiles para este propósito. Además, el servidor Dali en el Instituto Europeo de Bioinformática ofrece alineamientos basados en estructura de secuencias de proteínas (Holm (1993) J. Mol. Biol., 233: 123-38; Holm (1995) Trends Biochem. Sci., 20: 478-480; Holm (1998) Nucleic Acid Res., 26: 316-9).

Pueden determinarse múltiples alineamientos de secuencias y cálculos de porcentaje de identidad usando los parámetros de BLAST convencionales (usando secuencias de todos los organismos disponibles, matriz Blosum 62, costes de hueco: existencia 11, extensión 1).

Alternativamente, pueden usarse el siguiente programa y parámetros: Programa: Align Plus 4, versión 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Comparación de ADN: Comparación global, matriz de puntuación lineal estándar, penalización por no coincidencia = 2, penalización por hueco abierto = 4, penalización por hueco extendido = 1. Comparación de aminoácidos: Comparación global, matriz de puntuación BLOSUM 62.

Por tanto, en el presente documento se describen variantes de las secuencias indicadas o dadas, siempre que la variante conserve la actividad funcional del precursor, es decir, las variantes sean funcionalmente equivalentes, en otras palabras, tengan o presenten una actividad del péptido precursor como se define en el presente documento. Tales variantes pueden comprender sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos (incluidos truncamientos en uno o ambos extremos) de la secuencia parental, por ejemplo, de uno o más, por ejemplo, de 1 a 14 aminoácidos.

También se incluyen derivados funcionalmente equivalentes en los que uno o más de los aminoácidos se derivatizan químicamente, por ejemplo, se sustituyen con un grupo químico.

Por tanto, los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender partes o fragmentos de las SEQ ID NO: 1-3, siempre que el péptido conserve la actividad requerida. Los fragmentos o partes de las SEQ ID NO: 1-3 pueden tener, por ejemplo, de 6 a 14 residuos de longitud, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 residuos de longitud.

- 5 Los péptidos descritos en el presente documento pueden comprender entre 8 y 30 aminoácidos, por ejemplo, de 8 a 25 aminoácidos, de 8 a 20 aminoácidos, de 8 a 15 aminoácidos o de 8 a 12 aminoácidos. Los péptidos descritos en el presente documento pueden tener, por tanto, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos de longitud.

Los péptidos de TSHR pueden estar en forma de una composición, preferiblemente una composición farmacéutica.

- 10 Los péptidos de TSHR pueden formularse en la composición como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina y procaína.

15 COMBINACIÓN

Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, los péptidos y/o la composición según la presente invención pueden administrarse en combinación con otras terapias usadas en el tratamiento o el manejo de la enfermedad de Graves, mientras se mantienen los efectos terapéuticos tanto de los péptidos/la composición de la invención como del otro agente terapéutico.

- 20 Como tal, en un aspecto, los péptidos o la composición de la invención pueden combinarse con un agente terapéutico adicional que se usa en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Graves.

Por ejemplo, los péptidos se combinan con un agente antitiroideo, o un β -bloqueante.

- 25 Como se demuestra en el ejemplo 2, la administración de un péptido de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 en combinación con un agente antitiroideo no afectó a la reducción en la producción de anticuerpos anti-TSHR debido a los péptidos de TSHR, ni se redujo la acción antitirótica (medida por la producción de T4), es decir, se mantuvieron ambas acciones terapéuticas. También se lograron resultados similares para una combinación de la composición según la invención en combinación con un β -bloqueante. Como tal, los presentes inventores han demostrado que los péptidos según la presente invención pueden usarse en combinación con terapias existentes para el tratamiento y el manejo de la enfermedad de Graves.

- 30 La combinación según la invención es ventajosa porque facilita la reducción de una respuesta autoinmunitaria en la enfermedad de Graves, es decir, el mecanismo subyacente, mientras que permite el tratamiento o el manejo de los síntomas de la enfermedad de Graves al mismo tiempo.

- 35 Un "agente antitiroideo" es un antagonista de hormonas que actúa sobre las hormonas tiroideas. Los agentes antitiroideos se usan en el tratamiento de la enfermedad de Graves. Se administran agentes antitiroideos a pacientes con enfermedad de Graves por su efecto inhibidor sobre la síntesis de hormona tiroidea, reduciendo de ese modo directamente sus niveles de tiroxina (T4).

En una realización, el agente antitiroideo se selecciona de carbimazol, metimazol (MMI), propiltiouracilo (PTU) y perclorato de potasio. En una realización preferida, el agente antitiroideo es metimazol (MMI).

- 40 Se administran β -bloqueantes a pacientes con enfermedad de Graves para combatir las consecuencias β -adrenérgicas del hipertiroidismo (sin tratar los compuestos inmunológicos de la enfermedad).

Los β -bloqueantes son una clase de fármacos que se usan para el tratamiento de arritmias cardíacas. Los beta bloqueantes bloquean la acción de las catecolaminas endógenas epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina) - en particular sobre los receptores beta adrenérgicos, del sistema nervioso simpático.

- 45 Los β -bloqueantes según la invención incluyen: propanolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, sotalol y timolol.

En una realización preferida, el β -bloqueante es propanolol.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables de β -bloqueantes. En una realización preferida, el β -bloqueante es clorhidrato de propanolol.

- 50 Las dosis adecuadas del agente antitiroideo y el β -bloqueante pueden determinarlas un experto en la técnica. A modo de ejemplo, un agente antitiroideo puede administrarse en una dosis de entre 10 y 1000 μ g, por ejemplo, entre 20 y 900, 30 y 800, 40 y 700, 50 y 600, 60 y 500, 70 y 400, 80 y 300, o 90 y 200 μ g. En una realización preferida, se administra una dosis de entre 300 y 700 μ g, por ejemplo, aproximadamente 500 μ g y preferiblemente 500 μ g.

En una realización preferida, el agente antitiroideo se administra diariamente, por ejemplo cada 20-28 horas, preferiblemente cada 24 horas.

El agente antitiroideo puede administrarse por cualquier vía adecuada, y esto lo conocerá un experto en la técnica. En una realización preferida, el agente antitiroideo se administra por vía subcutánea.

- 5 El β -bloqueante puede administrarse a una dosis de, por ejemplo, entre 1 y 100 mg/kg, por ejemplo entre 5 y 90, 10 y 80, 15 y 75, 20 y 70, 25 y 60, 30 y 55, 35 y 50, y 40 y 45 mg/kg. En una realización preferida, el β -bloqueante se administra a una dosis de 5-20 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 10 mg/kg, más preferiblemente 10 mg/kg.

En una realización preferida, el β -bloqueante se administra diariamente, por ejemplo cada 20-28 horas, preferiblemente cada 24 horas.

- 10 El β -bloqueante puede administrarse por cualquier vía adecuada, y esto lo conocerá un experto en la técnica. En una realización preferida, el β -bloqueante se administra por vía intraperitoneal.

En una realización, los péptidos o la composición según la invención se administran al mismo tiempo que el agente antitiroideo y/o el β -bloqueante. En una realización alternativa, los péptidos o la composición según la invención se administran en un momento diferente al agente antitiroideo y/o al β -bloqueante.

- 15 En un aspecto de la invención, el sujeto al que se administran los péptidos/composición (o al que se pretende administrar) ya está tomando el agente antitiroideo y/o β -bloqueante. Como tal, la invención abarca el uso de la invención en donde el sujeto toma, o ha estado tomando previamente, un agente antitiroideo y/o β -bloqueante.

En un aspecto adicional de la invención, el sujeto no toma, y/o no ha estado tomando, ningún agente terapéutico para la enfermedad de Graves.

- 20 En un aspecto de la invención comentada en el presente documento, como primera etapa se identifica a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Graves.

Los péptidos o las composiciones según la presente invención pueden ser para uso profiláctico o terapéutico.

- 25 Cuando se administran para uso profiláctico, los péptidos o la composición pueden reducir o prevenir la generación de una respuesta inmunitaria a TSHR. El nivel de respuesta inmunitaria es menor que el que se obtendría si el paciente no se hubiera tratado con la composición. El término "reducir" indica que se observa una reducción parcial en la respuesta inmunitaria, tal como una reducción del 50 %, 70 %, 80 % o 90 % en la respuesta que se habría observado si el paciente no se hubiera tratado con la composición (o en la respuesta observada en un paciente no tratado durante el mismo periodo de tiempo). El término "prevenir" indica que no se observa respuesta inmunitaria apreciable a TSHR.

- 30 Cuando se administran para uso terapéutico, los péptidos o la composición pueden suprimir una respuesta inmunitaria ya en curso al TSHR. El término "suprimir" indica una reducción en el nivel de una respuesta inmunitaria en curso, en comparación con el nivel antes del tratamiento con péptidos, o los niveles que se habrían observado en el mismo momento en que no se había administrado el tratamiento.

El tratamiento con los péptidos o la composición de la presente invención puede causar una reducción en el nivel de cualquiera o todos los siguientes:

- 35 i) Autoanticuerpos contra TSHR
ii) Células T CD4+ específicas para TSHR
iii) Células B que secretan autoanticuerpos contra TSHR.

La detección de todos los factores puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como ELISA, citometría de flujo, etc.

- 40 El tratamiento con los péptidos o la composición de la presente invención también puede causar o alternativamente anergia en células T CD4+ específicas para TSHR. La anergia puede detectarse, por ejemplo, mediante la exposición posterior a TSHR *in vitro*.

FORMULACIÓN

- 45 Los péptidos o la composición pueden prepararse como inyectables, o bien como solución líquida o bien suspensión; también puede prepararse una forma sólida adecuada para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o los péptidos encapsularse en liposomas. Los principios activos pueden mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y/o agentes tamponantes del pH. Las sales tamponantes incluyen fosfato, citrato, acetato. Puede usarse ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para el ajuste del pH. Para la estabilización, pueden usarse disacáridos tales como sacarosa o trehalosa.

- 5 En la composición, la proporción relativa de los péptidos (RNB-5D-K1 y RNB-9B) puede ser aproximadamente 1:1. Alternativamente, las proporciones relativas de cada péptido pueden alterarse, por ejemplo, para centrar la respuesta tolerogénica en un subconjunto particular de células T autorreactivas o si se encuentra que un péptido funciona mejor que los otros, en particular tipos de HLA.

- 10 Después de la formulación, los péptidos o la composición pueden incorporarse en un recipiente estéril que luego se sella y almacena a baja temperatura, por ejemplo 4 °C, o puede liofilizarse.

- 15 Convenientemente, los péptidos o la composición se preparan como un polvo liofilizado (secado por congelación). La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada. Los procedimientos de liofilización se conocen bien en la técnica, véase por ejemplo <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>. Se usan comúnmente agentes de carga antes del secado por congelación, tales como manitol, dextrano o glicina, o azúcares tales como trehalosa.

Los péptidos o la composición pueden administrarse de una manera conveniente, tal como por las vías oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, sublingual, intranasal, intradérmica o de supositorio o implantación (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta).

Los péptidos o la composición pueden administrarse ventajosamente por vía intranasal, subcutánea o intradérmica.

- 20 Los péptidos y la composición de la invención pueden usarse para tratar a un sujeto humano. Normalmente, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular.

Los péptidos y la composición de la invención pueden usarse para tratar a un sujeto humano. El sujeto puede tener la enfermedad de Graves. El sujeto puede tener autoanticuerpos contra TSHR.

- 25 El sujeto puede ser un haplotipo HLA que está asociado con una predisposición a desarrollar autoanticuerpos inhibidores de TSHR. El sujeto puede expresar HLA-DR3 o HLA-DR4. Los métodos para determinar el haplotipo HLA de un individuo se conocen en la técnica.

- 30 En una realización preferida, puede seguirse un protocolo de "aumento de la dosis", en donde se administra una pluralidad de dosis al paciente en concentraciones ascendentes. Tal enfoque se ha usado, por ejemplo, para péptidos de fosfolipasa A2 en aplicaciones inmunoterapéuticas contra la alergia al veneno de la abeja (Müller *et al* (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 y Akdis *et al.* (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

KIT

- 35 Convenientemente, los dos péptidos de TSHR pueden administrarse juntos, en forma de una composición o cóctel mixto. Sin embargo, puede haber circunstancias en donde es preferible proporcionar los péptidos por separado en forma de un kit, para administración simultánea, separada, secuencial o combinada.

Por ejemplo, el kit puede comprender los dos péptidos en recipientes separados. El contenido de los recipientes puede combinarse o no antes de la administración.

- 40 El kit también puede comprender medios de mezclado y/o administración (por ejemplo, un vaporizador para administración intranasal; o una jeringa y aguja para dosificación subcutánea/intradérmica). El kit también puede comprender instrucciones de uso.

La composición farmacéutica o el kit de la invención puede usarse para tratar y/o prevenir una enfermedad.

En particular, la composición/kit puede usarse para suprimir o prevenir la producción de autoanticuerpos contra TSHR *in vivo*. La composición/kit puede usarse para tratar y/o prevenir la enfermedad de Graves en un sujeto.

MODELO ANIMAL

- 45 Los modelos animales actuales de la enfermedad de Graves están asociados con diversas deficiencias. Por ejemplo, los modelos animales usados actualmente no desarrollan síntomas o características que sean relevantes para la enfermedad de Graves. Además, los modelos animales que están disponibles, por ejemplo, modelos desarrollados en ratones BALB/c, no se han sometido a prueba para la respuesta a las terapias aprobadas para la enfermedad de Graves.

- 50 Los presentes modelos animales para la enfermedad de Graves no son por lo tanto óptimos para estudiar posibles terapias.

El modelo animal descrito en el presente documento no es parte de la invención.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un animal que es transgénico para HLA-DR3 humano proporciona antecedentes adecuados para estudiar posibles terapias. Por tanto, en el presente documento se describe un modelo animal para una enfermedad asociada con la producción de anticuerpos contra TSHR, en donde el animal es transgénico para HLA-DR3 humano y comprende niveles aumentados de TSHR en comparación con un animal de control.

La expresión "niveles aumentados de TSHR" pretende englobar un nivel aumentado de cualquiera de la secuencia de TSHR de longitud completa, por ejemplo péptidos de TSHR.

El nivel de TSHR aumenta con respecto a un animal de control adecuado (por ejemplo, un animal que es transgénico para HLA-DR3 humano pero que no tiene TSHR aumentado). El nivel de TSHR puede aumentarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, administrando un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido de TSHR. En una realización preferida, el vector es un vector viral.

En el presente documento se describe un método para producir un modelo animal de una enfermedad asociada con la producción de anticuerpos contra TSHR, comprendiendo dicho método aumentar el nivel de TSHR en un animal que es transgénico para HLA-DR3 humano.

El método puede comprender aumentar el nivel de TSHR introduciendo un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido de TSHR. El vector puede ser un vector viral.

El modelo animal tiene características que son relevantes para enfermedades asociadas con la producción de anticuerpos contra TSHR. Por ejemplo, en el modelo animal, los niveles de anticuerpos contra TSHR aumentan en comparación con animales de control equivalentes en los que los niveles de TSHR no aumentan. Los niveles de anticuerpos contra TSHR pueden aumentar al menos 2, 3, 5, 10, 100 o 1000 veces en comparación con un animal de control equivalente en el que los niveles de anticuerpos contra TSHR no aumentan.

Los niveles de anticuerpos contra TSHR pueden determinarse usando métodos convencionales que se conocen en la técnica, por ejemplo un ensayo ELISA. El nivel de anticuerpos contra TSHR puede determinarse en una muestra *in vitro*. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de suero.

"Transgénico para HLA-DR3 humano" significa que el animal expresa la molécula de superficie celular HLA-DR3 de MHC de clase II humano. El animal transgénico puede generarse usando métodos adecuados que se conocen bien en la técnica.

"Asociado con la producción de anticuerpos contra TSHR" significa que los anticuerpos contra TSHR contribuyen a la etiología de la enfermedad. Por ejemplo, los niveles de anticuerpos contra TSHR pueden aumentar en la enfermedad en comparación con los niveles en ausencia de la enfermedad. La enfermedad asociada con anticuerpos contra TSHR puede ser la enfermedad de Graves.

El TSHR puede ser TSHR humano. Por ejemplo, el TSHR puede ser la subunidad A de TSHR humano o parte de la misma.

Un ácido nucleico que codifica un TSHR puede proporcionarse usando métodos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, basados en la secuencia de TSHR descrita en el presente documento.

El ácido nucleico puede ser natural, sintético o recombinante. Puede ser bi o monocatenario, puede ser ADN o ARN o combinaciones de los mismos. Puede ser, por ejemplo, ADNc, un producto de PCR, secuencia genómica o ARNm.

La secuencia de nucleótidos puede tener codones optimizados para la producción en la célula huésped/huésped de elección.

La administración de la secuencia de nucleótidos que codifica TSHR puede estar mediada por infección viral. Los vectores virales adecuados se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el vector viral puede ser un adenovirus, retrovirus o lentivirus.

En particular, el vector viral puede ser un adenovirus.

La producción del modelo animal puede comprender múltiples administraciones del vector.

El vector, por ejemplo, adenovirus, puede administrarse a intervalos de 3 semanas. El vector puede administrarse en un intervalo de 18-25, 18-23, 19-23 o 20-22 días. El vector puede administrarse en un intervalo de 20, 21 o 22 días.

El modelo animal puede comprender administrar el vector de adenovirus en al menos dos ocasiones. Por ejemplo, el vector de adenovirus puede administrarse en dos o tres ocasiones. En particular, el modelo animal puede comprender administrar el vector de adenovirus en dos ocasiones.

El modelo animal puede comprender administrar el vector en dos ocasiones, con un intervalo de tres semanas entre administraciones.

El vector, por ejemplo, adenovirus, puede administrarse a una dosis de 10^8 a 10^{11} partículas virales por administración. En particular, el adenovirus puede administrarse a una dosis de 10^9 a 10^{11} partículas virales por administración. El adenovirus puede administrarse a una dosis de 10^9 partículas virales por administración.

El vector puede administrarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, en el caso de un vector adenoviral, el vector puede administrarse mediante inyección intramuscular.

El animal puede ser un mamífero. Por ejemplo, el animal puede ser un ratón, rata, conejo, cobaya o primate. Preferentemente, el animal es un ratón.

- 10 El ratón puede ser un ratón transgénico HLA-DRA1*01:01 y HLA-DRB1*03:01 sobre antecedentes genéticos mixtos. Los medios para generar tal ratón los conocerá un experto en la técnica.

15 A modo de ejemplo, el modelo de ratón descrito en la sección de ejemplos se generó usando el siguiente enfoque: un fragmento *NdeI* de 6 kb de un clon genómico de HLA-DRA en pUC y un fragmento *ClaI*/*SaI* de 24 kb de cos 4.1 que contenía el gen B se coinyectaron en huevos fertilizados de donantes F1 (C57BL/6xDBA/2) apareados con machos C57BL/6. La progenie se ha criado posteriormente en los antecedentes genéticos C57BL/6 con inactivación para IA-beta (ratones ABC) que carece de la expresión de moléculas de MHC de clase II de ratón. Estos ratones DR3tg expresan la molécula HLA-DR3 pero no la molécula de MHC-II de ratón. Este método no es exhaustivo y se conocen en la técnica métodos alternativos para generar ratones transgénicos para HLA-DR3, por ejemplo, con antecedentes C57BL/10.

- 20 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, que están destinados a servir para ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

- 25 Ejemplo 1 - ATX-GD-59 induce tolerancia de células T específica de TSHR y reduce los títulos de anticuerpos anti-TSHR en modelos animales en ratones transgénicos para HLA-DR3

Materiales, métodos y procedimientos

Ratones

- 30 Se criaron ratones DR3tg en condiciones libres de patógenos específicos externamente en Charles River, Reino Unido o InnoSer, Países Bajos. La cepa DR3tg fue creada originalmente por Straub *et al.* En resumen, los constructos genómicos usados fueron un fragmento *NdeI* de 6 kb de un clon genómico de HLA-DRA en pUC 13 y un fragmento *CLaI* x *SaI* de 24 kb de cos 4.1, un cósmido (pTCF) que contenía el gen B de DRB1*0301. Se usó una solución que contenía 1-2 µg/ml de cada constructo para la coinyección en huevos fertilizados de donantes F1 (C57BL/6 x DBA/2) apareados con machos C57BL/6. La progenie se crió sobre los antecedentes genéticos C57BL/6 con inactivación para IA-beta (ratones AB⁰) que carecen de expresión de moléculas de MHC de clase II de ratón. Estos ratones DR3tg expresan la molécula HLA-DR3 de MHC de clase II humano pero no la molécula de MHC de clase II de ratón. Se identificaron ratones transgénicos mediante análisis de transferencia Southern de ADN de cola digerido con *EcoRI* y se estudiaron con sonda con un fragmento *BamHI* de 1,35 kb del ADNc de DRA y un fragmento *BamHI* de 1,25 kb del ADNc de DRB1*0301. Se usaron ratones DR3tg para estos experimentos ya que se ha sugerido que esta molécula de MHC de clase II está asociada con una mayor susceptibilidad a la enfermedad de Graves.

- 40 Los estudios con animales fueron aprobados por el "Comité Ético para Experimentos con Animales" en la Universidad de Hasselt y se realizaron con los estándares de atención en una instalación libre de patógenos.

Antígenos

- 45 PolyPeptide Laboratories (PPL; Estrasburgo, Francia) sintetizó los péptidos y se almacenaron en una solución madre de 8 mg/ml en PBS a -20 °C. El proceso de fabricación se basa en la síntesis de péptidos en fase sólida aplicando aminoácidos protegidos con N-α-Fmoc como elementos estructurales en el ensamblaje del péptido. El residuo C-terminal se acopla a la resina MBHA como parte del enlazador Fmoc-lys(Boc)-MPPA. Los otros aminoácidos se incorporan mediante una sucesión de ciclos de desprotección de Fmoc y de acoplamiento de aminoácidos. Las leyendas de las figuras indican cuándo se han usado péptidos PPL.

- 50 Alternativamente, GL Biochemistry Ltd (GLS; Shanghai, China) o Severn Biotech Ltd (Severn, Kidderminster Worcs., Reino Unido) sintetizaron los péptidos y se almacenaron en una solución madre de 20 mg/ml en DMSO (Sigma-Aldrich) a -80 °C. Los péptidos se sintetizaron usando química F-moc con una amina libre N-terminal y una amida C-terminal. Se indican diferentes suministradores de péptidos por experimento.

Los péptidos se usaron para el tratamiento como péptido individual (9B-N, 5D-K1) o como cóctel de péptidos ATX-GD-59. ATX-GD-59 es una mezcla equimolar de 9B-N y 5D-K1 y las dosis indicadas de ATX-GD-59 se refieren al contenido peptídico individual, es decir, la cantidad peptídica total administrada es 2x la dosis de tratamiento indicada.

Se produjo el dominio extracelular recombinante humano de TSHR (TSHR-ECD, AA19-417) en el sistema de expresión larval de *Trichoplusia ni* usando la tecnología de Chesapeake PERL PERLXpress de Chesapeake PERL (Savage, EE. UU.). La calidad de la proteína de cada lote TSHR-ECD se evaluó mediante gel de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Se adquirieron vectores adenovirales de Viraquest (North Liberty, IA, EE. UU.). La construcción y purificación de adenovirus que contienen los residuos de aminoácidos 1-289 de TSHR (Ad-TSHR) se ha descrito previamente. En resumen, el constructo de Ad-TSHR adenoviral y de control (Ad-LacZ) que expresa β -galactosidasa se propagaron en células HEK293 y se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. La concentración de partículas virales se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Experimento de tolerización ex vivo

A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g de péptidos los días -15, -13 y -11 respectivamente, seguido de 3 inyecciones de 100 μ g (dosis máxima/péptido) de péptido soluble (5D-K1 o 9B-N) los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). El ATX-GD-59 es una mezcla equimolar de los péptidos 5D-K1 (SEQ ID NO: 1) y 9B-N (SEQ ID NO: 2) y la dosis máxima mencionada (nmol) es por péptido en el cóctel. Una dosis de péptido de 100 μ g corresponde a $\sim$ 45 nmol ya que ambos sistemas se usaron en diferentes experimentos. Los péptidos se administraron por vía subcutánea en PBS. Las alteraciones en las dosis máximas/péptido, y correspondientemente en las dosis de aumento de la dosis, se indican por experimento. El día 0, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en la base de la cola con 50 μ g correspondientes al péptido parental (5D y/o 9B no modificado) emulsionado en adyuvantes completos de Freund (CFA; 2 mg/ml de H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco Laboratories, Michigan, EE. UU.) en adyuvante incompleto de Freund (Difco)) (50 μ g de péptido en 100 μ l de CFA (100 μ g de H37RA)/inyección). Diez días después de la inmunización, se recogieron LN drenantes y los bazo. Se aislaron células de LN y esplenocitos y se cultivaron en medio X-vivo 15 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin (todas de Lonza, Verviers, Bélgica) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para investigar la proliferación celular inducida por antígeno, se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo (200 μ l/pocillo) durante 72 horas con TSHR-ECD en un intervalo de concentración de 0-25 μ g/ml o con 12,5 μ g/ml de derivado de proteína purificado (PPD; control de inmunización; Statens serum institut, Copenhague, Dinamarca). Después de 72 horas en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂, se recogieron 60 μ l de sobrenadante celular y se congelaron. A continuación, se añadieron 20 μ l/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Zaventem, Bélgica) a las células para obtener una concentración final de 1 μ Ci/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂ y, después de 16 h, las placas se congelaron. Las placas descongeladas se recogieron y se leyeron en un contador β (contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular.

Modelo animal adenoviral para GD

A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 22,5 pmol, 225 pmol y 2250 pmol de ATX-GD-59 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11 respectivamente, seguido de 3 inyecciones de 22,5 nmol de ATX-GD-59 (dosis máxima/péptido) o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Las alteraciones en las dosis máximas, y correspondientemente en las dosis de aumento de la dosis, se indican por experimento.

El día 0, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular en el músculo del muslo Ad-TSHR o Ad-LacZ (10^{10} partículas virales). Todos los ratones se inmunizaron simultáneamente usando el mismo lote de adenovirus por experimento. Los ratones recibieron las inyecciones en dos ocasiones a intervalos de tres semanas (semanas 0 y 3) y se extrajo sangre en diferentes puntos de tiempo según el protocolo mostrado en la Figura 2. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después de la primera inmunización para obtener sangre, células del bazo y glándulas tiroideas. Los esplenocitos se aislaron y se cultivaron en medio X-vivo 15 suplementado con glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin (todos de Lonza, Verviers, Bélgica) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para investigar la proliferación celular inducida por antígeno, se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo (200 μ l/pocillo) durante 72 horas con diferentes concentraciones de TSHR-ECD (0-25 μ g/ml). Después de 72 horas en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂, se recogieron 60 μ l de sobrenadante celular y se congelaron. A continuación, se añadieron 20 μ l/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Zaventem, Bélgica) a las células para obtener una concentración final de 1 μ Ci/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, y después de 16 h, las placas se congelaron. Las placas descongeladas se recogieron y se leyeron con un contador β (contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular.

Detección de anticuerpos anti-TSHR

Se midieron anticuerpos anti-TSHR (clase IgG) contra TSHR-ECD recombinante purificado (Chesapeake-Perl) usando ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos (de 96 pocillos de media área, Fisher Scientific) durante la noche a temperatura ambiente (TA) con 50 μ l/pocillo de proteína TSHR-ECD en PBS (0,5 μ g/ml). Después de lavar con PBS-

Tween 20 al 0,05 %, los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % (p/v) en PBS durante 1 h a TA y se incubaron con sueros de prueba (dilución 1:50 o 1:500). Se usó anticuerpo anti-TSHR de ratón (A9, Abcam, Cambridge, Reino Unido) como control positivo. La unión del anticuerpo se detectó después con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Abcam). Para detectar anticuerpos anti-TSHR de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c, se usaron anticuerpos de rata anti-IgG1 de ratón (Southern Biotech, Alabama, EE. UU.), anticuerpos cabra anti-IgG2a de ratón (Southern Biotech), anticuerpos de cabra anti-IgG2b de ratón (Abcam) y anticuerpos de cabra anti-IgG2c de ratón (Abcam) conjugados con HRP, respectivamente. La señal se desarrolló con tetrametilbencidina (TMB). La densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas a 450 nm (Tecan Benelux).

Detección de anticuerpos anti-TSHR estimuladores (TSAb)

El profesor M. Ludgate (Universidad de Cardiff, Reino Unido)⁹ proporcionó amablemente células Lulu*, células de ovario de hámster chino K1 (CHO-K1) transfectadas de forma estable con pA3Luc, un constructo de luciferasa sensible a AMPc, y pcDNA3-TSHR, el TSHR humano junto con la resistencia a G418. Las células se mantuvieron en medio 12 de Ham (Lonza) complementado con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomycin (todas de Lonza), suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Fisher Scientific, Aalst, Bélgica) y 0,2 mg/ml de geneticina (Fisher) a 37 °C en un 5 % de CO₂. Para medir los TSAb, las células se sembraron en placa a 2*10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio F12 de Ham con suero al 10 % sometido a arrastre de carbón vegetal (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con medio de Ham nuevo que contenía PEG al 5 % y suero de prueba al 10 % durante 4 h a 37 °C. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis de cultivo celular de luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos). La producción de luciferasa sensible a AMPc se midió mediante un ensayo de indicador de luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante y la emisión de luz se midió con un luminómetro FLUOstar omega (BMG labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (RLU; emisión de luz de células estimuladas/emisión de luz de células no estimuladas).

Detección de hipertiroidismo

Se midió tiroxina total (T4) en suero de ratón sin diluir (10 µl) usando el kit de ELISA de tiroxina de ratón/rata CBI (Calbiotech, Spring Valley, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Los valores de T4 se calcularon a partir de patrones en el kit y se expresaron como µg/dl.

RESULTADOS

El tratamiento con un único péptido induce tolerancia de células T específicas de TSHR

Para determinar el efecto tolerogénico de los péptidos individuales 5D-K1 y 9B-N, se trataron ratones transgénicos para HLA-DR según el programa de aumento de la dosis en primer lugar con uno de los péptidos solos. En el primer experimento, los ratones DR3tg recibieron un tratamiento con 5D-K1 o control, como se describe en la sección de métodos. El pretratamiento con este apítipo modificado redujo la proliferación de células T inducida por TSHR en un 43 % en muestras de bazo y en un 60 % en muestras de LN en comparación con animales tratados con control (véanse las Figuras 1 y 2).

Para investigar la capacidad tolerogénica del péptido 9B-N, se trataron ratones DR3tg con 9B-N o PBS. Este estudio demostró que el pretratamiento con 9B-N reduce significativamente la proliferación de células T hacia el TSHR en un 41 y un 33 % en muestras de bazo y LN, respectivamente.

El tratamiento con péptidos combinados induce tolerancia de células T específicas de TSHR

Los hallazgos de que un tratamiento con péptidos con péptidos individuales 5D-K1 o 9B-N reduce la proliferación de linfocitos específica de TSHR en ratones condujeron a la investigación de si un tratamiento combinado, que administra los péptidos como un cóctel, también podría reducir la respuesta específica de TSHR. Se trataron ratones DR3tg con ATX-GD-59 según el programa de aumento de la dosis y se inmunizaron con una emulsión que incluía ambos péptidos no modificados parentales en CFA. Se sometieron a prueba tres dosis máximas de ATX-GD-59 (15; 22,5 y 45 nmol/péptido) para determinar su capacidad de tolerización potencialmente diferente, pero no pudieron observarse diferencias entre las dosis de tratamiento (datos no mostrados). Los resultados representativos se muestran en la Figura 3 que indicaban que el tratamiento con ATX-GD-59 indujo niveles significativos de tolerancia específica de TSHR. La proliferación inducida por TSHR se redujo en un 58 % y un 54 % en esplenocitos y células de LN, respectivamente.

El tratamiento con péptidos combinados reduce la producción de anticuerpos anti-TSHR en el modelo animal de enfermedad de Graves basado en adenovirus

Para demostrar la eficacia terapéutica de ATX-GD-59, se investigó si el tratamiento con péptido con ATX-GD-59 era capaz de suprimir la presencia de parámetros de enfermedad de Graves tales como proliferación de esplenocitos específica de TSHR y el desarrollo de anticuerpos anti-TSHR. Los ratones DR3tg recibieron tratamiento con ATX-GD-59 o control según el programa de aumento de la dosis seguido de dos inmunizaciones con partículas víricas de Ad-LacZ o Ad-TSHR. En primer lugar, se investigó el efecto del tratamiento con ATX-GD-59 sobre la proliferación de esplenocitos específica de TSHR. Los esplenocitos de ratones inmunizados con Ad-LacZ no proliferan después de la reestimulación con TSHR *in vitro* (datos no mostrados). Los valores de proliferación absoluta de esplenocitos

específica de TSHR en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR tratados con control son bajos pero aumentan de manera dependiente de la dosis. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento con ATX-GD-59 con 22,5 nmol de dosis máxima/péptido fue capaz de reducir significativamente la proliferación de esplenocitos específica de TSHR en más del 40 %. El tratamiento con ATX-GD-59 con 15 nmol de cada péptido mostró resultados similares (datos no mostrados). Se observó un efecto de tolerización similar del tratamiento con ATX-GD-59 en un experimento repetido (datos no mostrados), confirmando de este modo la reproducibilidad de estos resultados.

Después, se investigó el efecto del tratamiento con ATX-GD-59 sobre el desarrollo de anticuerpos anti-TSHR. Se recogieron muestras de suero para medir los niveles de IgG anti-TSHR por medio de ELISA. No estaban presentes anticuerpos IgG anti-TSHR antes (W-2, datos no mostrados) y después (W0) del pretratamiento con el péptido ATX-GD-59 (Figura 5). Correspondiente a los datos de proliferación, no se detectaron anticuerpos anti-TSHR en ratones inmunizados con control de Ad-LacZ. Se observaron niveles altos de IgG anti-TSHR en ratones tratados con control de péptido a las 2 semanas después de la primera inmunización con Ad-TSHR. El tratamiento con ATX-GD-59 redujo el aumento de anticuerpos anti-TSHR observado en ratones tratados con control de péptido tras la inmunización con Ad-TSHR en un 95 % en la semana 2. Además, los niveles de IgG anti-TSHR se redujeron todavía en un 93 % en la semana 5 mediante el tratamiento con el péptido ATX-GD-59.

Para investigar adicionalmente la reducción en los niveles de anticuerpos anti-TSHR, se investigó el efecto del tratamiento con ATX-GD-59 sobre diferentes anticuerpos de isotipo anti-TSHR. La inmunización con Ad-TSHR a 10^{10} partículas virales indujo altos niveles de anticuerpos anti-TSHR de isotipo IgG2b e IgG2c. La Figura 6 muestra que ATX-GD-59 redujo significativamente los anticuerpos anti-TSHR del isotipo IgG1, IgG2b e IgG2c en ratones inmunizados con Ad-TSHR, que se correlaciona de este modo con el patrón de niveles totales de anticuerpos IgG mostrado en la Figura 5. Se sometieron a prueba dos veces regímenes de tratamiento de dosis tanto de 15 nmol como de 22,5 nmol de tratamiento con ATX-GD-59 en dos experimentos independientes y redujeron significativamente los niveles de isotipo IgG e IgG total anti-TSHR (datos de dosis de 15 nmol no mostrados), indicando de este modo que ambas dosis tienen eficacia en el modelo de GD basado en adenovirus.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento profiláctico con ATX-GD-59 es eficaz en la inducción de tolerancia de células T específica de TSHR en el modelo de tolerancia *ex vivo* y en la reducción de los niveles de anticuerpos anti-TSHR en el modelo de enfermedad de Graves adenoviral.

Ejemplo 2 - Medicación conjunta de ATX-GD-459 y fármacos usados clínicamente para la enfermedad de Graves

Materiales y métodos

Ratones

Se criaron ratones DR3tg en condiciones libres de patógenos específicos externamente en Charles River, Reino Unido. La cepa DR3tg fue creada originalmente por Strauss *et al.* (Strauss *et al.*, 1994, Immunogenetics 3, 104-108). En resumen, los constructos genómicos usados fueron un fragmento *NdeI* de 6 kb de un clon genómico de HLA-DRA en pUC 13 y un fragmento *Clal*/*SalI* de 24 kb de cos 4.1, un cósmido (pTCF) que contenía el gen *B* de DRB1*0301. Se usó una solución que contenía 1-2 µg/ml de cada constructo para la coinyección en huevos fertilizados de donantes F1 (C57BL/6 x DBA/2) apareados con machos C57BL/6. La progenie se ha criado posteriormente en los antecedentes genéticos C57BL/6 con inactivación de IA-beta (ratones AB0) que carece de la expresión de moléculas de MHC de clase II de ratón. Estos ratones DR3tg expresan la molécula HLA-DRB1*0301 pero no la molécula de MHC-II de ratón. Los ratones se mantuvieron por retrocruzamiento con C57BL/6 y con B10.Q. Los ratones transgénicos se identificaron por análisis de transferencia Southern de ADN de cola digerido con *EcoRI* y se estudiaron con sonda con un fragmento *BamHI* de 1,35 kb del ADNc de DRA y un fragmento *BamHI* de 1,25 kb del ADNc de DRB1*0301. Se usaron ratones DR3tg para estos experimentos ya que se ha sugerido que esta molécula de MHC de clase II está asociada con un riesgo aumentado de que los individuos desarrollen la enfermedad de Graves.

La cepa de ratón DR4 fue creada originalmente por Lars Fugger *et al.* (PNAS 1994 volumen 91: 6151-55) en la que se microinyectaron conjuntamente los constructos HLA-DRA*0101/HLA-DRB1*0401 y mCD3-huCD4c/g en embriones de apareamientos F1 (DBA/1xA/CA) y se transfirieron embriones viables a hembra pseudopreñada F1 (BALB/c x 129) para su desarrollo a término. La progenie se ha criado posteriormente en los antecedentes genéticos con inactivación de IA-b (ratones AB0) que carecen de la expresión de moléculas de MHC de clase II de ratón. La única molécula de MHC de clase II expresada en estos ratones DR4 es, por lo tanto, la molécula HLA DR4 humana.

Se obtuvieron ratones BALB/cJOlaHsd de Harlan Laboratories (Venray, Países Bajos).

Los estudios con animales fueron aprobados por el "Comité Ético para Experimentos con Animales" (ECD) en la Universidad de Hasselt y se realizaron en una instalación libre de patógenos.

Antígenos

Todos los péptidos individuales fueron sintetizados por GL Biochem Ltd (Shanghai, China) y se almacenaron en una solución madre de 20 mg/ml en DMSO (Sigma-Aldrich) a -80 °C. Los péptidos se sintetizaron con una amina libre N-terminal y una amida C-terminal.

Los péptidos ATX-GD-459 (véase el ejemplo 3 para una discusión de estos péptidos) fueron sintetizados por PolyPeptide Laboratories (Estrasburgo, Francia) y se almacenaron en una solución madre de 8 mg/ml en PBS a -20 °C. El proceso de fabricación se basa en la síntesis de péptidos en fase sólida aplicando aminoácidos protegidos con N- α -Fmoc como elementos estructurales en el ensamblaje del péptido. El residuo C-terminal se acopla a la resina MBHA como parte del enlazador Fmoc-lys(Boc)-MPPA. Los otros aminoácidos se incorporan mediante una sucesión de ciclos de desprotección de Fmoc y de acoplamiento de aminoácidos.

Se produjo el dominio extracelular recombinante humano de TSHR (TSHR-ECD, AA19-417) en un sistema de expresión larval de *Trichoplusia ni* usando la tecnología de Chesapeake PERL PERLXpress de Chesapeake PERL (Savage, EE. UU.). La calidad de la proteína de cada lote de TSHR-ECD se evaluó mediante gel de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Se adquirieron vectores adenovirales de Viraquest (North Liberty, IA, EE. UU.). La construcción y purificación de adenovirus que contienen los residuos de aminoácidos 1-289 de TSHR (Ad-TSHR) se ha descrito previamente (Chen *et al.* 1999 J Clin Endocrinol Metab 84:3182-3186). En resumen, los adenovirus Ad-TSHR y el adenovirus de control (Ad-LacZ) que expresa β -galactosidasa se propagaron en células HEK293 y se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad de CsCL. La concentración de partículas virales se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Medicación conjunta de TX-GD-459 y fármaco de GD usado clínicamente en un modelo animal basado en adenovirus para GD

A ratones DR3tg (n=9-10/grupo) se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 15 pmol, 150 pmol y 1500 pmol de cada péptido ATX-GD-459 o péptido de control los días -15, -13 y -11 respectivamente, seguido de 3 inyecciones de 15 nmol de cada péptido ATX-GD-459 (dosis máxima) o péptido de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Las alteraciones en las dosis máximas, y correspondientemente en las dosis de aumento de la dosis, se indican por experimento. Empezando el día del primer tratamiento con péptido hasta la terminación del experimento, los ratones se trataron con MMI o propanolol. Se disolvió MMI (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) en agua estéril a la concentración deseada para dar a los ratones una dosis diaria de 500 μ g mediante administración subcutánea mediante bombas osmóticas ALZET (modelo 1004, 0,11 μ l/h; Charles River, Francia). Se implantaron nuevas bombas osmóticas después de 4 semanas. Se disolvió clorhidrato de propanolol (Sigma-Aldrich) de manera reciente en solución salina al 0,9 % y se administró mediante inyecciones intraperitoneales (IP) diarias a una dosis de 10 mg/kg/día. El día 0, los ratones se inmunizaron mediante inyección intramuscular con 10^9 o 10^{10} partículas virales de Ad-TSHR y la inmunización se repitió tres semanas después. El peso corporal se registró semanalmente para medir el estado de salud de los ratones. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre, tiroides y bazo. La proliferación de esplenocitos inducida por TSHR, la secreción de citocinas y los niveles de anticuerpos anti-TSHR se evaluaron como se describe a continuación.

Detección de anticuerpos anti-TSHR

Los anticuerpos anti-TSHR (clase IgG) contra TSHR-ECD recombinante purificado (Chesapeake-Perl) se midieron usando ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos (de 96 pocillos de media área, Fisher Scientific) durante la noche a temperatura ambiente (TA) con 50 μ l/pocillo de proteína TSHR-ECD en PBS (0,5 μ g/ml). Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05 %, los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % (p/v) en PBS durante 1 h a TA y se incubaron con sueros de prueba (dilución 1:50 o 1:500). Se usó anticuerpo anti-TSHR de ratón (A9, Abcam, Cambridge, Reino Unido) como control positivo. La unión del anticuerpo se detectó después con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Abcam). Para detectar anticuerpos anti-TSHR de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c, se usaron anticuerpos de rata anti-IgG1 de ratón (Southern Biotech, Alabama, EE. UU.), anticuerpos de cabra anti-IgG2a de ratón (Southern Biotech), anticuerpos de cabra anti-IgG2b de ratón (Abcam) y anticuerpos de cabra anti-IgG2c de ratón (Abcam) conjugados con HRP, respectivamente. La señal se desarrolló con tetrametilbencidina. La densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas a 450 nm (Tecan Benelux).

Detección de anticuerpos anti-TSHR estimuladores (TSAb)

El profesor M. Ludgate (Universidad de Cardiff, Reino Unido)⁶ proporcionó amablemente células Lulu*, células de ovario de hámster chino K1 (CHO-K1) transfectadas de forma estable con pA3Luc, un constructo de luciferasa sensible a AMPc, y pcDNA3-TSHR, el TSHR humano junto con la resistencia a G418. Las células se mantuvieron en medio 12 de Ham (Lonza) complementado con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomycin (todas de Lonza), suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Fisher Scientific, Aalst, Bélgica) y 0,2 mg/ml de geneticina (Fisher) a 37 °C en un 5 % de CO₂. Para medir los TSAbs, las células se sembraron en placa en 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio F12 de Ham con suero al 10 % sometido a arrastre de carbón vegetal (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con medio de Ham reciente que contenía PEG al 5 % y suero de prueba al 10 % durante 4 h a 37 °C. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis de cultivo celular de luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos). La producción de luciferasa sensible a AMPc se midió mediante un ensayo de indicador de luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante y la emisión de luz se midió con un luminómetro FLUOstar omega (BMG labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (RLU; emisión de luz de células estimuladas/emisión de luz de células no estimuladas).

Detección de hipertiroidismo

La tiroxina total (T4) se midió en suero de ratón sin diluir (10 µl) usando el kit de ELISA de tiroxina de ratón/rata CBI (Calbiotech, Spring Valley, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Los valores de T4 se calcularon a partir de patrones en el kit y se expresaron como µg/dl.

5 *Ensayo de proliferación de esplenocitos*

Se aislaron esplenocitos y se cultivaron en medio X-vivo 15 suplementado con glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin (todas de Lonza, Verviers, Bélgica) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para investigar la proliferación celular inducida por antígeno, se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo (200 µl/pocillo) durante 72 horas con diferentes concentraciones de TSHR-ECD (0-25 µg/ml). Después de 72 horas en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂, se recogieron 60 µl de sobrenadante celular y se congelaron. A continuación, se añadieron 20 µl/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Zaventem, Bélgica) a las células para obtener una concentración final de 1 µCi/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, y después de 16 h, las placas se congelaron. Las placas descongeladas se recogieron y se leyeron con un contador β (contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular.

15 **RESULTADOS***Medicación conjunta de MMI y ATX-GD-459 en modelo de GD basado en adenovirus*

Para verificar si el tratamiento con ATX-GD-459 puede combinarse con MMI para tratar los síntomas de GD, se investigó el efecto de la medicación conjunta con MMI y ATX-GD-459 en el modelo animal de GD basado en adenovirus (véanse los ejemplos 4 y 5 para una discusión adicional del modelo). En este experimento, se trataron ratones DR3tg con las siguientes combinaciones de MMI y ATX-GD-459: vehículo + péptido de control, MMI + péptido de control, vehículo + ATX-GD-459 o MMI + ATX-GD-459. El tratamiento con ATX-GD-459 o péptido de control se administró durante las dos primeras semanas del experimento según el programa de aumento de la dosis (Figura 8). El tratamiento con vehículo subcutáneo o MMI comenzó simultáneamente pero duró hasta la finalización del experimento. Este diseño experimental permitió la investigación de influencias recíprocas de los tratamientos con MMI y ATX-GD-459 sobre parámetros de enfermedad de tipo GD.

En primer lugar, se investigó el efecto del tratamiento con MMI y ATX-GD-459 sobre la proliferación de esplenocitos específica de TSHR. Los valores absolutos de proliferación de esplenocitos específicos de TSHR fueron relativamente bajos en los ratones tratados con control (Figura 10). Sin embargo, estos valores fueron mucho mayores en este experimento que en todos los demás grupos de control de experimentos realizados previamente (datos no mostrados) o del experimento de propanolol. Por lo tanto, la reducción significativa en la proliferación de esplenocitos específica de TSHR causada por el tratamiento con MMI o ATX-GD-459, como se representa en la Figura 10, debe interpretarse con precaución.

Junto a la proliferación de esplenocitos inducida por TSHR, se midieron los niveles séricos de IgG anti-TSHR en todos los ratones. Antes del inicio del experimento, no se detectaron anticuerpos IgG anti-TSHR en ninguno de los ratones (datos no mostrados). Un tratamiento de aumento de la dosis de ATX-GD-459 no indujo ninguna producción de anticuerpos anti-TSHR, como se midió en la semana 0 (Figura 11). La inmunización con Ad-TSHR provocó la producción de anticuerpos anti-TSHR en ratones tratados con péptido de control, pero no en ratones tratados con ATX-GD-459. Aunque no es significativamente diferente debido a la variación sustancial entre ratones tratados con control, el pretratamiento con ATX-GD-459 redujo la producción promedio de anticuerpos anti-TSHR en más del 90 %. Por el contrario, el tratamiento con MMI no tuvo efecto sobre los niveles de anticuerpos anti-TSHR. Además, el tratamiento con MMI no influyó en la capacidad de reducción de anticuerpos del tratamiento con el péptido ATX-GD-459.

El perfil de anticuerpos anti-TSHR se investigó adicionalmente determinando los isotipos de IgG específicos. Como se muestra en la Figura 12, ninguno de los ratones inmunizados con Ad-TSHR produce anticuerpos anti-TSHR del isotipo IgG1. La inmunización con Ad-TSHR indujo la producción de anticuerpos IgG2b e IgG2c anti-TSHR en ratones tratados con péptido de control, pero no en ratones tratados con ATX-GD-459. El pretratamiento con ATX-GD-459 redujo la producción de anticuerpos IgG2b e IgG2c anti-TSHR en más del 90 %. Por el contrario, el tratamiento con MMI no tuvo efecto sobre ninguno de los isotipos IgG anti-TSHR y no afectó a la capacidad reductora de anticuerpos del tratamiento con ATX-GD-459. Estos datos corresponden completamente al perfil observado para los anticuerpos IgG totales anti-TSHR.

Además de la determinación de isotipo, se investigaron la actividad biológica de los anticuerpos anti-TSHR y el efecto potencial de MMI o ATX-GD-459 sobre los mismos. Puesto que no se superó el umbral para los anticuerpos estimuladores por ninguno de los ratones inmunizados con Ad-TSHR (datos no mostrados), no se extrajeron conclusiones sobre el efecto del tratamiento con MMI o ATX-GD-459 sobre la incidencia de anticuerpos estimuladores. La baja incidencia de anticuerpos estimuladores está de acuerdo con los experimentos descritos previamente (informe ATX-GD-15-003).

Finalmente, se examinó el efecto del tratamiento con MMI y ATX-GD-459 sobre los niveles de T4. Como no se usó inmunización con Ad-LacZ como control de inmunización en este experimento, no pudo determinarse la incidencia de hipertiroidismo. Aunque no se dispone de información sobre el nivel de hipertiroidismo, los resultados mostraron claramente que el tratamiento con MMI redujo significativamente los niveles de T4 (Figura 13). Sin embargo, el pretratamiento con ATX-GD-459 no tuvo efecto sobre los niveles séricos de T4. Además, el pretratamiento con ATX-GD-459 no tuvo influencia sobre la capacidad reductora de T4 de MMI.

Tomados en conjunto, estos datos muestran que el tratamiento con MMI y ATX-GD-459 no impide la función del otro y pueden combinarse de manera segura en el modelo de GD basado en adenovirus.

Medicación conjunta de propranolol y ATX-GD-459 en modelo de GD basado en adenovirus

Los pacientes con GD a menudo usan β -bloqueantes para luchar contra los síntomas adrenérgicos del hipertiroidismo.

Por lo tanto, en este experimento se investigó el efecto de la medicación conjunta con ATX-GD-459 y el β -bloqueante propranolol en el modelo de GD basado en adenovirus. En primer lugar, se examinó la proliferación de esplenocitos específica de TSHR. Como se muestra en la Figura 14, ni el tratamiento con propranolol ni con ATX-GD-459 indujo un efecto significativo sobre la proliferación de esplenocitos específica de TSHR. Un tratamiento combinado de propranolol y ATX-GD-459 tampoco tuvo efecto sobre la respuesta proliferativa.

Después, se investigó el efecto del tratamiento con propranolol y ATX-GD-459 sobre el desarrollo de anticuerpos anti-TSHR. Se recogieron muestras de suero para medir los niveles de IgG anti-TSHR por medio de ELISA. No estaban presentes anticuerpos IgG anti-TSHR antes (W-2) y después (W0) del pretratamiento con el péptido ATX-GD-459 (Figura 15). La inmunización con Ad-TSHR indujo una fuerte producción de anticuerpos anti-TSHR en ratones tratados con péptido de control, pero en menor medida en ratones tratados con ATX-GD-459. Notablemente, la inmunización con Ad-TSHR usando 10^{10} partículas víricas usadas en este experimento causó títulos de anticuerpos anti-TSHR más altos que la inmunización con 10^9 Ad-TSHR usada en experimentos previos (datos no mostrados). El tratamiento con ATX-GD-459 redujo la producción de anticuerpos anti-TSHR en más del 90 %, ambos medidos en W2 y W5 después de la inmunización. Por el contrario, el tratamiento con propranolol no tuvo efecto sobre los niveles de anticuerpos anti-TSHR. Además, el tratamiento con propranolol no influyó en la capacidad reductora de anticuerpos del tratamiento con péptido ATX-GD-459.

Los perfiles de isotipo IgG anti-TSHR se determinaron después para investigar adicionalmente el perfil de anticuerpos. Aunque menores que los niveles de IgG2b e IgG2c, se indujeron claramente anticuerpos IgG1 anti-TSHR por la inmunización con Ad TSHR. Estos datos contrastan con la ausencia de anticuerpos IgG1 anti-TSHR en experimentos previos (datos no mostrados), pero pueden explicarse por el aumento de la dosis de partículas adenovirales de 10^9 a 10^{10} usadas en la inmunización. Como se muestra en la Figura 16, el tratamiento con ATX-GD-459 redujo significativamente los niveles de anticuerpos IgG2b e IgG2c anti-TSHR. Los títulos de anticuerpos IgG1 anti-TSHR también se redujeron mediante el tratamiento con péptidos, pero no a un nivel significativo. En contraste con el tratamiento con péptidos, el tratamiento con propranolol no tuvo efecto sobre ninguno de los isotipos IgG anti-TSHR. Además, el tratamiento con propranolol no afectó a la capacidad reductora de anticuerpos del tratamiento con ATX-GD-459, correspondiendo completamente de este modo al perfil observado para los anticuerpos IgG totales anti-TSHR.

Tomado en conjunto, el tratamiento con ATX-GD-459 redujo significativamente los títulos de anticuerpos anti-TSHR en este modelo animal. Sin embargo, no se observó ningún efecto del tratamiento con propranolol sobre ningún parámetro de enfermedad similar a GD. Para verificar si la administración diaria IP indujo niveles farmacológicos de propranolol en sangre de ratón, se midieron los niveles de propranolol en plasma de ratón mediante LC-MSMS (Anacura). Se recogieron muestras de sangre entre 60 y 90 minutos después de la dosis y se compararon los niveles plasmáticos individuales entre W0 y W5. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Ejemplo 3-Tolerización de células T ex vivo con ATX-GD-459

Se eligieron clones de hibridoma específicos para RNB-4K y RNB-5D para determinar si los péptidos RNB-4K-GKK y RNB-5D-K1 eran apítosos. Se realizaron ensayos de "presentación independiente del procesamiento de antígenos" (APIPS) y se confirmó que los péptidos RNB-4K-GKK y RNB-5D-K1 eran apítosos (Figura 27).

Se determinó la capacidad de una composición que comprende los péptidos mostrados en la tabla 1 (denominados ATX-GD-459), o los péptidos individuales administrados solos, para inducir tolerancia hacia TSHR. El protocolo de tolerización ex vivo se muestra en la Figura 19.

Tabla 1

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
RNB-5D-K1	KKKKYVSIDVTLQQLESHKKK	SEQ ID NO: 1
RNB-4K-GKK	KKGNLPNISRIYVSIDVTGKK	SEQ ID NO: 4
RNB-9B	GLKMFPDLTKVYSTD	SEQ ID NO: 2

Se trataron ratones HLA-DR3 con ATX-GD-459 según el programa de aumento de la dosis y se inmunizaron con péptidos parentales 4K/5D/9B juntos en CFA. Los resultados mostraron que el tratamiento con ATX-GD-459 indujo niveles significativos de tolerancia específica de TSHR tanto en células de bazo como de LN (Figura 20). La tolerancia inducida por el tratamiento con ATX-GD-459 fue mayor que la inducida por la administración de los péptidos individuales (Figura 20).

Ejemplo 4 - Establecimiento de un modelo de enfermedad de Graves basado en adenovirus

Para validar el efecto terapéutico del tratamiento con el péptido ATX-GD-459, se estableció en primer lugar un modelo animal basado en adenovirus en ratones BALB/c de tipo silvestre. La proliferación de esplenocitos inducida por TSHR, los anticuerpos IgG anti-TSHR, los niveles séricos de T4 y los cambios patológicos en tejido tiroideo se investigaron como parámetros para los síntomas de la enfermedad. En el primer experimento, se inmunizaron ratones BALB/c con 10^8 partículas virales de Ad-TSHR. Aunque se describió que esta dosis viral inducía hipertiroidismo y producción de anticuerpos anti-TSHR (Chen *et al.*, 2004, *Endocrinology* 145 (11): 4927-33), sólo se consideraron 2/10 ratones (límite) hipertiroides y ninguno de los ratones produjo anticuerpos IgG anti-TSHR (datos no mostrados).

Durante un segundo experimento usando una dosis aumentada de partículas víricas, aproximadamente el 30 % de los ratones inmunizados con Ad-TSHR tenían niveles elevados de T4 en suero medidos 4 semanas después de la primera inmunización (Figura 22). Sin embargo, se observó una tasa de incidencia de solo el 15 % en la semana 10. Esta disminución en los niveles elevados de T4 en ratones BALB/c de tipo silvestre a lo largo del tiempo después de un aumento inicial en las semanas después de la inmunización se ha descrito anteriormente (McLachlan *et al.*, 2012, *Thyroid* 8:1-7). Sin embargo, el hipertiroidismo pronunciado en ratones individuales se correspondía bien con hallazgos histopatológicos en tejido tiroideo tales como hipertrofia de células epiteliales tiroideas o infiltración de linfocitos (datos no mostrados).

Aunque la bibliografía proporciona evidencia de que los ratones con antecedentes genéticos C57BL/6 o ratones DR3tg siguen siendo resistentes al desarrollo de síntomas similares a la enfermedad de Graves, los inventores sometieron a prueba la capacidad de la inmunización con Ad-TSHR para inducir síntomas similares a la enfermedad de Graves en ratones DR3tg con antecedentes genéticos mixtos C57BL/10, DBA/2, C57BL/6 no MHC de clase II.

La Figura 23A muestra los niveles séricos de T4 en ratones DR3tg inmunizados con Ad-LacZ y Ad-TSHR. Aunque 4 ratones inmunizados con Ad-TSHR mostraron niveles de T4 mayores que la media + 2SD de los ratones inmunizados con Ad-LacZ, fueron solo hipertiroides límite y el aumento de los niveles de T4 se consideró demasiado bajo para usar como parámetro de la enfermedad cuando se estudió la eficacia de la eficacia del tratamiento con péptidos.

La inmunización con Ad-TSHR indujo altos títulos de IgG anti-TSHR en sueros de ratones DR3tg (Figura 11, panel derecho). Los niveles más altos de IgG anti-TSHR se alcanzan a las 4 semanas seguido de una disminución en los niveles de anticuerpos a las semanas 7 y 10, lo que contrasta con los niveles estables de IgG anti-TSHR observados en ratones BALB/c (Figura 23C, panel izquierdo). El hallazgo de que los niveles de IgG anti-TSHR en ratones DR3tg son incluso mayores a las 2 semanas después de la primera inmunización que a las 4 semanas (datos no mostrados), condujo a la conclusión de terminar el modelo adenoviral de enfermedad de Graves a las 4 semanas en lugar de a las 10 semanas.

Ejemplo 5 - Validación del modelo adenoviral de enfermedad de Graves

Para validar el modelo de enfermedad de Graves adenoviral DR3tg, se investigó el efecto de diferentes fármacos inmunomoduladores sobre la producción de anticuerpos anti-TSHR en el modelo de enfermedad de Graves adenoviral. El fármaco antitiroideo metimazol (MMI) se usa actualmente para reducir directamente los niveles de hormona tiroidea en pacientes con enfermedad de Graves. Por lo tanto, se determinaron los efectos del tratamiento con MMI en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR. Se sometieron a prueba dos dosis de MMI diferentes (50-500 μ g/ratón/día), basándose en la bibliografía que describe el efecto inductor de hipotiroidismo de MMI en ratones (Jeong *et al.*, 2012, *Endocrinology* 153: 683-9; Mozes *et al.*, 1998, *J. Clin Immunology* 18 (2): 106-13). Una dosis diaria de 500 μ g de MMI redujo significativamente los niveles de T4 tanto a las 2 como a las 4 semanas después de la primera inmunización, mientras que la dosis de 50 μ g sólo mostró una tendencia hacia niveles de T4 reducidos (Figura 24A). Aunque la inmunización con Ad-TSHR no indujo hipertiroidismo en este experimento (datos de ratones inmunizados con Ad-LacZ no mostrados) y experimentos previos, la reducción en los niveles de T4 inducida por el tratamiento con MMI indica que la producción de hormonas por tiroides de ratones DR3tg puede verse afectada.

Además de su función antitiroidea, el MMI ejerce también efectos inmunomoduladores (Mozes *et al.*, 1998, como anteriormente; Wang *et al.*, 2003, J. Leukoc. Biol. 73: 57-64). Por lo tanto, se determinó si el tratamiento con MMI puede reducir la producción de IgG anti-TSHR en ratones inmunizados con Ad-TSHR. Aunque el tratamiento con MMI disminuyó significativamente los niveles de T4, no se observaron cambios en los niveles de IgG anti-TSHR (Figura 24B).

Los pacientes con enfermedad de Graves, en particular pacientes con GO, a menudo requieren tratamiento inmunosupresor con glucocorticoides. Se sometió a prueba el efecto de la metilprednisolona, un fármaco glucocorticoide sintético, sobre la producción de anticuerpos anti-TSHR en ratones inmunizados con Ad-TSHR. Un tratamiento de 7 mg/kg/día de metilprednisolona redujo significativamente los niveles de IgG anti-TSHR en ratones DR4tg inmunizados con Ad-TSHR, mientras que una dosis de 1 mg/kg/día no fue suficiente para reducir los títulos de anticuerpos (datos no mostrados). Un tratamiento de 7 mg/kg/día de metilprednisolona de ratones DR3tg inmunizados con Ad redujo significativamente los niveles de IgG anti-TSHR cuando se midió a las 2 semanas después de la primera inmunización, pero no a las 4 semanas, debido a la disminución natural de los niveles de anticuerpos anti-TSHR en ratones no tratados con el tiempo. El tratamiento con metilprednisolona también redujo el número de células tímicas y esplénicas, lo que indica un nivel de dosis farmacológica suficiente en el modelo de enfermedad de Graves adenoviral (Figura 25).

Estos datos demuestran que la eficacia de los apítops en ratones DR3tg enfermos puede determinarse midiendo una reducción en anticuerpos IgG anti-TSHR.

Ejemplo 6 - Demostración de la eficacia terapéutica de ATX-GD-459 en el modelo de enfermedad de Graves adenoviral

Para determinar si la combinación de péptidos RNB-4K-GKK, RNB-5D-K1 y RNB-9B (ATX-GD-459) era capaz de suprimir el desarrollo de anticuerpos anti-TSHR, ratones DR3tg recibieron tratamiento con ATX-GD-459 o control según el programa de aumento de la dosis seguido de inmunización con Ad-LacZ o Ad-TSHR. Se recogieron muestras de suero para medir los niveles de IgG anti-TSHR por medio de ELISA. No estaban presentes anticuerpos IgG anti-TSHR antes (W-2, datos no mostrados) y después (W0) del tratamiento con el péptido ATX-GD-459 (Figura 25). Se observan altos niveles de IgG anti-TSHR en ratones tratados con PBS a las 2 semanas después de la primera inmunización con Ad-TSHR. El tratamiento con ATX-GD-459 redujo el aumento de anticuerpos IgG anti-TSHR tras la inmunización con Ad-TSHR en un 72 % y un 65 % en las semanas 2 y 5, respectivamente. Estos resultados muestran que ATX-GD-459 es eficaz en este modelo de enfermedad de Graves adenoviral.

Se observaron altos niveles de IgG anti-TSHR tras la inmunización con Ad-TSHR. Por lo tanto, este parámetro de enfermedad se usó para investigar el efecto de los fármacos inmunomoduladores o el tratamiento con péptido ATX-GD-459 en el modelo de enfermedad de Graves adenoviral. Se demostró que el tratamiento con metilprednisolona redujo con éxito los niveles de IgG anti-TSHR en ratones DR3tg inmunizados con Ad-TSHR. Además, el tratamiento con péptido ATX-GD-459 según el programa de aumento de la dosis redujo el aumento en la formación de anticuerpos IgG anti-TSHR en un 70 %.

Materiales y métodos

Ratones

Los ratones fueron como se describe en el ejemplo 2.

Antígenos

Los antígenos fueron como se describe en el ejemplo 2.

Ensayo del sistema de presentación independiente del procesamiento de antígenos (APIPS)

Se sometieron a prueba hibridomas de células T específicas de antígeno para determinar su reactividad a los péptidos, presentados por células VAVY o BM14 fijadas o no fijadas (=APC). Se cultivaron 5×10^4 células de los clones individuales con 25 µg/ml de péptido y 5×10^4 APC fijadas o nuevas. Para fijar las APC, las células se incubaron con paraformaldehído al 0,5 % (Merck, Darmstadt, Alemania) (pH 7) durante 5 min a temperatura ambiente (TA). La reacción de fijación se detuvo añadiendo glicina 0,4 M (Sigma-Aldrich) y lavando las células en RPMI-FCS al 10 %. Adicionalmente, se midió la reactividad hacia la proteína TSHR-ECD humana (Chesapeake-PERL, Savage, Maryland, EE. UU.) para identificar epítops. Después de 48 h, se midió la producción de IL-2 inducida por antígeno mediante ELISA.

Experimento de tolerización ex vivo

A ratones DR3tg o DR4tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 µg, 1 µg y 10 µg de péptido los días -15, -13 y -11 respectivamente, seguido de 3 inyecciones de 33, 75 o 100 µg de péptido (dependiendo de la dosis máxima, véanse las leyendas de las Figuras) los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Las alteraciones en las dosis máximas, y correspondientemente en las dosis de aumento de la dosis, se indican por experimento. El día 0, los ratones se inmunizaron subcutáneamente en la base de la cola con 50 µg de antígeno

(péptido de 15 meros parental no modificado) emulsionado en CFA (péptido/CFA). Diez días después de la inmunización, se recogieron los ganglios linfáticos drenantes (GL) y los bazo. Se aislaron células de LN y esplenocitos y se cultivaron en medio X-vivo 15 (suplementado con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin; Lonza) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para investigar la proliferación celular inducida por antígeno, se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo (200 μ l/pocillo) durante 72 horas con diferentes concentraciones de antígeno (0-25 μ g/ml) o con 12,5 μ g/ml de derivado de proteína purificado (PPD; control de cebado; Statens serum Institut, Copenhague, Dinamarca). Después de 72 horas, se recogieron 60 μ l de sobrenadante celular y se congelaron. A continuación, se añadieron 20 μ l/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Zaventem, Bélgica) a las células para obtener una concentración final de 1 μ Ci/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, y después de 16 h, las placas se congelaron. Las placas descongeladas se recogieron y se leyeron con un contador β (contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular.

Modelo animal adenoviral para la enfermedad de Graves

El adenovirus que expresa la subunidad A de TSHR humano (residuos de aminoácidos 1-289; Ad-TSHR) y el adenovirus de control (Ad-LacZ) que expresa β -galactosidasa se adquirieron de Viraquest (North Liberty, IA, EE. UU.). A ratones BALB/cJOlaHsd hembra de seis semanas de edad (Harlan Laboratories, Venray, Países Bajos) o ratones DR3tg se les inyectó por vía intramuscular en el músculo del muslo Ad-TSHR o Ad-LacZ (10^9 , 10^{10} o 10^{11} partículas víricas). Todos los ratones se inmunizaron simultáneamente usando el mismo lote de adenovirus por experimento. A los ratones se les inyectó en dos o tres ocasiones a intervalos de tres semanas (semana 0, 3 y 6) y se extrajo sangre antes de la primera inmunización y una semana después de la segunda inmunización. Los ratones se sacrificaron 4, 5 o 10 semanas después de la primera inmunización para obtener sangre, células del bazo y glándulas tiroideas. Los esplenocitos se aislaron y se cultivaron en medio X-vivo 15 (complementado con glutamina, penicilina y estreptomycin; Lonza) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para investigar la proliferación celular inducida por antígeno, se cultivaron $0,5 \times 10^6$ células/pocillo (200 μ l/pocillo) durante 72 horas con diferentes concentraciones de antígeno (0-25 μ g/ml). Después de 72 horas, se recogieron 60 μ l de sobrenadante celular y se congelaron. A continuación, se añadieron 20 μ l/pocillo de timidina tritiada (PerkinElmer, Zaventem, Bélgica) a las células para obtener una concentración final de 1 μ Ci/pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, y después de 16 h, las placas se congelaron. Las placas descongeladas se recogieron y se leyeron con un contador β (contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux) para evaluar la proliferación celular.

Detección de anticuerpos anti-TSHR

Se midieron anticuerpos anti-TSHR (clase IgG) contra la proteína TSHR-ECD purificada (Chesapeake-Perl) usando ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos (mitad del área de 96 pocillos, Fisher Scientific) durante la noche a TA con 50 μ l/pocillo de proteína TSHR-ECD en PBS (0,5 μ g/ml). Después de lavar con PBS-Tween al 0,05 %, los pocillos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (p/v) en PBS durante 1 h a TA y se incubaron con sueros de prueba (alícuotas duplicadas, dilución 1:50). Se usó anticuerpo anti-TSHR de ratón (A9, Abcam, Cambridge, Reino Unido) como control positivo. La unión del anticuerpo se detectó después con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Abcam). Para detectar anticuerpos anti-TSHR de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c, se usaron anticuerpos de rata anti-IgG1 de ratón (Southern Biotech, Alabama, EE. UU.), anticuerpos de cabra anti-IgG2a de ratón (Southern Biotech), anticuerpos cabra anti-IgG2b de ratón (Abcam) y anticuerpos cabra anti-IgG2c de ratón (Abcam) conjugados con HRP, respectivamente. La señal se desarrolló con tetrametilbencidina (TMB). La densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas a 450 nm (Tecan Benelux).

Detección de anticuerpos anti-TSHR estimuladores (TSAb)

El profesor M. Ludgate (Universidad de Cardiff, Reino Unido) proporcionó amablemente células Lulu*, células de ovario de hámster chino K1 (CHO-K1) transfectadas de forma estable con pA3Luc, un constructo de luciferasa sensible a AMPc, y pcDNA3-TSHR, el TSHR humano junto con la resistencia a G418. Las células se mantuvieron en medio 12 de Ham (Lonza, Verviers, Bélgica) con L-glutamina 2 mM (Lonza), 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin (Lonza), suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Fisher Scientific, Aalst, Bélgica) y 0,2 mg/ml de geneticina (Fisher) a 37 °C en un 5 % de CO₂. Para medir los TSAb, las células se sembraron en placa a 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio F12 de Ham con suero al 10 % sometido a arrastre de carbón vegetal (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica). Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con medio de Ham nuevo que contenía PEG al 5 % y suero de prueba al 10 % durante 4 h a 37 °C. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis de cultivo celular de luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos). La producción de luciferasa sensible a AMPc se midió mediante un ensayo de indicador de luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante y la emisión de luz se midió con un luminómetro FLUOstar omega (BMG labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (RLU; emisión de luz de células estimuladas/emisión de luz de células no estimuladas).

Detección de hipertiroidismo

Se midió tiroxina total (T4) en suero de ratón sin diluir (10 μ l) usando el kit de ELISA de tiroxina de ratón/rata CBI (Calbiotech, Spring Valley, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Los valores de T4 se calcularon a partir de patrones en el kit y se expresaron como μ g/dl. Además de las determinaciones de T4 en suero, se usó la histología del tiroides como parámetro para hipertiroidismo. Las glándulas tiroideas se fijaron en formalina tamponada

neutra al 10 % (pH 7,5), se procesaron para dar secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observaron las secciones para detectar cambios patológicos (hipertrofia, hiper celularidad de células epiteliales e infiltración de linfocitos) y se puntuaron (KWS Biotest, Bristol, Reino Unido).

Validación del modelo animal de la enfermedad de Graves

- 5 Se inmunizaron ratones DR3tg por vía intramuscular con Ad-TSHR en dos ocasiones en un intervalo de tres semanas (días 0 y 21). Empezando el día de la primera inmunización hasta la terminación del experimento, los ratones se trataron con MMI o sal de sodio de 21-hemisuccinato de 6 α -metilprednisolona (metilprednisolona). Todos los compuestos se administraron por vía subcutánea mediante bombas osmóticas ALZET (modelo 1004, 0,11 μ l/h, Charles River, Francia). Se disolvió MMI (Sigma) en agua estéril a la concentración deseada para dar a los ratones una dosis diaria de 50 o 500 μ g. Se disolvió metilprednisolona (Sigma) en agua estéril y se administró a los ratones a una dosis de 1 mg/kg/día o 7 mg/kg/día. El peso corporal se registró semanalmente para medir el estado de salud de los ratones. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de la primera inmunización para obtener muestras de sangre y bazo. Se evaluaron la proliferación de esplenocitos específicos de TSHR y los niveles de anticuerpos anti-TSHR como se ha descrito anteriormente.

15 *Modelo animal profiláctico de la enfermedad de Graves*

- 20 A ratones DR3tg se les inyectó por vía subcutánea en la región del costado 0,1 μ g, 1 μ g y 10 μ g de ATX-GD-459 o tratamiento de control los días -15, -13 y -11 respectivamente, seguido de 3 inyecciones de 100 μ g de ATX-GD-459 (dosis máxima) o tratamiento de control los días -8, -6 y -4 (programa de aumento de la dosis). Las alteraciones en las dosis máximas, y correspondientemente en las dosis de aumento de la dosis, se indican por experimento. El día 0, los ratones se inmunizaron mediante inyección intramuscular con 10⁹ partículas virales de Ad-TSHR o Ad-LacZ y la inmunización se repitió tres semanas después. Cinco semanas después de la primera inmunización, se recogieron sangre y bazo. Se evaluaron la proliferación de esplenocitos específicos de TSHR y los niveles de anticuerpos anti-TSHR como se ha descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende los siguientes péptidos del receptor de hormona estimulante del tiroides (TSHR):
 - (i) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KKKKYVSDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 1); y
 - 5 (ii) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID NO: 2); y
 - (iii) un agente antitiroideo y/o un β -bloqueante.
2. La composición de la reivindicación 1 para su uso en terapia en un sujeto.
3. La composición según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con la producción de autoanticuerpos contra TSHR en un sujeto.
- 10 4. La composición según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Graves en un sujeto.
5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el sujeto expresa HLA-DR3.
- 15 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el sujeto expresa HLA-DR4.
7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la composición se administra siguiendo un protocolo de aumento de la dosis.
8. Un kit que comprende los siguientes péptidos de TSHR en recipientes separados:
 - 20 (i) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KKKKYVSDVTLQQLESHKKK (SEQ ID NO: 1); y
 - (ii) un péptido capaz de unirse a una molécula de MHC de clase II sin procesamiento adicional, en donde el péptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GLKMFPDLTKVYSTD (SEQ ID NO: 2); y
 - (iii) un agente antitiroideo y/o un β -bloqueante.
- 25 9. El kit de la reivindicación 8 para su uso en la administración simultánea, separada o secuencial en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Graves.

FIGURA 1

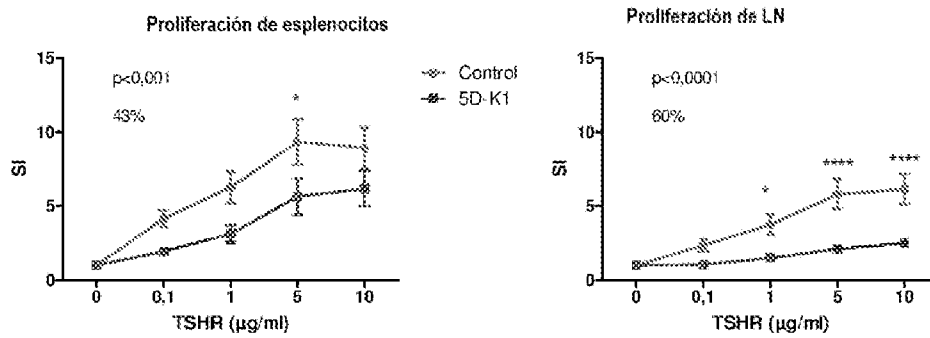


FIGURA 2

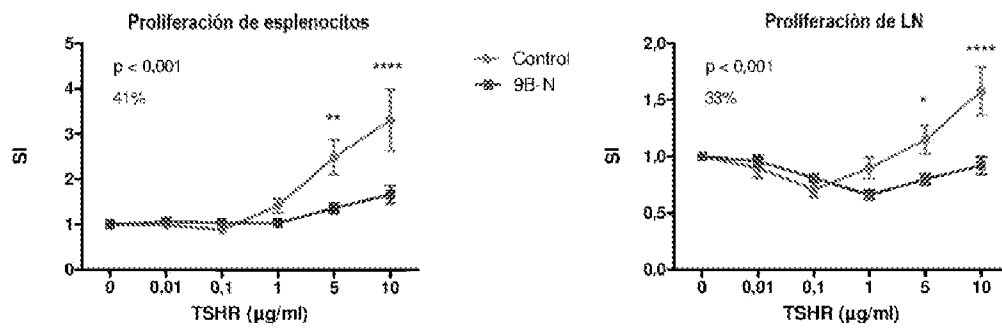


FIGURA 3

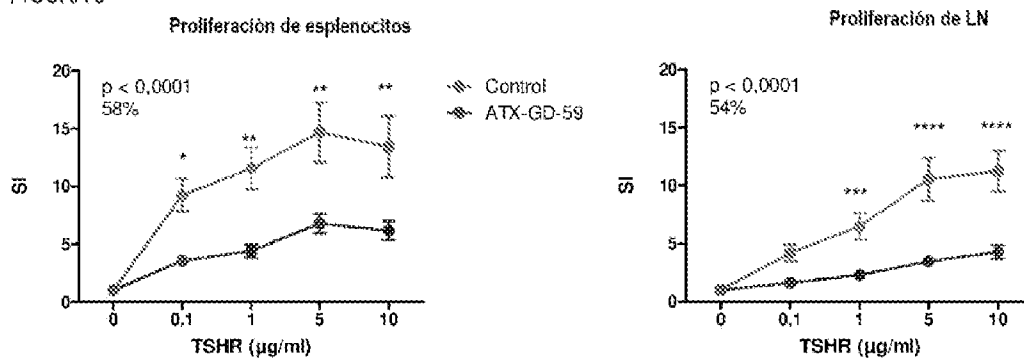


FIGURA 4

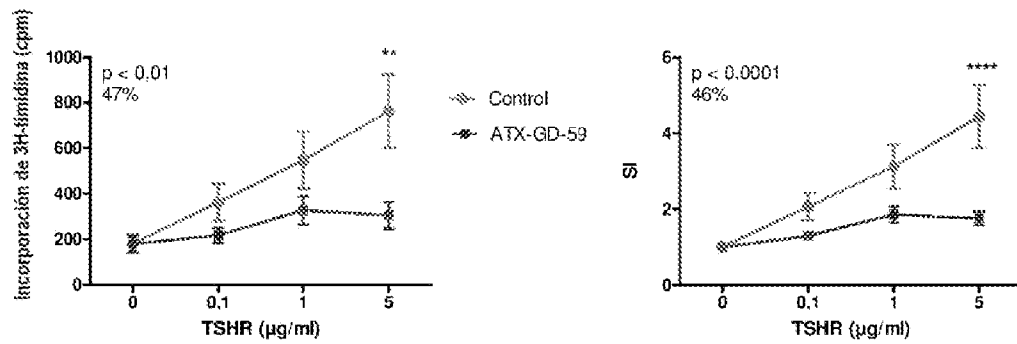


FIGURA 5

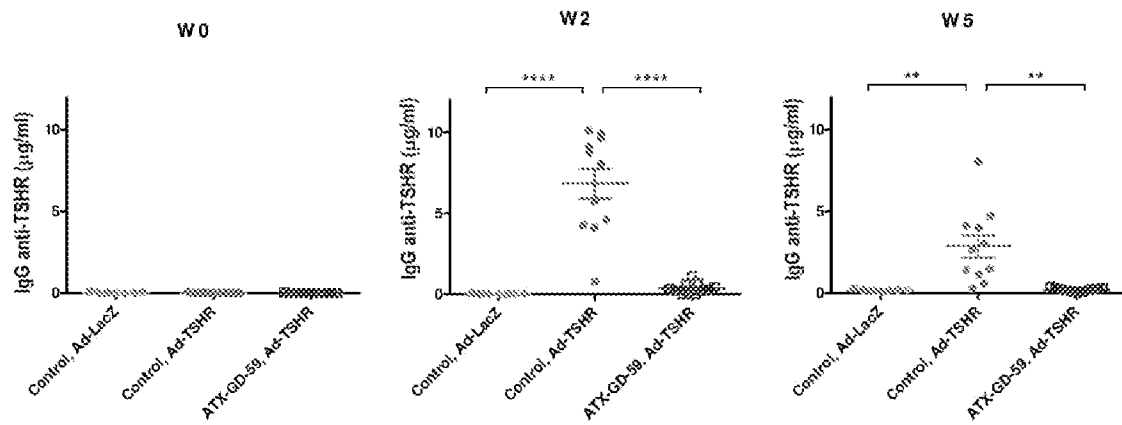


FIGURA 6

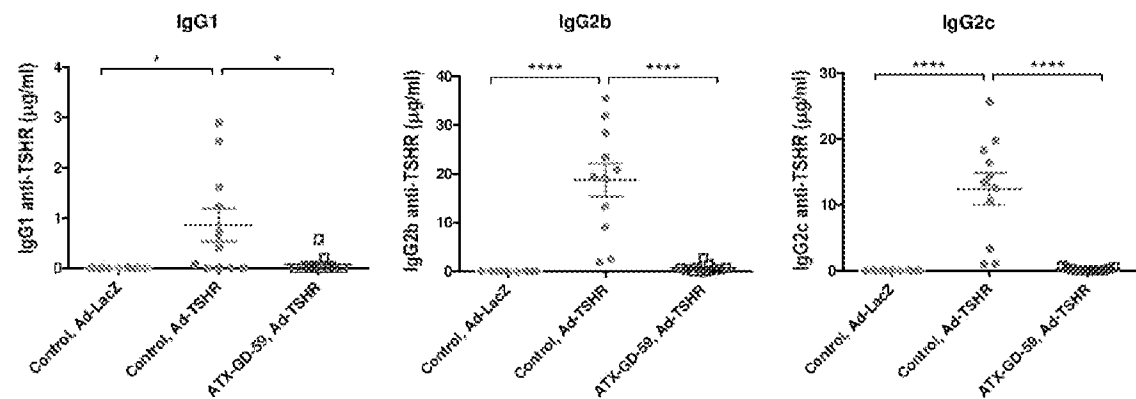


FIGURA 7

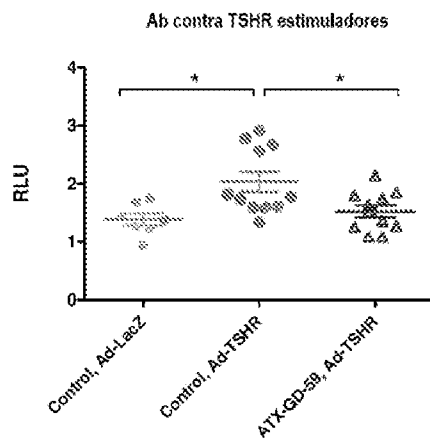


FIGURA 8

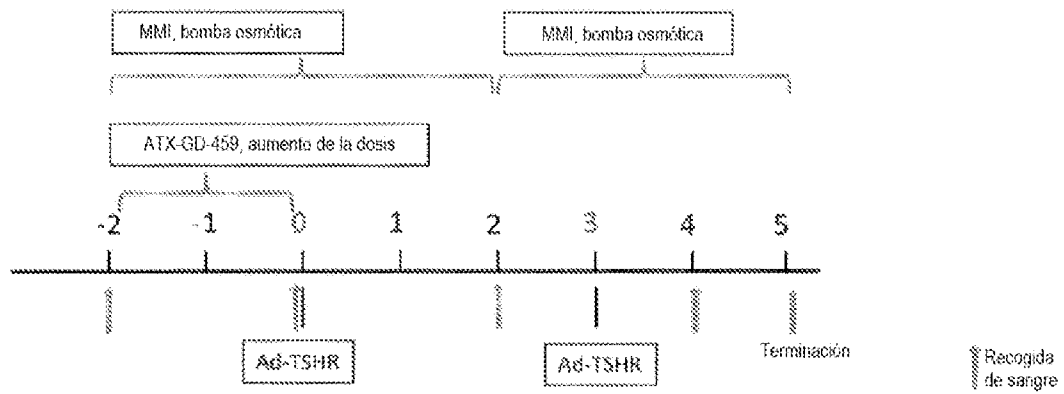


FIGURA 9

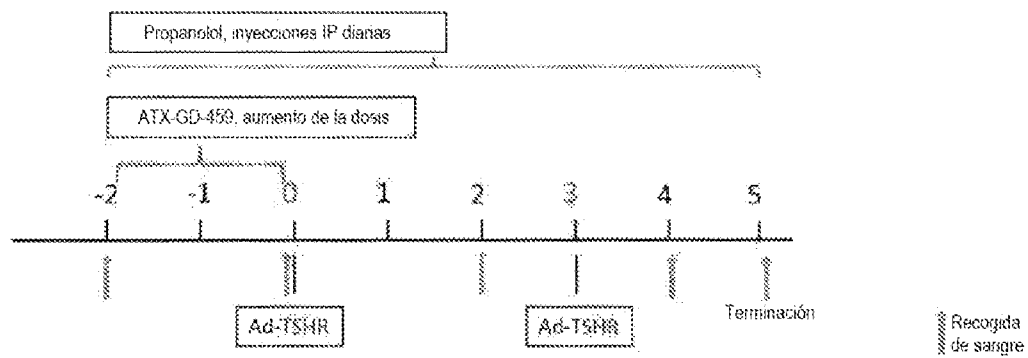


FIGURA 10

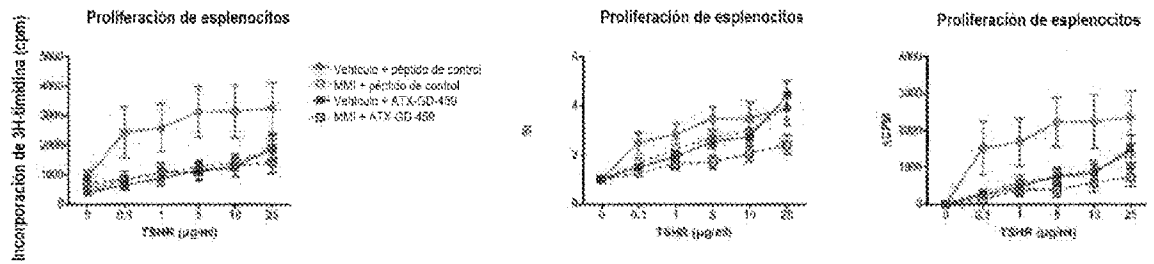


FIGURA 11

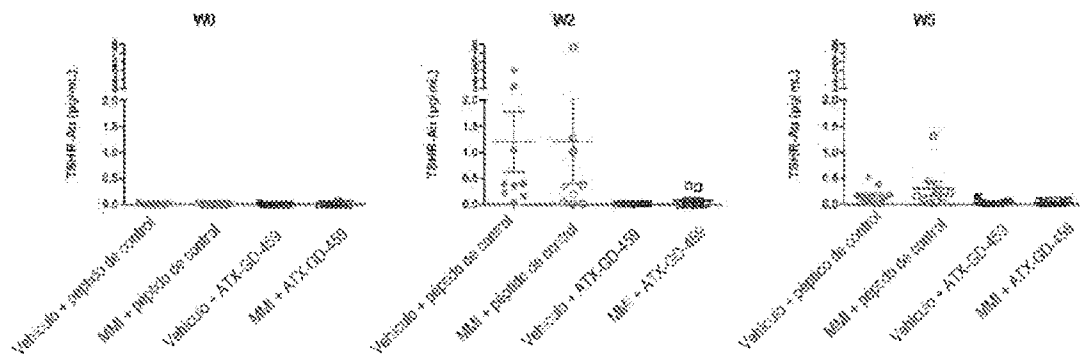


FIGURA 12

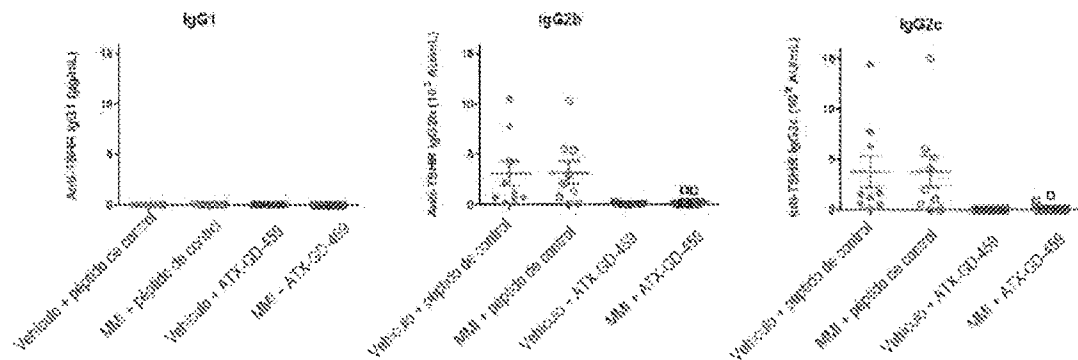


FIGURA 13

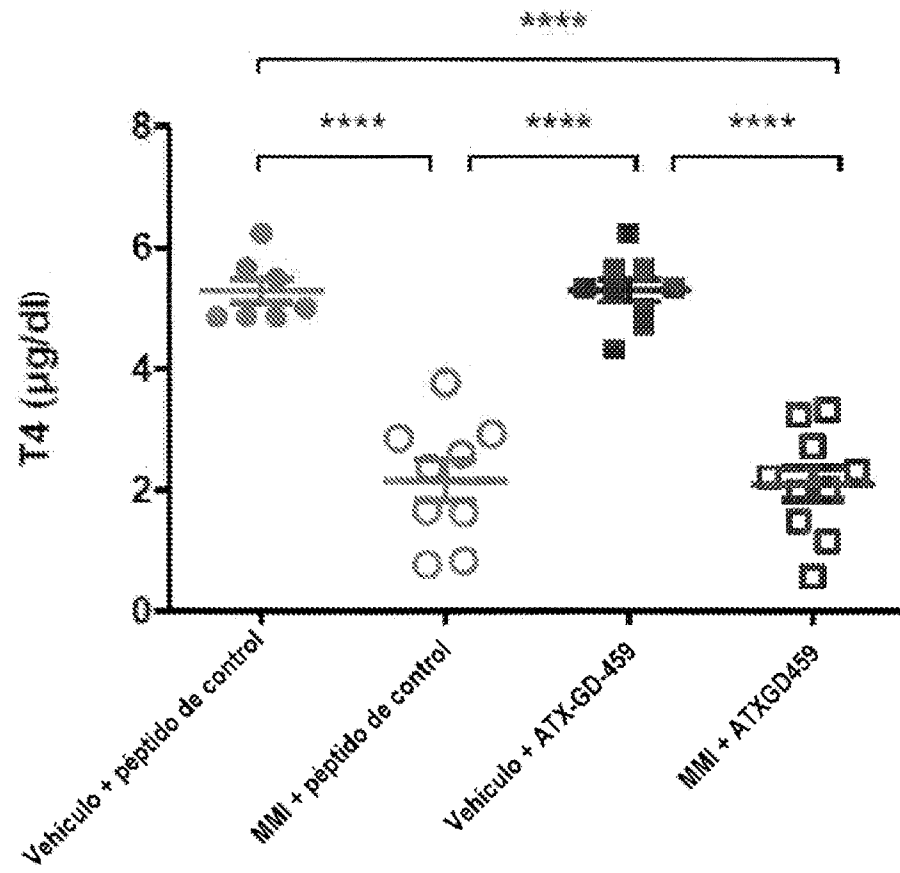
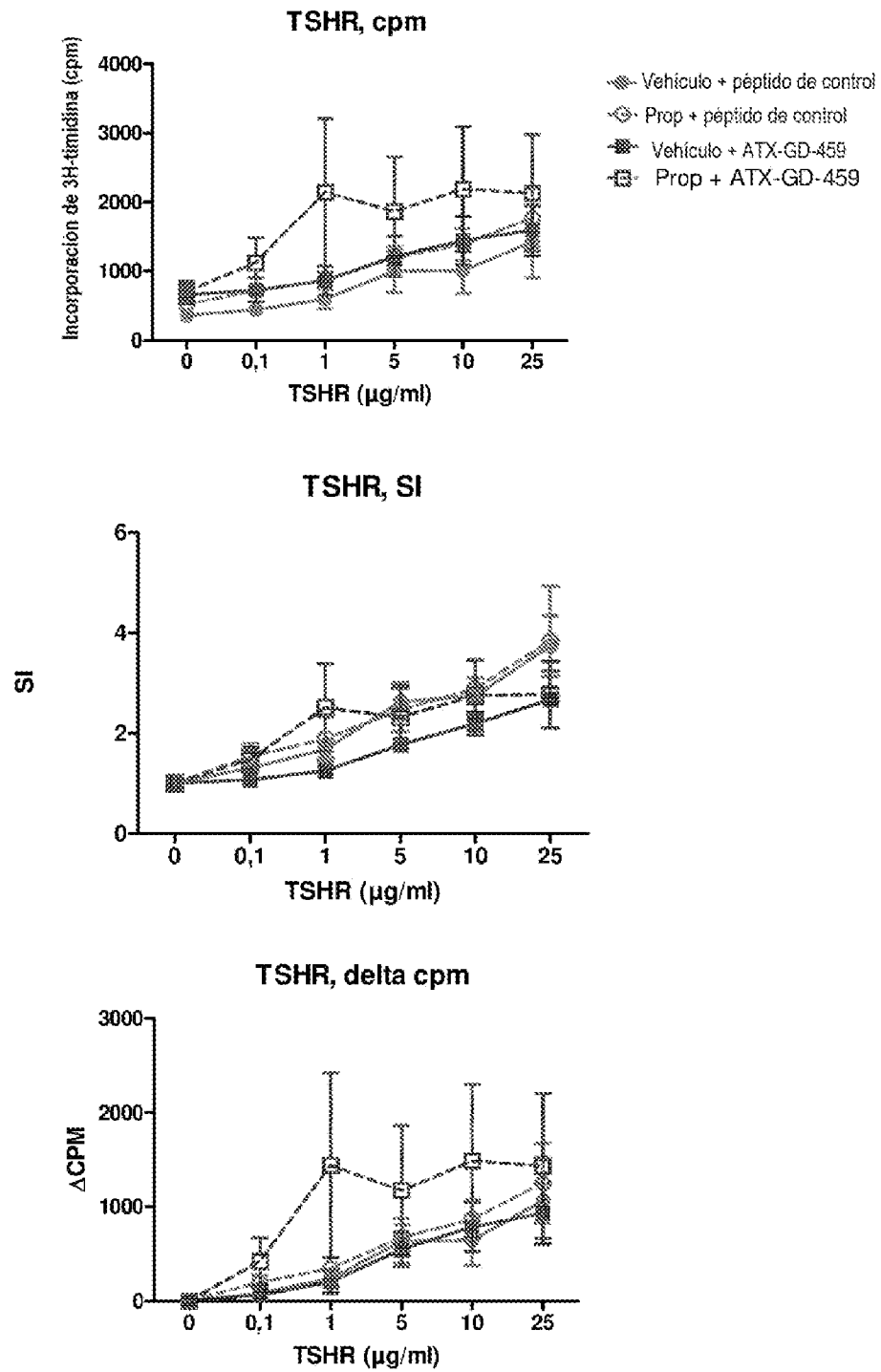


FIGURA 14



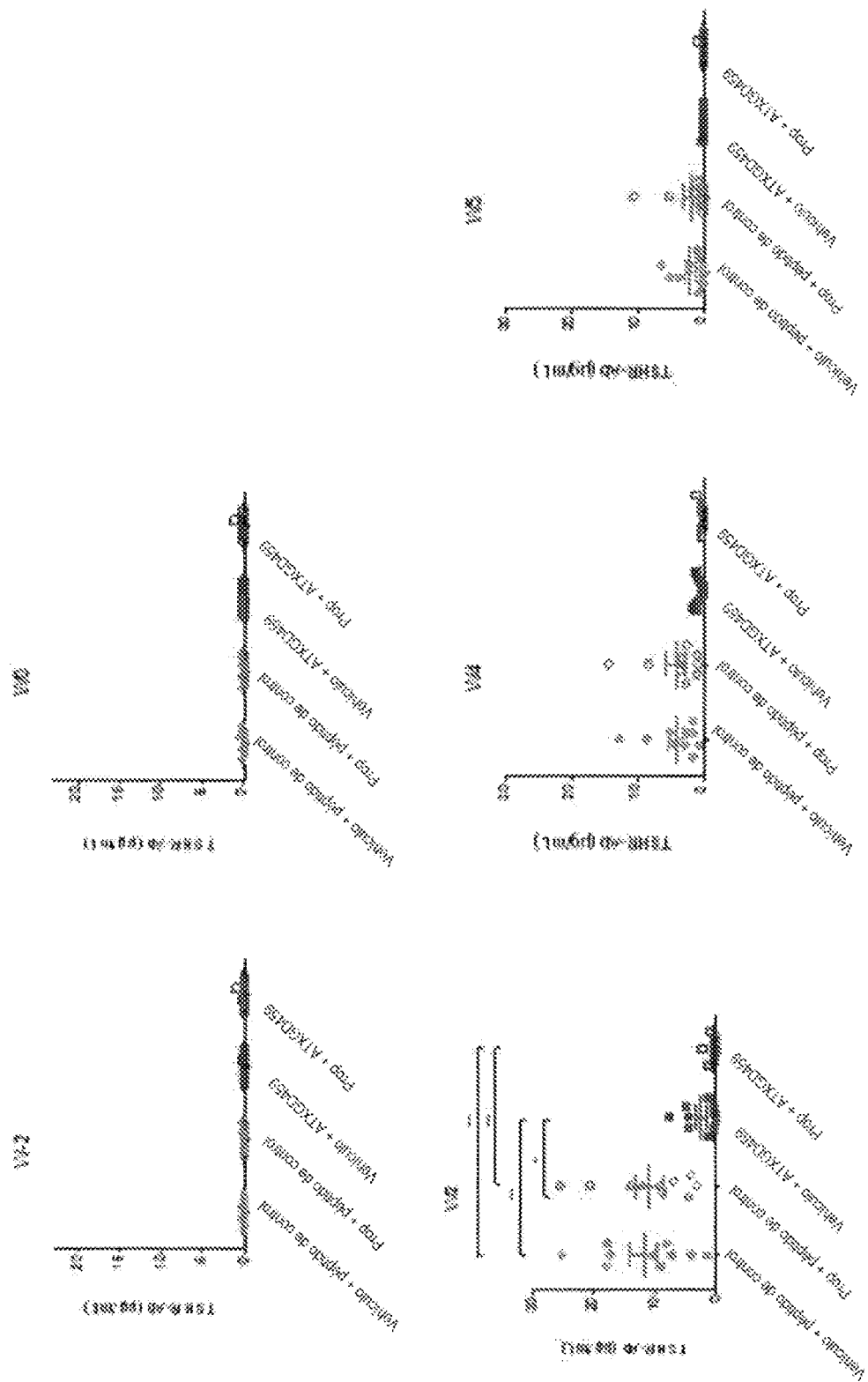


FIGURA 15

FIGURA 16

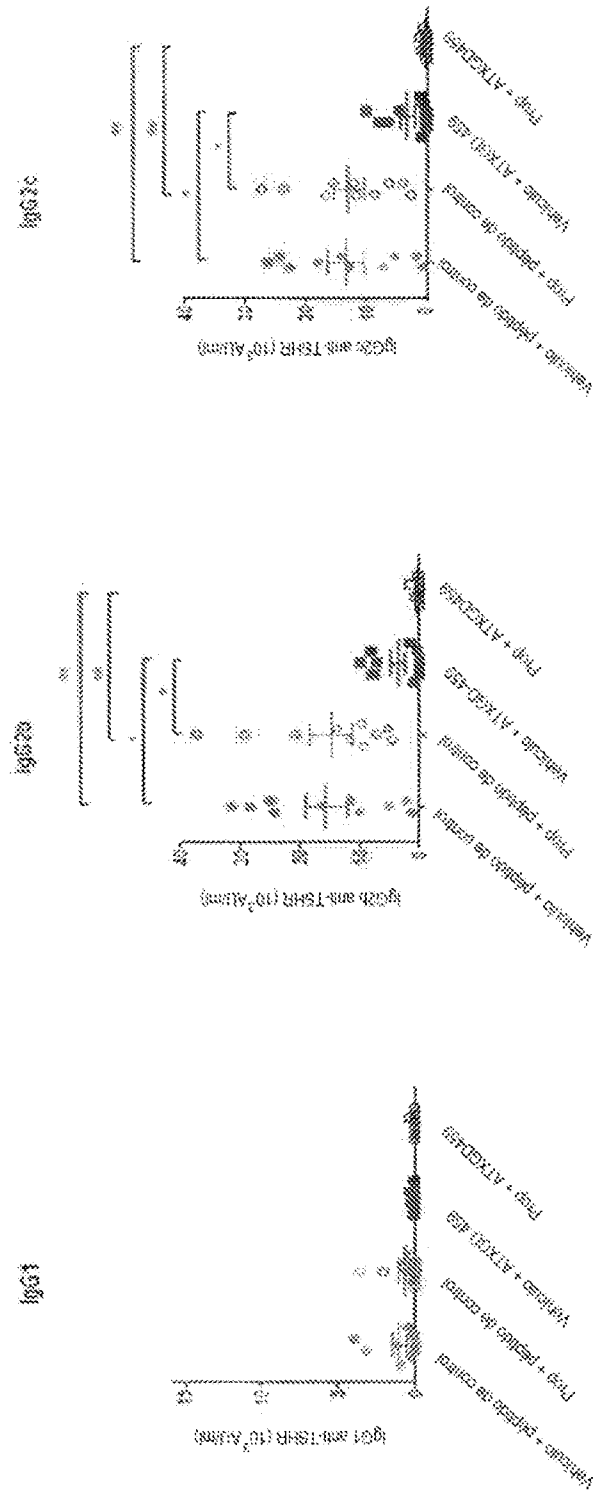


FIGURA 17

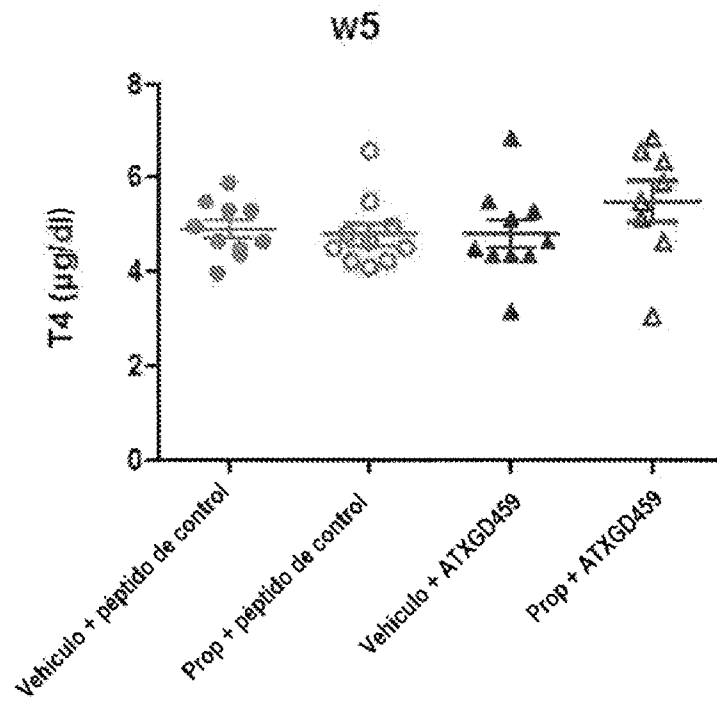


FIGURA 18

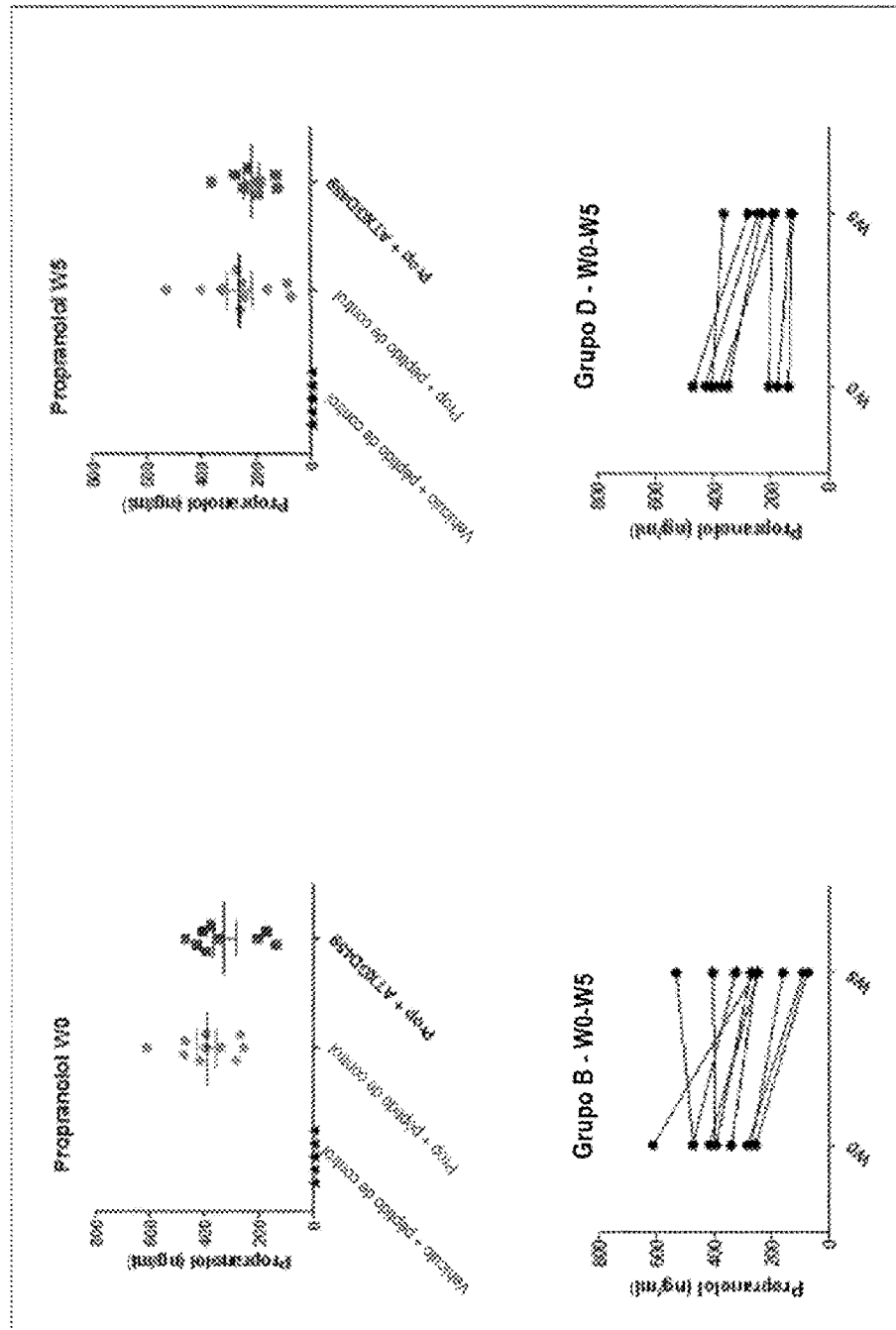


FIGURA 19

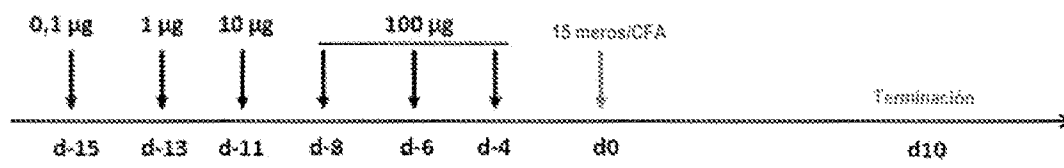
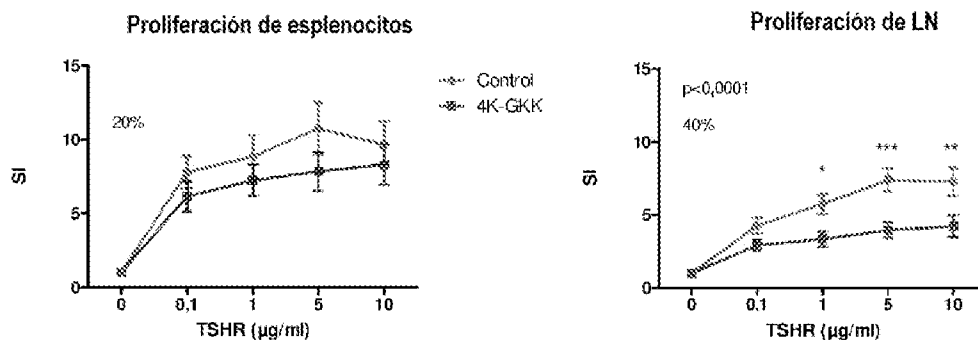
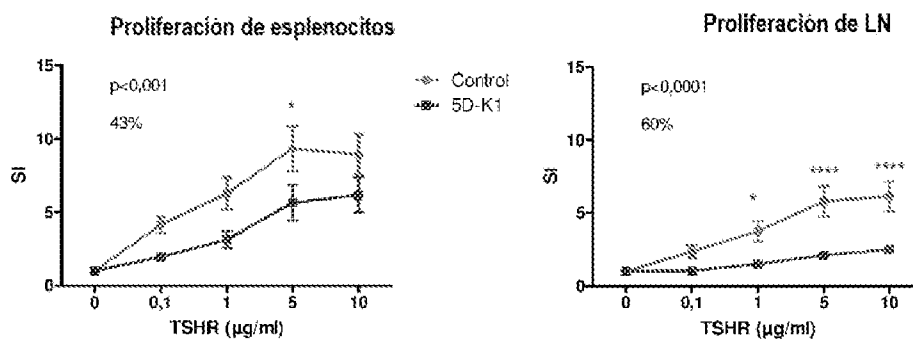


FIGURA 20

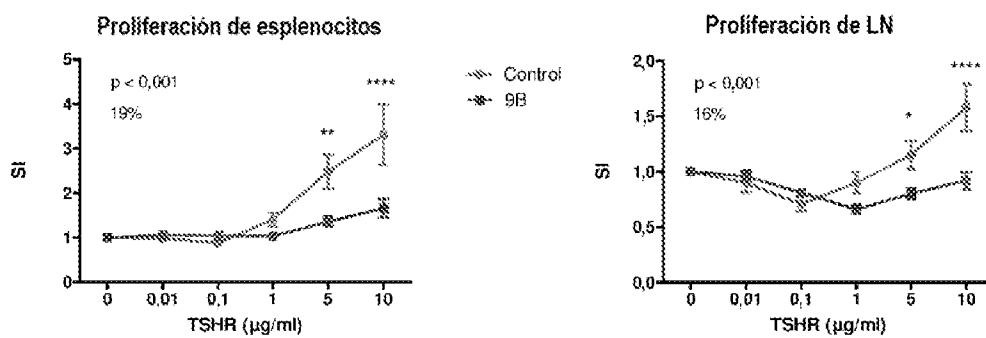
A



B



C



D

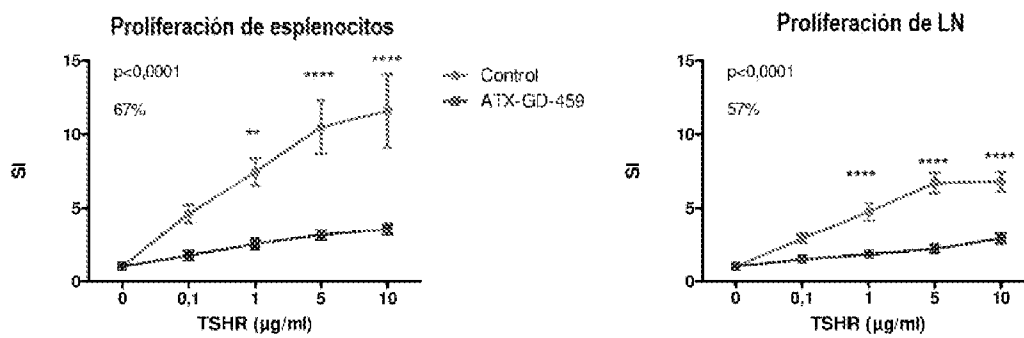


FIGURA 21

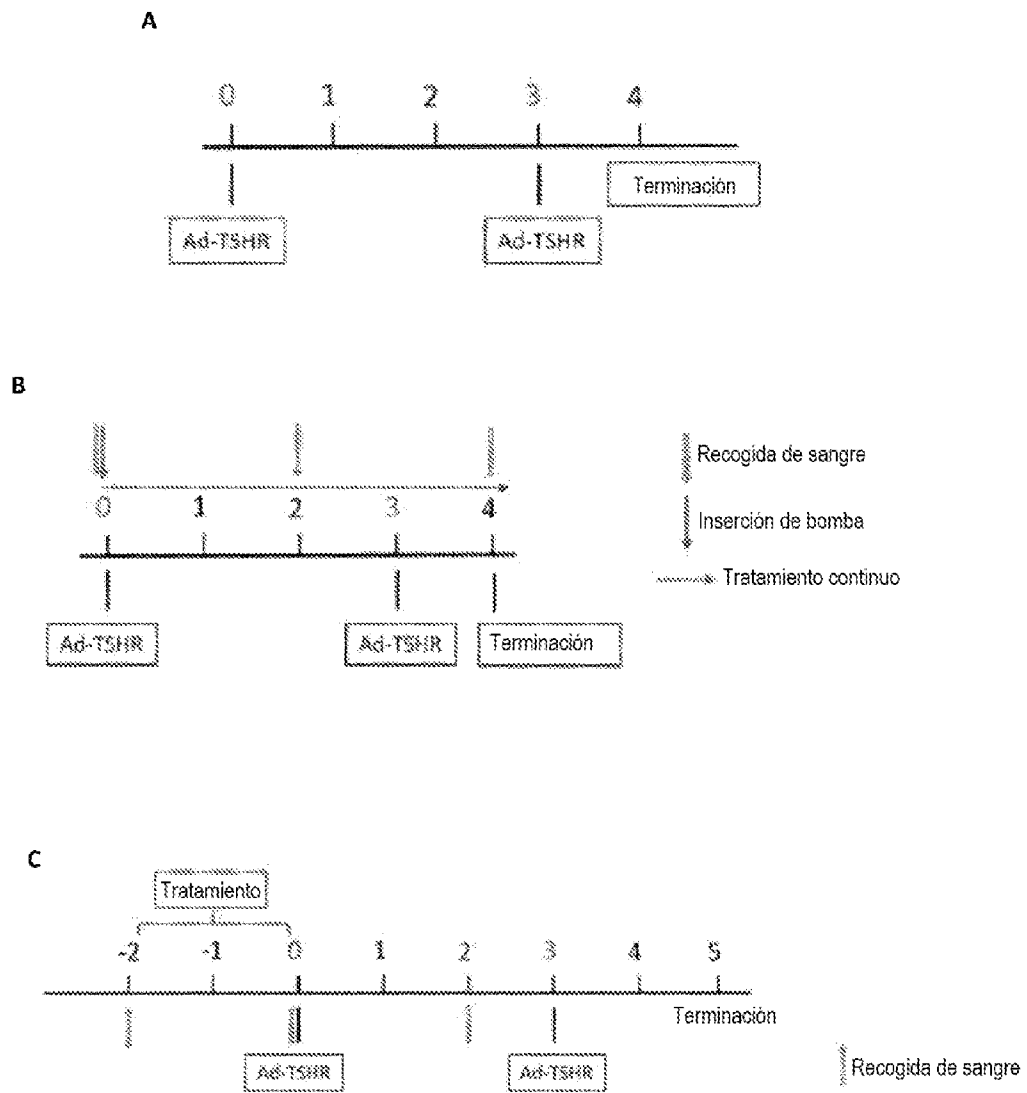
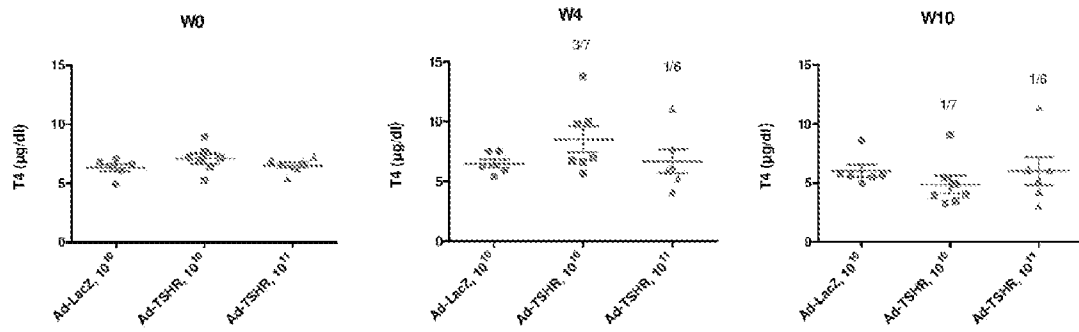


FIGURA 22

A



B

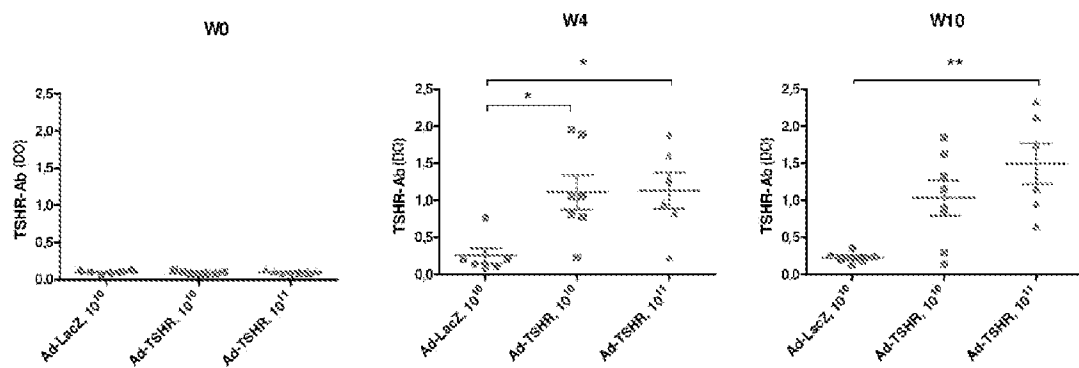


FIGURA 23

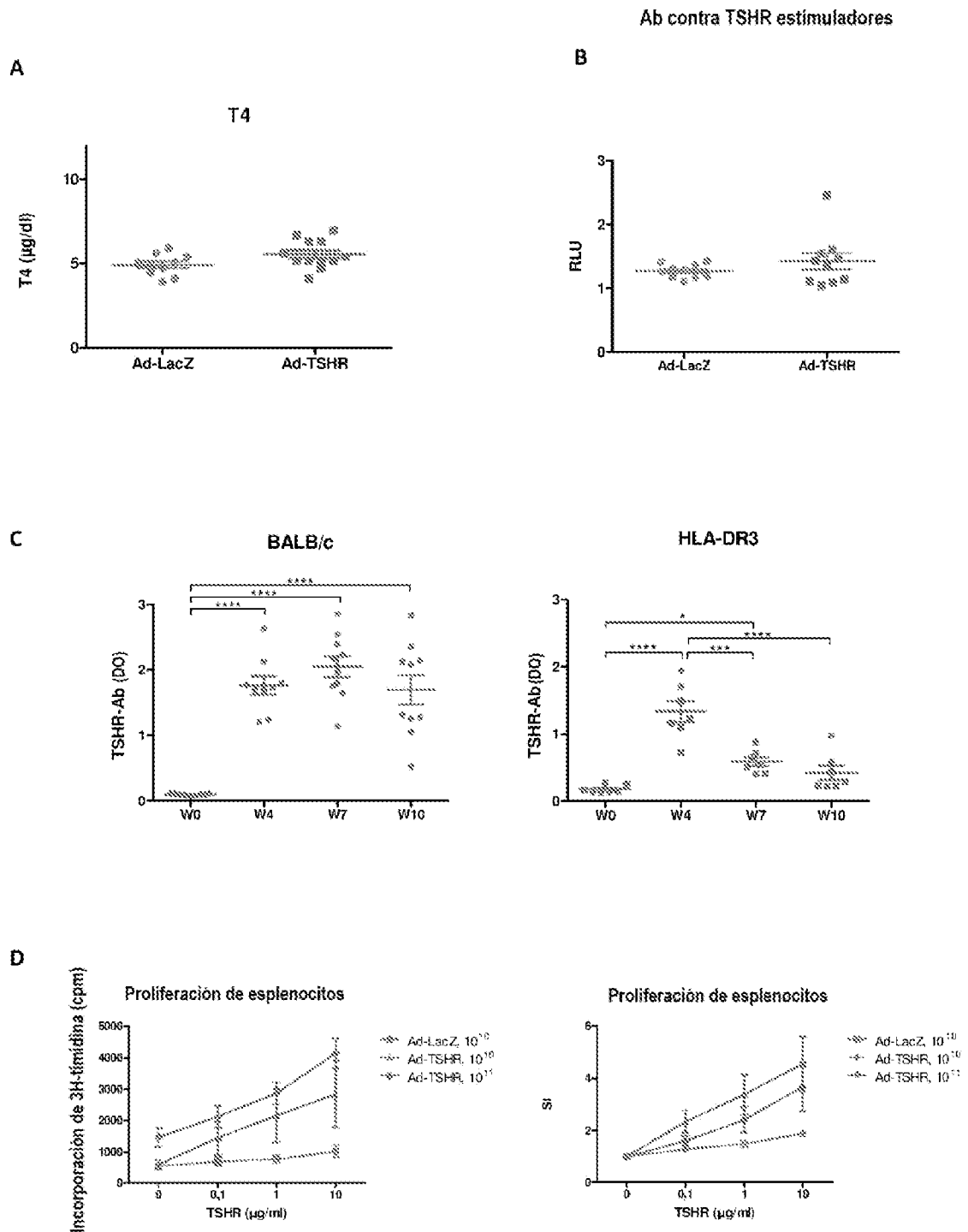


FIGURA 24

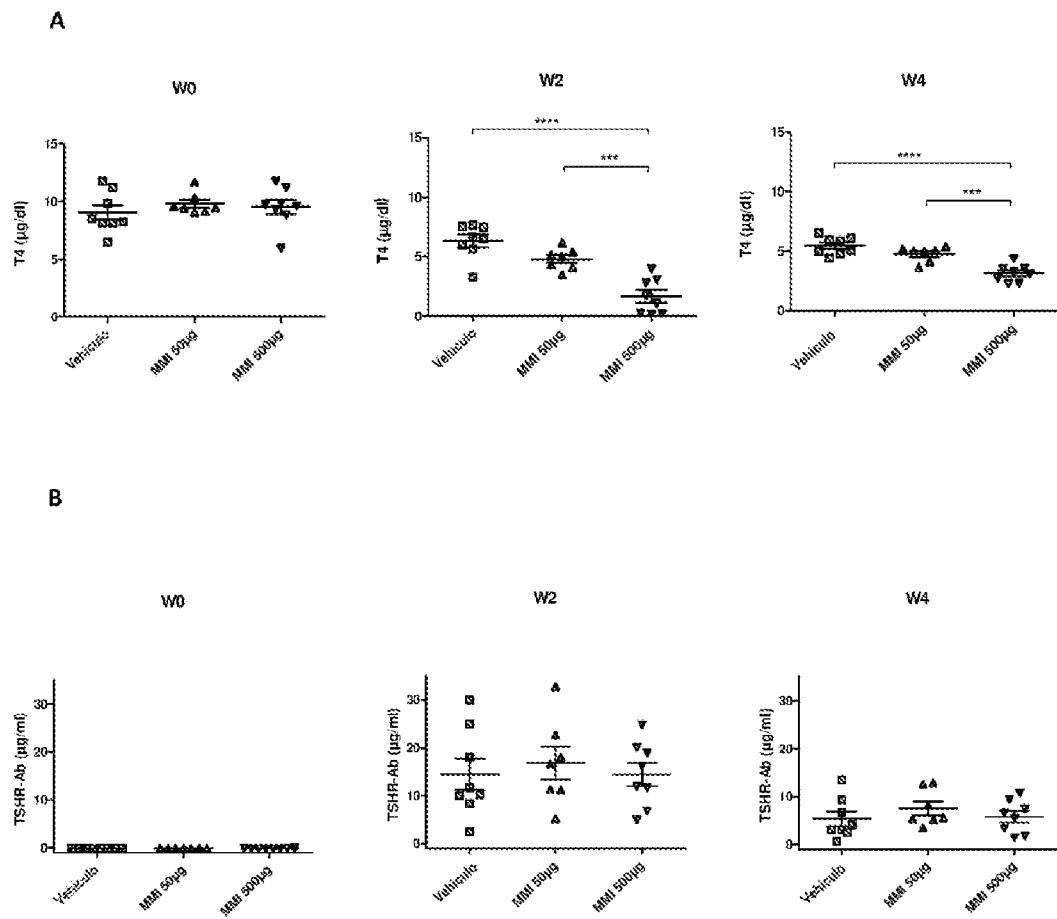


FIGURA 25

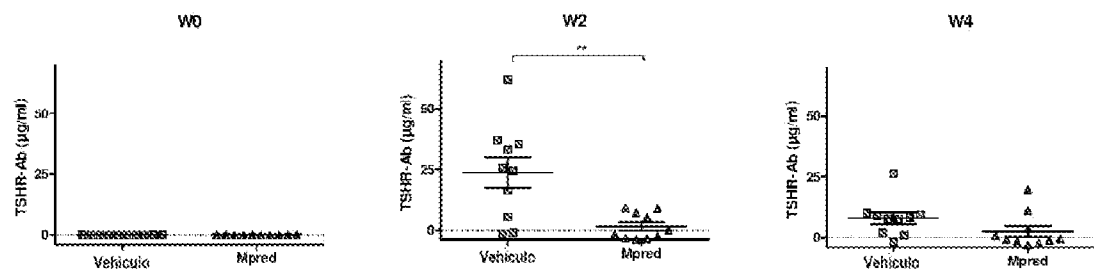


FIGURA 26

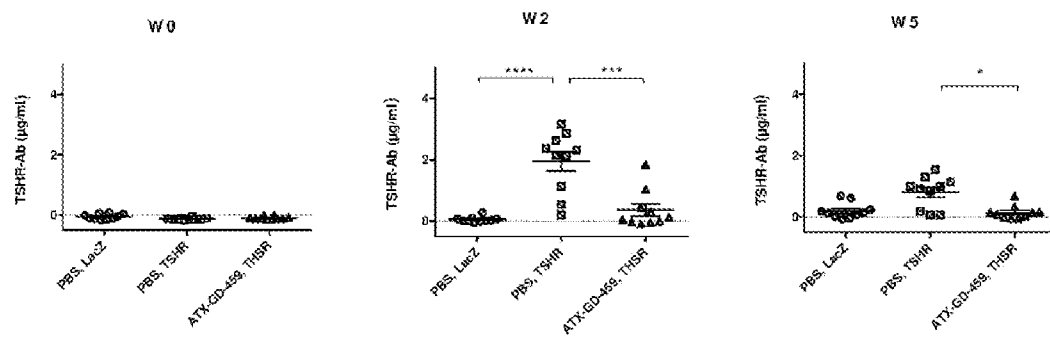


FIGURA 27

